

**Ecoimmunología y ontogenia: compromiso entre crecimiento y  
sistema inmune en *Octodon degus***



**Tesis**  
**Entregada A La**  
**Universidad De Chile**  
**En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos**  
**Para Optar Al Grado De**

**Doctor en Ciencias mención Ecología y Biología Evolutiva**

**Facultad De Ciencias**

**Por**

**Natalia Ramírez Otárola**

**Octubre, 2015**

**Director de Tesis**  
**Dr. Pablo Sabat**

**Co-Director de Tesis**  
**Dr. Alexis Kalergis**

VCH-FC  
DOC-EbE  
R173  
C. 1



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION  
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata

**Natalia Ramírez Otárola**

ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado Doctor en Ciencias mención Ecología y Biología Evolutiva, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 29 de septiembre del 2015.

Director de Tesis:  
Dr. Pablo Sabat

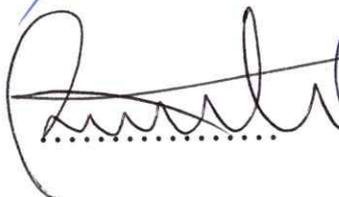
Co-Director de Tesis  
Dr. Alexis Kalergis

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Rodrigo Vasquez

Dr. Carezza Botto

Dr. Luis Ebensperger

  
.....  
  
.....  


  
.....  
  
.....  
  
.....

*DEDIDACA A MI FAMILIA Y AMIGOS*



### **Natalia Ramírez Otárola**

Natalia nació en Santiago de Chile en Noviembre de 1983. Ingresó a la Pontificia Universidad Católica de Chile a la carrera de Biología en el año 2002. Posteriormente y motivada por las ganas de seguir aprendiendo, ingresó al Programa de Magíster en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, en el año 2008, incorporándose al laboratorio de Ecofisiología Animal, realizando su tesis bajo la dirección del Dr. Pablo Sabat. Luego, en el año 2011, Natalia ingresa al programa de Doctorado en ciencias mención Ecología y Biología Evolutiva de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, realizando su tesis bajo la dirección del Dr. Pablo Sabat y el Dr. Alexis Kalergis. Su interés se centra en la fisiología ecológica y evolutiva, enfocándose principalmente en la variación natural del sistema inmune y su relación con rasgos de historia de vida.

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a Pablo Sabat por la confianza, el apoyo y la dedicación entregada en la realización de esta tesis. Al Dr. Alexis Kalergis, por creer en esta idea y asistir en conocimientos y logística. A los miembros de la comisión, Carezza Botto, Luis Ebensperger y Rodrigo Vásquez, por sus comentarios y sugerencias.

Quisiera agradecer de manera especial a los todos los integrantes del laboratorio, en especial a Karin Maldonado, quien me ayudó en los momentos precisos y de mayor necesidad. A Andrés Sazo, por la ayuda invaluable en los terrenos. A Natalia López y Mónica Núñez, por la ayuda entregada en el cuidado y mantención de los animales. No solo fueron buenos compañeros de laboratorio, también fueron buenos amigos. A Claudio Veloso, por sus comentarios y estímulos y sobre todo por los buenos momentos compartidos en el almuerzo.

Agradezco a los integrantes del laboratorio de Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, en especial a Janyra Espinoza, Alfredo Bermúdez y María Olga Bargsted. Sin duda alguna, fueron una parte central de esta tesis, sin su ayuda y cooperación el trabajo habría sido mucho más difícil. Gracias por la paciencia y el tiempo que dedicaron.

A mi familia por su apoyo y comprensión incondicional, por todas las veces que me vieron llorar, y sin dudarlo me motivaron a seguir adelante. Agradezco a mis queridos amigos que siempre estuvieron presentes y pendientes: Mónica Moraga, Daniela Thomas, Patricia Rivas, Daniel Aguilera, María José Pérez, Grisel Cavieres, Oscar Pesce y Macarena González.

Agradezco a todos los que me hicieron sentir su apoyo.

Esta tesis fue financiada por el Beneficio Apoyo de Tesis Doctoral CONICYT N°21110063, Proyecto FONDECYT N°1120276, y el Instituto Milenio de Inmunología e Inmunoterapia, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

## ÍNDICE DE MATERIAS

<b>Lista de Tablas</b> .....	viii
<b>Lista de Figuras</b> .....	ix
<b>Lista de Abreviaciones</b> .....	xi
<b>Resumen</b> .....	xii
<b>Abstract</b> .....	xiv

<b>I. Introducción general</b> .....	1
Sistema inmune de vertebrados .....	2
Integrando la Inmunología y la Ecológica: Ecoinmunología .....	7
Variación de la función inmune .....	9
La respuesta inmune en un contexto ecológico.....	9
Costos y compromisos de la respuesta inmune.....	10
Modelo de estudio.....	12
Referencias.....	16

### **II. Capítulo I**

<b>Desarrollo de la respuesta inmune innata y efectos a largo plazo de un desafío inmune</b> .....	23
Resumen.....	24
Abstract.....	27

Introducción.....	29
Desarrollo y ontogenia del sistema inmune.....	30
Efectos de un desafío inmune realizado durante el desarrollo sobre el fenotipo del adulto.....	32
Hipótesis.....	36
Predicciones específicas.....	36
Objetivos específicos .....	36
Materiales y métodos .....	39
Captura y mantención.....	39
Calendario de inmunizaciones.....	39
Masa corporal e índice corporal.....	41
Temperatura corporal.....	41
Niveles de Interleucina-1 $\beta$ .....	42
Conducta asociada a enfermedad.....	43
Tasa metabólica basal.....	43
Análisis estadístico.....	44
Resultados .....	47
Normalidad.....	47
Desarrollo, masa corporal y desafío inmune.....	47
Conducta de enfermedad en el desarrollo.....	49
Temperatura corporal y niveles Interleucina-1 $\beta$ en el desarrollo..	49
Tasa metabólica basal e índice corporal en adultos.....	54
Discusión.....	56
Ontogenia del sistema inmune en <i>Octodon degus</i> .....	56

Desafío inmune durante el desarrollo: ¿existen efectos a largo plazo sobre la tasa metabólica basal?.....	61
Referencias.....	65

### III. Capítulo II

<b>Efecto de la temperatura ambiental sobre la respuesta inmune innata y costos energéticos.....</b>	<b>73</b>
Resumen.....	74
Abstract.....	77
Introducción.....	79
Hipótesis.....	84
Predicciones específicas.....	84
Objetivo General.....	85
Objetivos específicos.....	85
Materiales y métodos.....	86
Captura y Mantenimiento de animales.....	86
Aclimataciones e inmunizaciones.....	86
Temperatura corporal.....	88
Niveles de Interleucina-1 $\beta$ .....	88
Conducta asociada a enfermedad.....	89
Tasa metabólica basal.....	89
Análisis estadístico.....	90

Resultados .....	92
Normalidad .....	92
Cambios en masa corporal y tasa metabólica basal .....	92
Temperatura corporal y niveles de IL-1 $\beta$ .....	95
Conducta de enfermedad .....	97
Discusión.....	100
Niveles de IL-1 $\beta$ y cambios en la temperatura corporal .....	100
Cambios en la masa corporal y tasa metabólica basal.....	104
Conducta de enfermedad .....	107
Referencias.....	110
<b>IV. Conclusiones generales.....</b>	<b>118</b>
Conclusiones generales .....	119
Referencias.....	127

## LISTA DE TABLAS

### **Capítulo I: Desarrollo de la respuesta inmune innata y efectos a largo plazo de un desafío inmune**

Tabla 1. Valores de masa corporal (MC), Índice corporal (IC) medidos a los 40 y 90 días posterior al nacimiento y tasa metabólica basal (TMB) medido a los 90 días de crías de distintas edades, desafiadas y control ..... 48

Tabla 2. Valores de Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y temperatura corporal de crías de distintas edades, desafiadas con LPS y crías control ..... 52

### **Capítulo II: Efecto de la temperatura ambiental sobre la respuesta inmune innata y costos energéticos**

Tabla 1. Masa corporal y tasa metabólica basal (TMB) medidos antes (0hr) y después (24hr) del desafío con LPS, en crías aclimatadas a 15°C y 30°C ..... 93

## LISTA DE FIGURAS

### **I. Introducción general**

Figura 1. Principales mecanismos inmunes de vertebrados.....	3
Figura 2. Respuesta de Fase Aguda .....	4
Figura 3. El estudio del fenotipo inmunológico permite tener una mejor comprensión de los patrones observados en ecología y evolución .....	8
Figura 4. Esquema de la interacción entre temperatura ambiental, respuesta inmune y ontogenia de la función inmune en individuos en desarrollo .....	15

### **II. Capítulo I: Desarrollo de la respuesta inmune innata y efectos a largo plazo de un desafío inmune**

Figura 1. Conducta asociado a enfermedad .....	51
Figura 2. Temperatura corporal registrada a las 12 horas posteriores de realizado el desafío .....	53
Figura 3. Masa corporal medida a los 90 días .....	55

### **III. Capítulo II: Efecto de la temperatura ambiental sobre la respuesta inmune innata y costos energéticos**

Figura 1. Cambio en masa corporal de crías desafiadas con LSP y control, aclimatadas a 15°C y 30°C .....	94
Figura 2. Cambio en tasa metabólica basal de crías con LSP y control y aclimatadas a dos temperaturas ambientales (15° y 30°C).....	95

Figura 3. Temperatura corporal registrada a las 12, 15, 19 y 24 horas posteriores al desafío .....	96
Figura 4. Niveles de IL-1 $\beta$ de crías desafiadas con LPS y control, aclimatadas a dos temperaturas (15°C y 30°C).....	97
Figura 5. Conducta asociada a enfermedad .....	99

#### **IV. Conclusiones generales**

Figura 1. Representación gráfica de las principales conclusiones.....	125
---	-----

## LISTA DE ABREVIACIONES

**APR:** Respuesta de fase aguda (Acute Phase Response)

**IL-1 $\beta$ :** Interleucina-1 $\beta$

**IC:** Índice Corporal

**Lc:** Longitud cola

**Lt:** Longitud total

**LPS:** Lipopolisacárido

**MC:** Masa corporal

**TMB:** Tasa metabólica basal

## RESUMEN

La generación de una respuesta inmune efectiva contra los patógenos es esencial para aumentar las probabilidades de supervivencia; sin embargo, la función inmune es un proceso costoso en términos de energía y nutrientes, y se encontraría en compromiso con otras funciones biológicas. En este sentido, mucho se ha debatido sobre los costos asociados a la respuesta inmune de organismos en desarrollo observándose que cuando los organismos crecen en ambiente con recursos limitados es probable que la función inmune presente compromisos con el crecimiento. Así, las condiciones ambientales experimentadas por los organismos en desarrollo parecen tener un rol esencial en la respuesta inmune y los costos asociados. De esta manera, teniendo en cuenta que la respuesta inmune es un proceso que requiere de altos niveles de energía y recursos, la presente tesis intenta evaluar los siguientes objetivos: 1) evaluar las variaciones específicas en la generación de una respuesta inmune en función de la distintas etapas del desarrollo y los efectos sobre el crecimiento y la masa corporal de las crías, 2) determinar los efectos de un desafío inmune realizado durante el desarrollo sobre la tasa metabólica basal una vez que los organismos han alcanzado una edad más avanzada, y 3) evaluar el efecto de la temperatura ambiental experimentada durante el desarrollo sobre la respuesta inmune y los costos energéticos asociados. Para evaluar estos objetivos, utilizamos como modelo de estudio a crías del roedor *Octodon degus* (Octodontidae; Hystricognathi), evaluando la magnitud de la respuesta inmune innata durante el primer mes de vida de la crías. Se midieron los niveles de la citoquina pro-inflamatoria Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), conducta asociados a un estado de enfermedad,

cambios en la temperatura corporal y cambios en la masa corporal como rasgos de la respuesta inmune.

Los resultados obtenidos indicaron que: 1) la magnitud de la respuesta inmune innata no presenta una variación en función de la edad, y tanto la masa corporal como el crecimiento no son afectados por la respuesta inmune, independiente de la etapa del desarrollo en la cual se produce el desafío inmune, 2) la tasa metabólica basal de individuos juveniles no fue afectada por el desafío inmune realizado durante su desarrollo, por lo tanto, la inversión de recursos a la función inmune durante el desarrollo no afecta a largo plazo el presupuesto energético y 3) la exposición a bajas temperaturas ambientales (bajo el límite inferior de la zona termoneutral) sería un factor importante afectando de manera positiva la respuesta inmune innata, al menos, para los componentes de la respuesta inmune analizados en esta tesis. Sin embargo, la temperatura ambiental no afectó los costos energéticos de la respuesta inmune. De esta manera, la magnitud de algunos componentes de la respuesta inmune innata de *O. degus*, pareciera estar fuertemente influenciados por variables ambientales como la temperatura. Sin embargo, no se encontró evidencia de la presencia de compromisos entre la función inmune y la termorregulación y el crecimiento en crías de *O. degus*.

## ABSTRACT

The generation of an effective immune response against pathogens is essential to increase the chances of survival; however, immune function is costly in terms of energy and nutrients, and can be trade-off with other biological functions. In this sense, much has been discussed about the costs associated with the immune response in developing organisms, noting that when organisms grow in environments with limited resources, the immune function could be traded-off with growth. Thus, environmental conditions experienced by developing organisms seem to have an essential role in the immune response and the associated costs. Thus, considering that immune response is a process that requires high levels of energy and resources, this thesis attempts to assess the following objectives: 1) the specific changes in generating an immune response in function to the different stages of development and the effects on growth and body mass of the offspring, 2) the possible effects of an immune challenge experienced during development on the basal metabolic rate once the individuals have reached an advanced age in the development, and 3) the effect of the environmental temperature experienced during the development of the immune response and the associated energetic costs. To evaluate these objectives, we use as a study model young individuals of the rodent *Octodon degus* (Octodontidae; Hystricognathi), evaluating the magnitude of the innate immune response during the first month of life. Levels of pro-inflammatory cytokine interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), sickness behavior, changes in body temperature and changes in body mass as features of the immune response were measured.

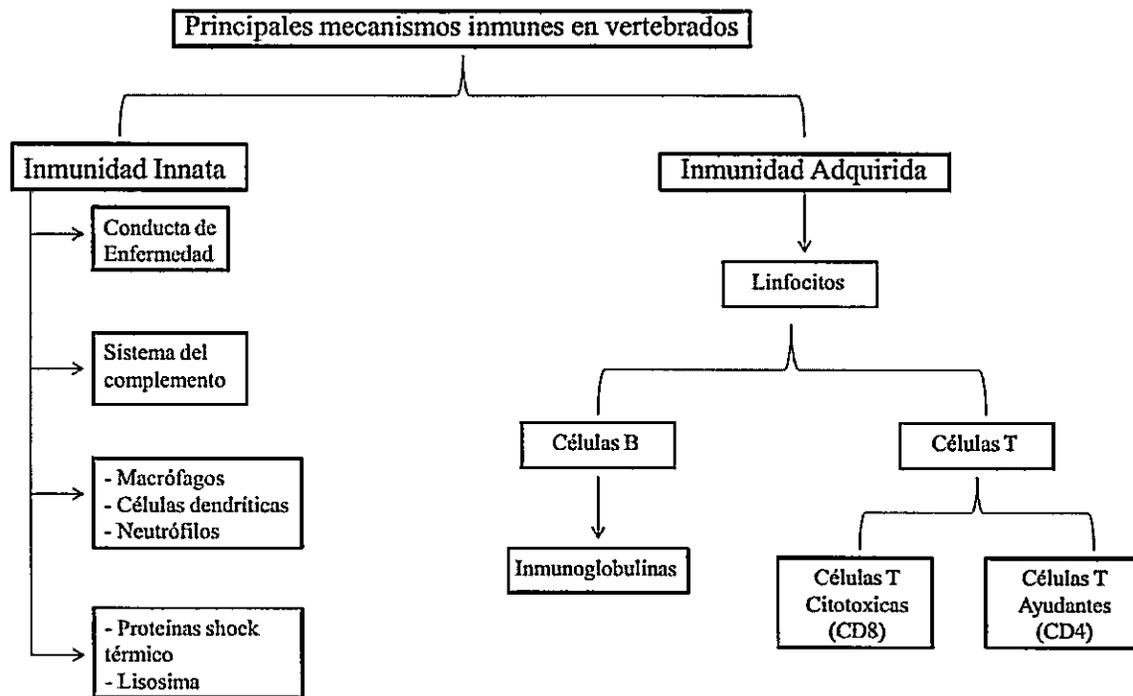
The results indicate that: 1) the magnitude of the innate immune response did not exhibit a variation with age, and both body mass and growth were not affected by the immune challenge, independent of the stage of development in which the immune challenge was made, 2) the basal metabolic rate of juveniles was not affected by the immune challenge experienced during development, therefore the investment of resources to immune function during development does not affect the long-term energy budget and, 3) the exposition to cold would be an important factor in the magnitude of the immune response, enhancing the magnitude of the response. However, this effect would be relevant only for certain components of the innate immune response studied in this thesis. Moreover, the ambient temperature would have no effect on the energetic costs of the immune response. Thus, the magnitude of some components of the innate immune response of *O. degu*, appears to be strongly influenced by environmental variables such as temperature. However, we did not find evidence of a trade-off between the immune response and the thermoregulatory capacity and growth in pups of *Octodon degus*.

# **I. Introducción general**

## INTRODUCCIÓN

### **El sistema inmune de vertebrados**

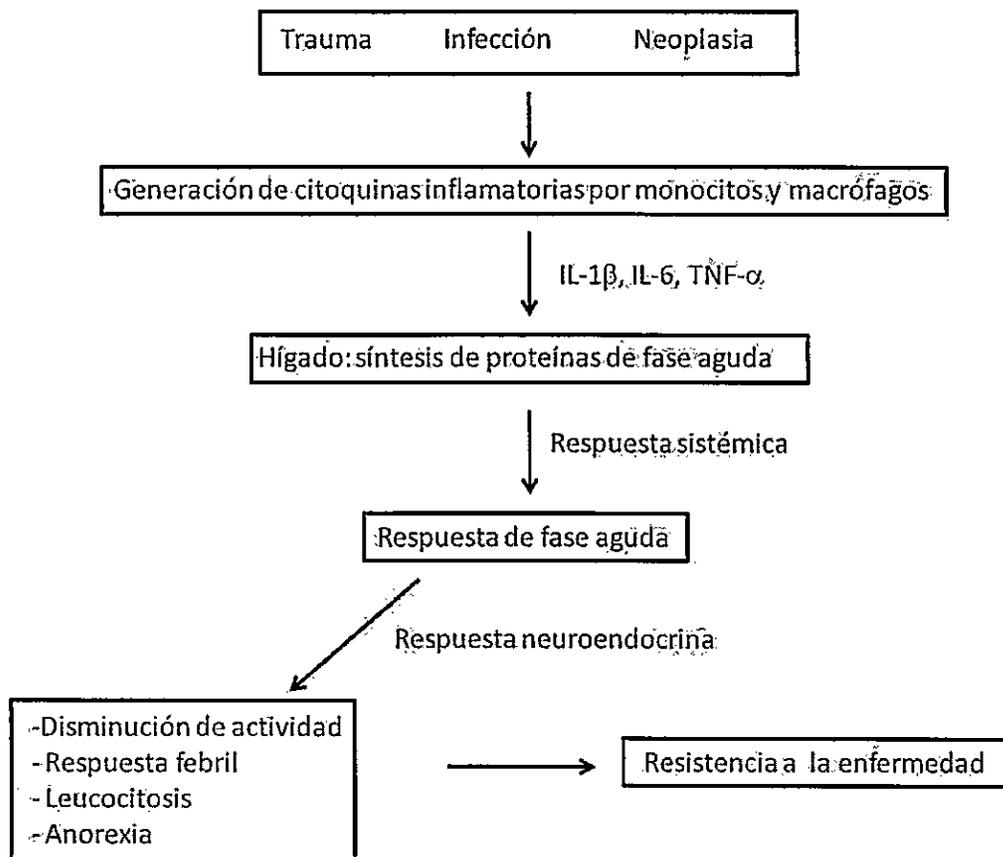
Los organismos se encuentran expuestos a una gran diversidad de patógenos capaces de disminuir su supervivencia y fertilidad. Sin embargo, los animales se protegen de estos patógenos mediante el Sistema Inmune, constituido por una maquinaria de defensa que incluye desde barreras físicas hasta un sistema de protección patógeno-específico (Delves y col., 2008). El sistema inmune de vertebrados es una compleja red de órganos que contienen células que reconocen y destruyen sustancias extrañas en el cuerpo (Delves y col., 2008). En vertebrados, el sistema inmune comprende una respuesta inmune innata o natural y una respuesta inmune adquirida o adaptativa (Muchlenbein, 2010; Fig. 1). La respuesta innata, es una respuesta rápida y no específica, e incluye dos partes: (i) una respuesta humoral, que involucra sustancias (e.g. proteínas de choque térmico, transferina, interferon) que interfieren con el crecimiento de los patógenos o los agrupa para que puedan ser eliminados, y (ii) una respuesta celular, llevada a cabo por células fagocíticas (e.g. neutrófilos, macrófagos, basófilos) que ingieren y degradan a los patógenos (Delves y col., 2008). La respuesta inmune adquirida, es una respuesta lenta, patógeno-específica por lo que requiere activación. Así, el sistema adquirido constituye una línea adicional de defensa, debido a que permite una respuesta secundaria rápida durante una exposición subsecuente al mismo patógeno.



**Figura 1.** Principales mecanismos inmunes de vertebrados. Modificado de Demas y col (2011).

La primera línea de defensa frente a una infección es la respuesta innata. La respuesta de fase aguda (APR de su sigla en inglés), es un tipo de respuesta innata, y consiste en una reacción sistémica prominente del organismo a perturbaciones de su homeostasis causadas por infección, lesiones de tejidos, trauma, crecimiento neoplásico, o trastornos inmunológicos (Gordon y Koy, 1985; Gruys y col., 1999). Los macrófagos y otros tipos celulares (neutrófilos, basófilos, células dendríticas), sintetizan citoquinas proinflamatorias (e.g., interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); Baumann y Gauldie, 1994) que actúan en el tejido periférico y en el

sistema nervioso central para promover una respuesta fisiológica y conductual (Baumann y Gauldie, 1994; Fig. 2). La respuesta fisiológica incluye cambios en la síntesis de enzimas hepáticas (Cooper, 1979; Blackburn, 1994), activación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) y un incremento de la temperatura corporal (respuesta febril; Best y Schwartz, 2014; Kluger y Rothenburg, 1979;), todos cambios asociados a un incremento en la defensa del hospedero.



**Figura 2.** Respuesta de Fase Aguda. Frente a una infección o lesión, las células inmunes sintetizan citoquinas pro-inflamatorias para promover una respuesta fisiológica y conductual. Modificado de Cray y col. (2009).

La conducta de enfermedad es un comportamiento observado durante el transcurso de una enfermedad, que parece estar mediado por la actividad de las citoquinas, destinada a apoyar los cambios metabólicos y fisiológicos que se producen en el animal enfermo y que ayudan a enfrentar al patógeno (Aubert, 1999; Hart, 1988;). Dentro de esta respuesta conductual se encuentra una reducción del apetito o anorexia (Aubert, 1999; Hart, 1988), como una manera de reducir la ingestión de algunos micronutrientes (e.g hierro y zinc) necesarios para la multiplicación de los patógenos, disminución en la actividad general e incremento del tiempo estando agazapado o dormido (Aubert, 1999; Hart, 1988), lo que contribuiría a conservar energía y promover la respuesta febril (Aubert, 1999; Hart, 1988).

Los tejidos y estructuras del sistema inmune (órganos linfoides) se encuentran conectados unos con otros mediante el sistema linfático, el cual contiene y transporta a los linfocitos a través del cuerpo dónde se encuentra el patógeno (Janeway y col., 2005). En vertebrados existen dos tipos de órganos linfoides primarios y secundarios. Los órganos primarios, incluyen a la médula ósea en mamíferos y otros vertebrados y la Bursa de Fabricio en aves. Estos órganos son la fuente de las células progenitoras de todos los tejidos linfoides y de un subtipo específico de linfocitos, las células B. Los órganos linfoides secundario están constituidos por el timo, en donde los linfocitos que migran de la médula ósea se desarrollan en un segundo tipo de linfocito, las células T (Janeway y col., 2005). Las células B y T desempeñan diferentes roles en la respuesta inmune, sin embargo pueden actuar en conjunto e influir en otras funciones (Fig. 1). La parte de la respuesta inmune que incluye a las células B es llamada humoral, debido a

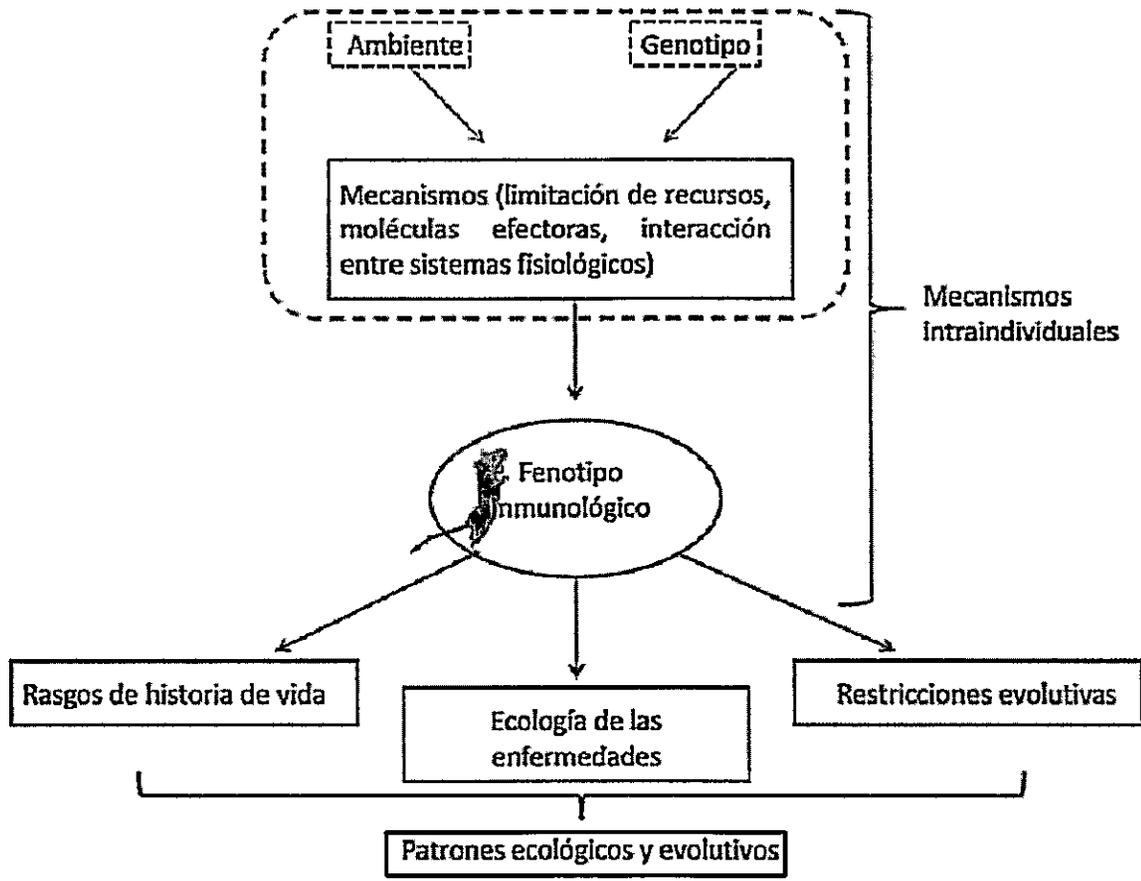
que toma lugar en los fluidos corporales. La parte de la respuesta inmune que incluye a las células T es llamada celular, ya que su acción se desarrolla de manera directa entre la célula T y el antígeno (Delves y col., 2008). Las células B producen anticuerpos que pertenecen a un tipo especial de proteínas sanguíneas, llamadas inmunoglobulinas (Ig), las cuales neutralizan los patógenos y sus productos (Delves y col., 2008). Las células T no producen anticuerpos, más bien requieren de contacto directo con las células infectadas para poder eliminarlas. En el timo, existen dos clases principales de células T: células T auxiliares (helper T cells) y células T citotóxicas. Las primeras, secretan moléculas llamadas interleucinas (IL) que promueven el crecimiento de las células B y T. Las segundas, destruyen células infectadas con virus y otros patógenos y también podrían destruir células cancerígenas. Las células T citotóxicas son también llamadas linfocitos supresores, debido a que regulan la respuesta inmune suprimiendo la función de las células ayudantes, de manera que el sistema inmune esté activo sólo cuando sea necesario (Janeway y col., 2005). Así, el sistema inmune es un sistema complejo que funciona de una manera coordinada para destruir distintos tipos de patógenos.

## **Integrando la inmunología y la ecológica: ecoinmunología**

El sistema inmune es una de las funciones fisiológicas más importantes, siendo crucial para la sobrevivencia de los individuos. Para esto, el sistema inmune actúa como una barrera a infecciones y enfermedades (Delves y col., 2008; Janeway y col., 2005), identificando amenazas y coordinando una respuesta eficiente (Delves y col., 2008; Janeway y col., 2005). Los estudios sobre el sistema inmune han sido centrales en el área de la medicina y ciencias de la vida (Silverstein, 1989), llevando a un gran conocimiento sobre los mecanismos moleculares y celulares de este sistema. Sin embargo, a pesar de los avances realizados de los estudios relacionados con los mecanismos inmunes, el conocimiento de cómo los procesos ecológicos y dinámicas evolutivas moldean el sistema inmune aún es escaso.

A mediados de la década de 1990, surge la inmunología ecológica o ecoinmunología (Martin y col., 2011; Schulenburg y col., 2009), un área de investigación que integra las disciplinas de inmunología y ecología. La ecoinmunología sitúa en un contexto ecológico las bases moleculares y fisiológicas de la respuesta inmune (Sadd y Schmid-Hempel, 2008; Fig. 3), uniendo el estudio de los factores proximales (mecanismos inmunes) con las presiones selectivas que actúan sobre dichos mecanismos (Sorci y col., 2008); evaluando cómo la selección natural ha moldeado la inversión en la defensa inmune. De esta manera, el principal objetivo de la ecoinmunología es describir y explicar la variación natural observada en la función inmune (Sheldon y Verhulst, 1996) y, específicamente, por qué y cómo factores bióticos y abióticos contribuyen a la variación inmune en organismos en estado natural. Así, la ecoinmunología tiene el potencial de clarificar cómo el genotipo y el ambiente conducen

a un fenotipo inmunológico en organismos de vida libre y cómo estos fenotipos se relacionan con patrones a un nivel ecológico y evolutivo (Fig. 3).



**Figura 3.** El estudio del fenotipo inmunológico permite tener una mejor comprensión de los patrones observados en ecología y evolución. Las bases moleculares y fisiológicas de la respuesta inmune son el resultado del ambiente y el genotipo que median la expresión intraindividual de los rasgos inmunológicos. Modificado de Downs y col. (2014).

El estado actual de la ecoinmunología es el resultado de más de 30 años de investigación estimulada fuertemente por la proposición de la hipótesis de hándicap de inmunocompetencia (ICHH; Folstad y Karter, 1992), y luego reconocida años más tarde como disciplina con el trabajo de Sheldon y Verhulst (1996). En este último estudio, los autores proponen a los costos fisiológicos y a la asignación de recursos como las principales causas de la variación observada en la función inmune. Desde entonces, los estudios realizados a la fecha han tenido como foco principal de investigación a los costos relacionados con la generación de una respuesta inmune, incluyendo a los factores ambientales como moduladores de la función inmune.

Así, desde la publicación de los trabajos pioneros de Folstad y Karter (1992) y, posteriormente, Sheldon y Verhulst (1996), el número de artículos relacionados con el área de la ecoinmunología ha incrementado uniformemente desde el año 2000 (Martin y col., 2011).

## **Variación de la función inmune**

### *La respuesta inmune en un contexto ecológico*

La aproximación tradicional al estudio de la interacción parásito-hospedero ha sido desde un contexto evolutivo, específicamente desde una mirada co-evolutiva (Flor, 1971; van Valen, 1973; Vermeij, 1994). En este tipo de interacciones, se distinguen tres componentes principales (Schmid-Hempel, 2011): 1) virulencia, 2) infectividad y 3) resistencia del hospedero. Según la aproximación co-evolutiva al estudio de la interacción parásito-hospedero, cualquier cambio observado en la virulencia, infectividad o resistencia, sería el resultado de presiones selectivas mutuas entre

parásitos y hospederos (Bull, 1994; Frank, 1996; Kraaijeveld y col., 1998). Esto involucra que la interacción permanecería fija en una escala de tiempo ecológica, sin tomar en cuenta el efecto de las condiciones ambientales experimentadas por los individuos a lo largo de la vida.

Debido a que la asignación de recursos se encuentra limitada por el balance energético diario del animal, los recursos son asignados de manera diferencial a cada función vital (Buckley y col., 2014; Weiner, 1992). Por lo tanto, bajo la asignación de recursos es realizada de acuerdo al estado de vida en que se encuentra el organismo (Buckley y col., 2014), afectando los distintos componentes de la interacción parasito-hospedero. Así, por ejemplo, bajo condiciones con limitación de energía, un animal que se enfrenta a una enfermedad asignará menos recursos a la resistencia a esa infección, comparado con animales en condiciones menos limitantes, siendo menor la eficiencia de la respuesta inmune del hospedero. De esta manera, la asignación óptima de recursos a la función inmune (Lochmiller y Deerenberg, 2000; Norris y Evans, 2000; Sheldon y Verhulst, 1996), estaría influenciada por factores ambientales (Catalan y col, 2011; Cichon y col., 2002; Demas y col., 2011; King y col., 2013), siendo la temperatura ambiental uno de las fundamentales.

#### *Costos y compromisos de la respuesta inmune*

Bajo el principio de la asignación, cuando los recursos son finitos la expresión de todos los rasgos en un individuo no pueden ser maximizados al mismo tiempo (Stearns, 1992; Weiner, 1992), observándose una correlación negativa entre rasgos que comparten recursos en común (Stearns, 1992).

El sistema inmune es un sistema esencial para los organismos. Su correcto funcionamiento se relaciona con un aumento en la probabilidad de supervivencia de los individuos y una mejor condición corporal, dos componentes relacionadas con la adecuación biológica (Begon, 2006; Fitze y col., 2004; Møller y col., 1990;). Sin embargo, el sistema inmune involucra procesos fisiológicos costosos (e.g. Martel y col., 2014, Martin y col., 2003; Norris y Evans, 2000; Sheldon y Verhulst, 1996) y cuando los recursos son limitados, la función inmune puede verse comprometida por otras funciones biológicas (Demas y col., 2011; Iseri y Klasing, 2013; Klasing y Leschinsky, 1999; Lochmiller y Deerenberg, 2000; Norris y Evans, 2000). En este sentido, se ha observado la existencia de compromisos entre la función inmune y el crecimiento (Brommer, 2004; Brzęk y Konarzewski, 2007; Soler y col., 2003), reproducción (Bonneaud y col., 2003; Gustafsson y col., 1994; Ilmonen y col., 2000; Moreno y col., 1999; Nordling y col., 1998; Siva-Jothy y col., 1998; Veiga y col., 1998) o termorregulación (King y Swanson, 2013; Cichon y col., 2002). Por otro lado, la activación del sistema inmune involucra costos energéticos (Catalan y col., 2011; Demas y col., 1997; Freitak y col., 2003; Martin y col., 2003). Por ejemplo, se ha observado que ratones (*Mus musculus*) inmunizados con hemocianina de *Megathura crenulata* (KLH) presentan un mayor consumo de oxígeno que ratones inyectados con suero salino (Demas y col., 1997). De esta manera, la asignación de recursos a la defensa inmune podría estar sujeta a una optimización entre los costos y los beneficios, como resultado de la selección natural (Sorci y col., 2008).

Recientemente, estudios de costos y compromisos de la inmunidad durante el desarrollo de los individuos han centrado la atención, ya que es durante la ontogenia de

un individuo que los compromisos pueden ser especialmente importantes, moldeando el fenotipo de un individuo en desarrollo de una manera irreversible (Lidstrom, 1999). En particular, los procesos que ocurren en etapas tempranas del desarrollo determinan la edad y el tamaño alcanzado durante la madurez sexual (Stearns, 1992). Así, y debido a que durante el desarrollo se requieren recursos para el crecimiento somático (Stearns, 1992), una elevada inversión de recursos a la defensa inmune durante la fase de desarrollo puede ser perjudicial a largo plazo, en términos del tamaño y edad de madurez sexual (Stearns, 1992). De acuerdo a esto último se ha reportado que el crecimiento sufre un retardo como resultado de la activación del sistema inmune en individuos en desarrollo en endotermos (Brommer, 2004, Fair y col., 1999). Sin embargo, la magnitud de la respuesta inmune y los costos asociados podrían estar asociados con las condiciones ambientales experimentadas por los individuos en desarrollo. Por ejemplo, Brzek y Konarzewski (2007) demostraron que los costos relativos de la función inmune en polluelos de la golodrina ribereña (*Riparia riparia*) dependen de la disponibilidad de alimento. Esto se traduce en que la respuesta inmune y los costos asociados podrían ser modificados por factores externos. En este sentido, la respuesta inmune durante el desarrollo podría estar sujeta a condiciones ambientales, y su eficiencia dependería de la disponibilidad y calidad del alimento, fotoperíodo y/o temperatura ambiental, teniendo efectos inmediatos como en las condiciones futuras de los animales.

### **Modelo de estudio**

En esta tesis se evaluó el rol de la temperatura ambiental como un factor modulador de la respuesta inmune y de los costos asociados con la generación de una

respuesta inmune (Fig. 4). Además, se examinó la ontogenia de la función inmune y los efectos inmediatos (en supervivencia y crecimiento) y a largo plazo, asociados a la inversión en respuesta inmune durante el desarrollo (Fig. 4).

Se utilizó como modelo de estudio al roedor *Octodon degus* (Octodontidae; Hystricognathi). *Degus* es un roedor de hábitos diurnos que habita la zona centro-norte de Chile (Woods y Boraker, 1975). Esta especie enfrenta frecuentemente variaciones estacionales en las condiciones climáticas (Meserve y col., 1984). Por otra parte, *O. degus* es un roedor precocial social (Fulk, 1976; Yáñez, 1976), donde un grupo compuesto de machos y hembras comparten un sistema de madrigueras (Ebensperger y col., 2004; Hayer y col., 2009) y crianza comunal (Ebensperger y col., 2004; Hayer y col., 2009). Su carácter social y la presencia de crianza comunal se relacionaría con un incremento en la probabilidad de contraer enfermedades, debido al aumento en la transmisión de parásitos y patógenos (Begon, 2006; Cremer y col., 2007). En este sentido, la crianza comunal (Ebensperger y col., 2004; Hayer y col., 2009) aumentaría exposición de las crías a la presencia de patógenos y parásitos, debido al contacto físico y uso compartido del espacio con individuos adultos. De esta manera, mantener una inmunocompetencia eficiente desde los primeros días de vida aumenta las probabilidades de supervivencia.

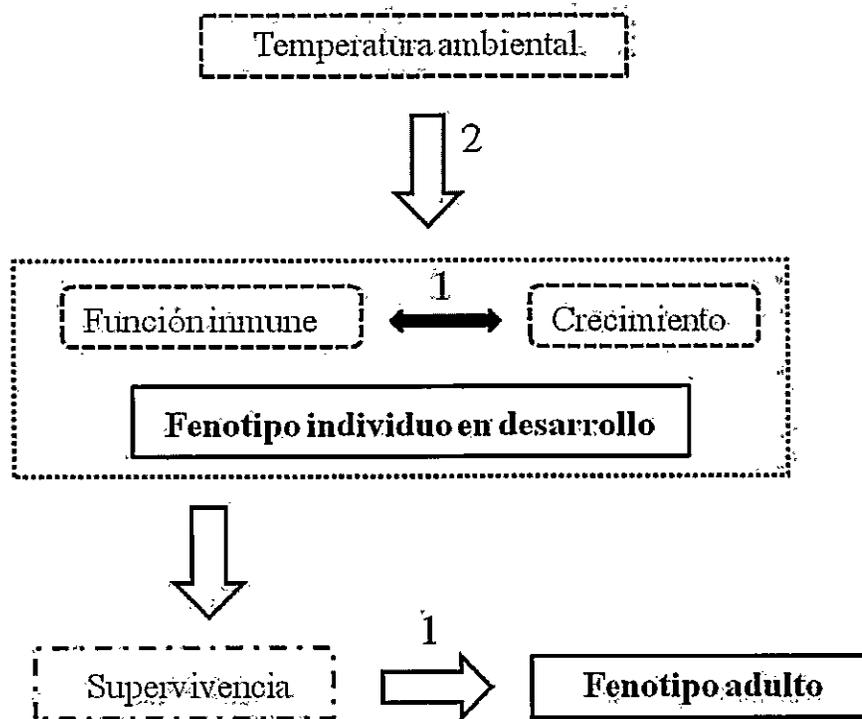
Los estudios ecoinmunológicos se han enfocado en el desarrollo de la función inmune de especies altriciales, como ratas y ratones (Kovarik y Siegrist, 1997; Morein y col., 2002; Sun y col., 2003), resultando en una amplia información del desarrollo de la función inmune de especies altriciales. *Degus* es un roedor precocial, donde las crías nacen en un estado adelantado de desarrollo que se caracteriza por un consumo de



alimento sólido a los pocos días de nacer y con la capacidad termoregulatoria madura a la segunda semana después de nacer (Ardiles y col., 2013; Reynolds y Wright, 1979). Por otra parte, se ha observado que esta especie presenta inmunidad pasiva de anticuerpos específicos antes y después de nacer (Becker y col., 2007).

Se ha documentado que la inversión de recursos en la respuesta inmune puede afectar de manera negativa el crecimiento, supervivencia y reproducción (ref) debido a los costos asociados a la función inmune. Sin embargo, estudios previos realizados en *degus* han documentado que esta especie utilizaría una estrategia de “todo o nada”, lo que se traduciría en la ausencia de efectos negativos de la inversión de recursos en la función inmune sobre la reproducción y supervivencia, tanto de la descendencia y como de hembras (Ebensperger y col., 2015). Pero, los posibles efectos negativos de la generación de una respuesta inmune sobre el crecimiento y supervivencia de crías no han sido explorados en esta especie.

De esta manera, *O. degus* representa un buen modelo de estudio permitiendo tener además, una completa visión del espectro altricial-precocial en el desarrollo de la función inmune. Para evaluar el desempeño de la respuesta inmune producida por un desafío, se seleccionaron componentes de la respuesta inmune innata como, niveles de la citoquina interleucina 1- $\beta$ , respuesta febril y conducta asociada a enfermedad.



**Figura 4.** Esquema de la interacción entre la temperatura ambiental, respuesta inmune y ontogenia de la función inmune en individuos en desarrollo, evaluando los posibles costos de la respuesta inmune y los efectos a largo plazo de la inversión de recursos en la respuesta inmune durante el desarrollo. Los números hacen referencia a los capítulos contenidos en esta tesis.

## REFERENCIAS

- Ardiles A. O., Ewer J., Acosta M. L., Kirkwood A., Martinez A. D., Ebensperger L. A., et al. 2013. *Octodon degus* (Molina 1782): a model in comparative biology and biomedicine. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2013, 312–318.
- Aubert A. 1999. Sickness and behaviour in animals: a motivational perspective. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23:1029–36.
- Baumann H, Gauldie J.1994. The acute phase response. *Immunol .Today* 15:74–80.
- Begon M, Townsend CR, Harper JL. 2006. *Ecology: From Individuals to Ecosystems* Blackwell Pub, 4th ed.
- Best EV, Schwartz MD. 2014. Fever. *Evolu Med Pub Health* 1:92.
- Blackburn, W.D., 1994. Validity of acute phase proteins as markers of disease activity *J Rheumatol* 21: 9-13
- Bonneaud C, Mazuc J, Gonzalez G, Haussy C, Chastel O, Faivre B, Sorci G. 2003. Assessing the cost of mounting an immune response. *Am. Nat.* 161:367–379.
- Brommer JE .2004. Immunocompetence and its costs during development: an experimental study in blue tit nestlings. *Proc. R. Soc. B* 271: S110–S113.
- Brzek P, Konarzewski M. 2007. Relationship between avian growth rate and immune response depends on food availability. *J. Exp. Biol.* 210: 2361-236.
- Buckley LB, Nufio CR, Kingsolver JG. 2014. Phenotypic clines, energy balances and ecological responses to climate change. *J. Anim. Ecol.* 83: 41-50.
- Bull JJ .1994. Perspective: virulence. *Evolution* 48: 1423-1437.
- Catalán TP, Wozniak A, Niemeyer HM, Kalergis AM, Bozinovic F. 2012. Interplay between thermal and immune ecology: Effect of environmental temperature on insect immune response and energetic costs after an immune challenge. *J. Ins. Physiol.* 58: 310–317.

- Cichon M, Chadzin M, Ksia A, Konarzewski M. 2002. Delayed effects of cold stress on immune response in laboratory mice. *Proc. R. Soc. Lond. B* 269: 1493–1497.
- Cray C, Zaias J, Altman NH. 2009. Acute Phase Response in Animals: A Review. *Comparative Medicine* 59: 517–526.
- Cremer S, Armitage SAO, Schmid-Hempel P. 2007. Social immunity, *Curr. Biol.* 17: R693–R702.
- Cooper EH, Ward AH. 1979. Acute phase reactant protein as aids to monitoring disease. *Invest. Cell Pathol* 2: 293-301.
- Delves P, Martin S, Burton D, Roitt I. 2008. *Roitt Immunología. Fundamentos.* Editorial Médica Panamericana.
- Demas GE, Chefer V, Talan M I, Nelson RJ. 1997. Metabolic costs of mounting an antigen-stimulated immune response in adult and aged C57BL/6J mice. *Am. J. Physiol. —Reg. Integ. Comp. Physiol.* 42:R1631 R1637.
- Demas G, Greives T, Chester E, French S. 2011. Ed. Demas G, Nelson R. pp 259-296, *Ecoimmunology*, Oxford University Press, Oxford.
- Demas GR , Zysling DA, Beechler BR, Muehlenbein MP, French SS. 2011. Beyond phytohaemagglutinin: assessing vertebrate immune function across ecological contexts. *J. Anim. Ecol.* 80: 710–730.
- Downs CJ, Adelman JS, Demas GE. 2014. Mechanisms and Methods in Ecoimmunology: Integrating Within-Organism and Between-Organism Processes. *Integr. Comp. Biol.*54: 340-352
- Ebensperger LA, Hurtado MJ, Soto-Gamboa M, Lacey EA, Chang AT. 2004. Communal nesting and kinship in degus (*Octodon degus*), *Naturwissenschaften* 91: 391–395.
- Ebensperger LA, Leon C, Ramirez-Estrada J, Abades S, Hayes LD, Novoa E, Salazar F, Bhattacharjee J, Becker MI. 2015. Immunocompetence of breeding females is sensitive to cortisol levels but not to communal rearing in the degu (*Octodon degus*). *Physiol Behav.* 140: 61-70.

- Fair JM, Hansen ES, Ricklefs RE. 1999. Growth, developmental stability and immune response in juvenile Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). Proc. R. Soc. B 266:1735–1742.
- Fitze PS, Tschirren B, Richner H. 2004. Life history and fitness consequences of ectoparasites. J. Anim. Ecol. 73:216-226.
- Flor HH. 1971. Current status of gene-for-gene concept. Annu. Rev. Phytopathol. 9: 275-296.
- Folstad I, Karter AJ. 1992. Parasites, bright males, and the immunocompetence handicap. Am. Nat. 139: 603–622.
- Frank SA. 1996. Models of parasite virulence. Q. Rev. Biol. 71:37-78.
- Freitak D, Ots I, Vanatoa A, Horak P. 2003. Immune response is energetically costly in white cabbage butterfly pupae. Proc. R. Soc. L. 270: S220-S222.
- Fulk GW. 1976. Notes on the activity, reproduction, and social behavior of *Octodon degus*. J. Mammal. 57:495–505.
- Gordon, AH, Koy A. 1985. The Acute Phase Response to Injury and Infection. The Roles of Interleukin 1 and Other Mediators. Elsevier, Amsterdam, ISBN: 0444-80648-2.
- Gruys E, Toussaint MJM, Landman WJM, Tivapasi M, Chamanza R, van Veen L. 1999. Infection, Inflammation and Stress Inhibit Growth. Mechanisms and Non-specific Assessment of the Processes by Acute Phase Proteins. En: Wensing, T. (Ed.), Production Diseases in Farm Animals. 10th International Conference, Wageningen Press, Wageningen, p.72-87. ISBN: 90-74134-60-2.
- Gustafsson L, Nordling D, Andersson MS, Sheldon B, Qvarnstrom A. 1994. Infectious diseases, reproductive effort and the cost of reproduction in birds. Phil. Trans. R. Soc. B 346: 323-331.
- Hart BL. 1988. Biological basis of the behavior of sick animals. Neurosci. Biobehav. Rev. 12:123–37.

- Hayes LD, Chesh AS, Castro RA, Ortiz Tolhuysen L, Burger JR, Bhattacharjee J, Ebersperger LA. 2009. Fitness consequences of group living in the degu (*Octodon degus*), a plural breeder rodent with communal care. *Anim. Behav.* 78: 131–139.
- Ilmonen P, Taarna T, Hasselquist D. 2000. Experimentally activated immune defence in female pied flycatchers results in reduced breeding success. *Proc. R. Soc. Lond. B* 267: 663–670.
- Iseri VJ, Klasing KC. 2013. Dynamics of the systemic components of the chicken (*Gallus gallus domesticus*) immune system following activation by *Escherichia coli*: implications for the costs of immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 40:248-57.
- King MO, Swanson DL. 2013. Activation of the immune system incurs energetic costs but has no effect on the thermogenic performance of house sparrows during acute cold challenge. *J. Exp. Biol.* 216: 2097-2102.
- Klasing KC, Leshchinsky TV. 1999. Functions, costs, and benefits of the immune system during development and growth. *Ostrich.* 69:2817–32.
- Kovarik J, Siegrist CA. 1998. Immunity in early life. *Immunol. Today* 19: 150-152.
- Kraaijeveld AR, Van Alphen JJM, Godfray HCJ. 1998. The coevolution of host resistance and parasitoid virulence. *Parasitology* 116: S29-S4.
- Lindström J. 1999. Early development and fitness in birds and mammals. *TREE* 14: 343-348.
- Lochmiller RL, Deerenberg C. 2000. Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos* 88: 87–98.
- Martel S, Riquelme SA, Kalergis AM, Bozinovic F. 2014. Dietary effects on immunological energetic in mice. *J. Comp. Physiol. B.* 184: 937-944.
- Martin II LB, Scheuerlein A, Wikelski M. 2003. Immune activity elevates energy expenditure of house sparrows: a link between direct and indirect costs? *Proc.R. Soc. B* 270: 153-158.

- Martin LB, Hawley DM, Ardia DR. 2011. An introduction to ecological immunology. *Func. Ecol.* 25:1-4.
- Meserve PL, Martin RE, Rodriguez JM. 1984. Comparative ecology of the caviomorph rodent *Octodon degus* in two Chilean mediterranean-type communities. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 57: 79-89.
- Møller AP, Allander K, Dufva R. 1990. Fitness effects of parasites on passerine birds: a review. In: Population biology of passerine birds (Blondel J, Gosler A, Lebreton JD, McCleery R, eds. Berlin: Springer-Verlag; 269-280.
- Morein B, Abusugra I, Blomqvist G. 2002. Immunity in neonates. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 87: 207-213.
- Moreno J, Sanz Juan J, Arriero E. 1999. Reproductive effort and T-lymphocyte cell-mediated immunocompetence in female pied flycatchers *Ficedula hypoleuca*. *Proc. R. Soc. Lond. B* 266: 1105-1109.
- Muchlenbein MP. 2010. Evolutionary medicine, immunity and infectious diseases. *Human Evolutionary Biology* (ed. M.P. Muehlenbein), pp. 351-377. Cambridge University Press, New York, NY.
- Nordling D, Andersson M, Zohari S, Gustafsson L. 1998 Reproductive effort reduces specific immune response and parasite resistance. *Proc. R. Soc. B* 265:1291-1298.
- Norris K, Evans MR. 2000. Ecological immunology: life history trade-offs and immune defense in birds. *Behav. Ecol.* 11:19-26.
- Reynolds TJ, Wright JW. 1979. Early postnatal physical and behavioural development of degus (*Octodon degus*). *Lab. Anim.* 13: 93-99.
- Sadd BM, Schmid-Hempel P. 2008. Principles of ecological immunology. *Evolutionary Applications* 2: 113-121.
- Schmid-Hempel P. 2011. *Evolutionary Parasitology: The Integrated Study of Infections, Immunology, Ecology, and Genetics*. Oxford University Press Inc., New York.

- Schulenburg H, Kurtz J, Moret Y, Siva-Jothy M. 2009. Introduction. *Ecological immunology*. *Phil. Trans. R. Soc. B* 364: 3-14.
- Sheldon BC, Verhulst S. 1996. Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *TREE* 11: 317-321.
- Silverstein AM. 1989. *A History of Immunology*. Academic Press, San Diego, CA.
- Siva-Jothy MT, Tsubaki Y, Hooper RE. 1998. Decreased immune response as a proximate cost of copulation and oviposition in a damselfly. *Physiol. Entomol.* 23: 274-277.
- Soler JJ, de Neve L, Perez-Contreras T, Soler M, Sorci G. 2003. Trade-off between immunocompetence and growth in magpies: an experimental study. *Proc. R. Soc. B* 270: 241-248.
- Sorci G, Boulinier T, Gauthier-Clerc M, Faivre B. 2008. The evolutionary ecology of the immune response. Ed. Thomas F, Guégan J-F, Renaud F. *Ecology and Evolution of Parasitism* pp 5-17. Oxford University Press, Oxford.
- Stearns SC. 1992. *The evolution of life histories*. Oxford University Press, Oxford.
- Sun CM, Fiette L, Tanguy M, Leclerc C, Lo-Man R. 2003. Ontogeny and innate properties of neonatal dendritic cells. *Blood* 102: 585-591.
- van Valen L. 1973. A new evolutionary law. *Evol. Theor.* 1:1-30.
- Veiga JP, Salvador A, Merino S, Puerta M. 1998. Reproductive effort affects immune response and parasite infection in a lizard: a phenotypic manipulation using testosterone. *Oikos* 82: 313-318.
- Vermeij GJ. 1994. The evolutionary interaction among species: selection, escalation and coevolution. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 25:219-236.
- Weiner J. 1992. Physiological limits to sustainable energy budgets in birds and mammals: ecological implications. *TREE* 7: 384-388.

Woods CA, Boraker DK. 1975. *Octodon degus*. Am. Soc. Mammal. Spec. Publ. 67:1-5

Yáñez JL. 1976. Ecología de *Octodon degus*. Tesis de Pregrado, Universidad de Chile, Santiago.

## II. Capítulo I:

---

**Desarrollo y costos de la respuesta inmune innata y efectos a largo plazo de un desafío inmune**

## RESUMEN

La resistencia contra los parásitos y patógenos es un proceso energéticamente costoso y un gran número de estudios han abordado los posibles compromisos entre la resistencia a infecciones y otros procesos demandantes de energía. Este compromiso puede ser particularmente importante en los organismos en desarrollo, debido a que se enfrentan a elevadas demandas energéticas asociados con el crecimiento. Sin embargo, poco se sabe sobre el desarrollo y los costos de la función inmune en los animales de vida libre, que enfrentan constantes cambios ambientales y por lo tanto, en la disponibilidad de recursos.

Por otra parte, los efectos de la respuesta inmune generada durante la ontogenia de un organismo tendrían una influencia mayor en el fenotipo del adulto y consecuentemente en la adecuación biológica. En este sentido, se ha observado que montar una respuesta inmune durante el desarrollo tiene efectos negativos sobre la estructuración del cerebro, la función inmune y aspectos morfológicos de los organismos adultos. De esta manera, es posible suponer que la generación de una respuesta inmune durante el desarrollo podría afectar el presupuesto energético de los organismos.

Así, los objetivos de este trabajo fueron: 1) evaluar las variaciones específicas en la generación de una respuesta inmune en función de las distintas etapas del desarrollo y los efectos sobre el crecimiento y la masa corporal de las crías, 2) determinar los posibles efectos de un desafío inmune realizado durante el desarrollo sobre la tasa metabólica basal una vez que los organismos han alcanzado una edad más avanzada.

Para el primer objetivo, evaluamos cambios en los niveles de la citoquina interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), cambios en la temperatura corporal, masa corporal y cambios en la conducta en crías de cuatro edades distintas (8, 15, 22 y 30 días) del roedor *Octodon degus* (Octodontidae; Hystricognathi), utilizando como antígeno lipopolisacárido (LPS). Nos enfocamos en el primer mes de vida, debido a que es la etapa en donde la potencial competencia entre el crecimiento y respuesta inmune sería particularmente importante. Para evaluar el segundo objetivo, estimamos la tasa metabólica basal, la masa corporal y el índice corporal de individuos juveniles (90 días de vida) que fueron inmunizados con LPS durante su desarrollo.

Observamos que los niveles de IL-1 $\beta$ , la temperatura corporal y la conducta asociados no fueron afectados por día en el cual se produce el desafío inmune. De igual manera, la ganancia de masa corporal como el índice corporal de las crías desafiadas no fueron afectadas por el día de desafío ni tampoco se observaron diferencias entre los individuos tratados con LPS y control. Estos resultados sugieren que en *O. degus*, la magnitud de la respuesta inmune innata no variaría en función de la edad, teniendo un nulo efecto sobre el crecimiento de las crías.

Por otra parte, la tasa metabólica basal, la masa corporal y el índice corporal de individuos juveniles (90 días) no fueron afectados por la generación de una respuesta inmune durante el desarrollo. De esta manera, es posible que tanto la tasa metabólica basal como la masa corporal de nuestra especie, no fuesen afectadas por desafíos inmunes realizados en el desarrollo, debido a que los recursos en los cuales crecieron las crías no fueron limitantes.

Así, los resultados sugieren que las variables ambientales experimentadas por los individuos en desarrollo podrían tener un fuerte efecto modulador de la función inmune, independiente de la edad en la cual se produce el desafío inmune.

## ABSTRACT

It is well known that resistance against parasites and pathogens is an energetically costly process, and several studies focus on the possible trade-off between resistance to infections and other energy demanding processes. This trade-off may be particularly important in developing organisms due to the high energy demands associated with growth. However, little is known about the development of immune function in free-living animals, that face constant environmental changes and therefore in the availability of resources.

The effects of the immune response mounted during the ontogeny of an organism, would have a greater influence on the adult phenotype and therefore in fitness. In this regard, it has been observed that mounting an immune response during development has negative effects on brain structure, immune response and morphological aspects of adult organisms. In this way, it is possible to assume that the generation of an immune response during the development might affect the energy budget of the individuals.

Thus, the objectives of this study were: 1) evaluate the specific variations in the immune response in terms of the different stages of development and the effects on growth and body mass of the offspring, 2) determining the possible effects of an immune challenge made during the development on the basal metabolic rate once the animals have reached a more advanced age. For the first objective, we assessed changes in levels of cytokine interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), changes in body temperature, body mass and behavioral changes in offspring of four different ages (8, 15, 22 and 30 days ) of the

rodent *Octodon degus* (Octodontidae; Hystricognathi), using as antigen lipopolysaccharide (LPS). We focused on the first month of life because it is the stage where potential competition between growth and immune response would be particularly important. To evaluate the second goal, we estimate the basal metabolic rate, body condition index and body juveniles (90 days old) that were immunized with LPS during its development.

We note that the levels of IL-1 $\beta$ , body temperature and behavior were unaffected by the day in which the immune challenge occurs. Similarly, the gains in body mass or body condition index of the challenged pups were not affected by the day of challenge, nor differences among individuals treated with LPS and control were observed. These results suggest that in *O. degus*, the magnitude of the innate immune response would not change in function of age, having a null effect on the growth of pups.

Basal metabolic rate, body condition index and body mass of juveniles were not affected by the generation of an immune response during development. Thus, it is possible that both the basal metabolic rate as the body mass of our species, were not affected by immune challenges, because the resources on which the animals grew were not limiting.

Thus, the results suggest that environmental variables experienced by individuals in development could have a strong immune modulatory effect, independent function of the age in which the immune challenge occurs.

## INTRODUCCIÓN

El sistema inmune está integrado por una red de órganos, tejidos, proteínas y células especializadas, cuya función es otorgar protección contra una diversidad de patógenos, tales como bacterias, virus y parásitos del ambiente (Delves y col., 2008; Janeway y col., 2005). La respuesta inmune es un rasgo estrechamente relacionado con la supervivencia de los organismos, por lo que se encuentra asociado con la adecuación biológica de los animales (Begon, 2006; Fitze y col., 2004; Møller y col., 1990). Diversos estudios han reportado que la generación de una respuesta inmune requiere de energía y nutrientes (e.g. Martin y col., 2003; Norris y Evans, 2000; Sheldon y Verhulst, 1996) y que bajo condiciones naturales con, limitación de recursos, la inversión energética en montar una respuesta inmune puede significar una menor cantidad de recursos para otras funciones biológicas como el crecimiento (Brommer, 2004; Brzęk y Konarzewski, 2007; Soler y col., 2003), reproducción (Bonneaud y col., 2003; Gustafsson y col., 1994; Ilmonen y col., 2000; Moreno y col., 1999; Nordling y col., 1998; Siva-Jothy y col., 1998; Veiga y col., 1998) o termorregulación (Cichon y col., 2002; King y Swanson, 2013). Es decir, el funcionamiento del sistema inmune podría comprometer otras funciones biológicas (Demas y Nelson, 1998; Ilmonen y col., 2003; Sheldon y Verhulst, 1996). Estos compromisos serían particularmente importantes en organismos que se encuentran en desarrollo, debido a que en esta etapa los organismos enfrentan elevadas demandas energéticas asociadas al crecimiento (Ricklefs y Wikelski, 2002), lo que podría reducir la cantidad de recursos disponibles para la función inmune.

### *Desarrollo y ontogenia del sistema inmune*

El sistema inmune no se encuentra completamente desarrollado, requiriendo de tiempo para ser completamente funcional en neonatos de mamífero (Adkins y col., 2004; Burl y col., 2011; Kovarik y Siegrist 1998; Reikie y col., 2012; Sun y col., 2003). Sin embargo, las crías de animales endotermos no se encuentran totalmente susceptibles a enfermedades debido a inmunidad pasiva (Hasselquist y Nilsson, 2009; Heller y col., 1990). Mediante este tipo de inmunidad, las madres transfieren anticuerpos a sus crías durante la gestación (Brambell y Rogers, 1970; Becker y col., 2007) y después del nacimiento, en los primeros días de lactancia (Ardia y col., 2011; Becker y col., 2007; Grindstaff, 2008). De esta manera, la contribución materna a la inmunidad de su descendencia, durante los primeros días de vida, es de vital importancia para la sobrevivencia de las crías (Brambell y Rogers, 1970). No obstante, la protección de los individuos en desarrollo no dependería en su totalidad de la inmunidad pasiva. Diversos estudios señalan que la inmunidad innata se encuentra presente desde los primeros momentos del nacimiento (Firth y col., 2005; Klasing y Leshchinsky, 1999; Levy, 2007; Palacios y col., 2009), pero su funcionamiento no es a los niveles observado en adultos. Así, los componentes de la inmunidad innata aparecerían temprano en el desarrollo de vertebrados y jugarían un rol esencial en la protección contra patógenos (Franceschi y col., 2000; Palacios y col., 2009) mientras se desarrollan la especificidad y memoria asociada a la respuesta inmune adaptativa.

Los estudios del desarrollo de la función inmune bajo un contexto ecológico en vertebrados son escasos (Adkins y col., 2004; Killpack y col., 2013; Palacios y col., 2009; Pilorz y col., 2005; Stambaugh y col., 2011). Debido a que los organismos en

desarrollo utilizan la energía principalmente para crecimiento y mantención (Ricklefs y Wikelski, 2002), la generación de una respuesta inmune significaría una menor disponibilidad de recursos para el crecimiento. Diversos estudios han documentado que las infecciones naturales o inmunizaciones experimentales, tienen un efecto negativo sobre el crecimiento de individuos en desarrollo (Brommer, 2004; Fair y col., 1999; Klasing y col., 1987; Soler y col., 2003). Por ejemplo, se ha demostrado que un desafío inmune en polluelos de gallinas (*Gallus gallus*) y codornices (*Coturnix japonica*) se encuentra acompañado de una reducción de las proteínas plasmáticas relacionadas con el crecimiento (Fair y col., 1999; Klasing y Leshchinsky, 1999). Por otra parte, se ha reportado que la generación de una respuesta inmune afecta la tasa de crecimiento y la ganancia de masa corporal en polluelos de *Cyanistes caeruleus* (Brommer, 2004). Se ha observado que líneas de polluelos de *G. gallus* seleccionados artificialmente para tener altas tasas de crecimiento son más susceptibles a patógenos (Mangel y Stamps, 2001). En ratas, la administración de LPS durante el desarrollo produce una reducción de la masa corporal, independiente de la disponibilidad de alimento (Raina y col., 2000)

Así, los estudios realizados hasta la fecha han demostrado que organismos que se encuentran en desarrollo son capaces de generar una respuesta inmune a pesar de no contar con un sistema inmune completamente desarrollado, y que esta respuesta afectaría negativamente el crecimiento de organismos endotermos (Brommer, 2004; Klasing y Leshchinsky, 1999; Lochmiller y Deerenberg, 2000). Sin embargo, la mayoría de estos estudios han evaluado la función inmune y los costos asociados, en una edad específica del desarrollo (e.g. 12 días de vida) en lugar de evaluar toda la etapa ontogénica. De acuerdo a lo expuesto anteriormente, en aves se ha demostrado que el

desarrollo de la función inmune innata presenta un patrón de desarrollo dependiente de la edad, donde los individuos que se encuentran cercano al período de emplumaje (día 18 de vida) presentan un mayor desarrollo de la función inmune innata, comparado con polluelos en los primeros días de vida (Palacios y col., 2008; Stambaugh y col., 2011). Mientras que en ratones, se ha observado un patrón similar, donde el desarrollo de las células denticricas aumenta con la edad, alcanzando el nivel observado en adultos a los 7 días después de nacer, observándose una producción eficiente de interleucina-1 a esa edad (Sun y col., 2003). En esta línea, es posible esperar que los efectos negativos de la respuesta inmune sobre el crecimiento serían más pronunciados una vez que las crías se acercan al período de destete o se encuentran cerca de la etapa de emplumaje (en aves) debido al mayor nivel de desarrollo de este sistema. Por lo tanto, es esperable que los efectos negativos de la respuesta inmune sobre el crecimiento y la masa corporal presenten un incremento en función de la edad. Sin embargo, no existen estudios que hayan evaluado el desarrollo de la función inmune innata y los posibles efectos negativos sobre el crecimiento, y ganancia de masa corporal, en términos de la edad, en organismos endotermos de vida libre que se enfrentan a una limitación de recursos.

#### *Efectos de un desafío inmune edad-dependiente sobre el fenotipo del adulto*

El desarrollo postnatal de los organismos es una etapa de la vida donde cualquier modificación del ambiente puede moldear el fenotipo del individuo en desarrollo de una manera irreversible y por tanto, influir de manera crucial en el fenotipo del adulto (Lidstrom, 1999; Monaghan y col., 2011). Esto debido a que la morfología, fisiología y conducta son producto tanto de las condiciones ambientales experimentadas durante el

desarrollo como en el estado adulto (Schneider, 1993). Efectivamente, se ha reportado que las condiciones experimentadas en el desarrollo temprano afectan desde rasgos conductuales (Haywood y Perrins, 1992) hasta incluso la respuesta inmune en el estado adulto (De Block y Stoks, 2008). Específicamente, cuando los individuos experimentan condiciones adversas durante su desarrollo, presentan una reducción en la ornamentación (Ohlsson, 2002), territorios de menor calidad (Haywood y Perrins, 1992) y disminución de la respuesta inmune cuando son adultos (De Block y Stoks, 2008).

Recientemente, los estudios acerca de la exposición de individuos en desarrollo a parásitos y sus posibles consecuencias en el fenotipo de los adultos han centrado una atención considerable (Buttler y McGraw, 2012; Galic y col., 2009). En este sentido, se ha sugerido que la generación de una respuesta inmune durante el desarrollo tendría efectos sobre distintos aspectos fenotípicos una vez que los organismos han alcanzado la adultez (Bland y col., 2010; Buttler y McGraw, 2012; Galic y col., 2009). Así, se ha observado en roedores que montar un respuesta inmune durante el desarrollo tiene efectos potencialmente negativos sobre la estructuración del cerebro (Bland y col., 2010), la respuesta inmune (Galic y col., 2009) y aspectos morfológicos (Buttler y McGraw 2012; Galic y col., 2009) de los organismos adultos.

Por otra parte, el estado específico del desarrollo en el cual ocurre la perturbación puede afectar de manera diferencial la expresión de características específicas en el estado adulto (Butler y col., 2011), debido que a los períodos del desarrollo que caracterizan el crecimiento y la inversión en la función inmune (Møller y Haussy, 2007) son únicos para cada edad (van der Ziel y Visser, 2001). De esta manera, es posible que las distintas etapas ontogenéticas puedan moldear diferencialmente el desarrollo de la

respuesta inmune. Por ejemplo, en ratas se ha demostrado que un desafío inmune ocurrido en el día siete después del nacimiento se traduce en adultos con una menor masa corporal (Galic y col., 2009), mientras que montar una respuesta inmune en el día 14 después del nacimiento produce una atenuación de la respuesta febril en adultos (Galic y col., 2009). Así, y debido a que la generación de una respuesta inmune es un proceso costoso en términos energéticos, produciendo un aumento de la tasa metabólica (Demas y col., 1997; Martin y col., 2003; Ots y col., 2001), es posible suponer que un desafío inmune realizado durante la fase de ontogenética pudiese alterar el presupuesto energético del individuo en desarrollo afectando el balance de energía una vez que el organismo ha alcanzado la adultez. Sin embargo, hasta donde sabemos solo unos pocos estudios realizados en ratas, han evaluado la influencia de la exposición a un antígeno durante el desarrollo sobre las funciones metabólicas de los adultos (Nilsson y col., 2002; Walker y col., 2006), no obstante, no existen estudios que evalúen los posibles efectos de la respuesta inmune generada en las distintas etapas del desarrollo sobre el presupuesto energético del adulto.

En este estudio se abordaron los siguientes objetivos: 1) determinar las variaciones específicas en la generación de una respuesta inmune en función de la distintas etapas del desarrollo y los efectos sobre el crecimiento y la masa corporal de las crías, y 2) determinar los posibles efectos de un desafío inmune realizado durante el desarrollo sobre la tasa metabólica basal (TMB) una vez que los organismos han alcanzado la etapa juvenil. Para esto utilizamos crías de *Octodon degus* (Octodontidae; Hystricognathi), un roedor precocial, social caviomorfo (Fulk, 1976; Yáñez, 1976), de

hábitos diurnos que habita la zona centro-norte de Chile (Woods y Boraker, 1975). Su carácter social lo hace un buen modelo de estudio, debido a que la sociabilidad aumenta la probabilidad de contraer enfermedades (Begon, 2006), por lo que mantener una buena inmunocompetencia aumenta las probabilidades de supervivencia. Además, al ser una especie precocial, las crías de degus nacen en un estado adelantado de desarrollo que se caracteriza por un consumo de alimento sólido a los pocos días de nacer y con la capacidad termoregulatoria madura a las pocas semanas (Reynolds y Wright, 1979; Ardiles y col., 2013). Optamos por utilizar lipopolisacárido (LPS) como antígeno debido a que ha mostrado ser un inmunógeno capaz de estimular la respuesta inmune en esta especie (Nemzek y col., 2003). El LPS es un componente de la pared celular de las bacterias Gram negativas (Nemzek y col., 2008), que induce una respuesta inflamatoria aguda (Nemzek y col., 2008).

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 1a Hipótesis

La magnitud de los costos energéticos asociados a la función inmune en mamíferos depende de la magnitud y eficiencia de la respuesta a un antígeno. Debido a que esta respuesta se incrementa a medida que avanza el desarrollo de los animales, los costos de la respuesta inmune serán mayores en crías que se encuentran en etapas más avanzadas del desarrollo (cerca de la etapa de destete).

### 1b. Predicciones específicas:

- Individuos inmunizados en los primeros días del desarrollo presentarán una mayor masa corporal, a la misma edad, que individuos inmunizados en los días cercanos al destete.
- En los últimos días del desarrollo, la magnitud de la respuesta inmune innata será mayor.
- Los individuos inmunizados en los primeros días del desarrollo presentarán una mejor condición corporal comparada con los individuos inmunizados durante los últimos días de desarrollo.

**1c. Objetivos específicos:**

- Evaluar el efecto de un desafío con LPS en diferentes etapas del desarrollo sobre la masa corporal y condición corporal de los individuos en desarrollo.
- Evaluar el efecto de las diferentes etapas del desarrollo sobre la respuesta a LPS (producción de citoquinas inflamatorias, fiebre y conducta de enfermedad).

## **2a. Hipótesis**

**En mamíferos, individuos adultos desafiados con un antígeno durante su ontogenia presentan gastos energéticos mayores en el estado adulto, debido a los efectos a largo plazo producidos por un desafío inmune realizado durante el desarrollo sobre el fenotipo del adulto, y a los costos energéticos de la respuesta inmune.**

## **2.b. Predicción específica:**

- La tasa metabólica basal será mayor en individuos adultos que fueron inmunizados durante el desarrollo.

## **2.c. Objetivos específicos:**

- Evaluar la tasa metabólica basal en individuos adultos inmunizados con LPS durante el desarrollo
- Comparar la tasa metabólica basal entre individuos adultos que fueron inmunizados con LPS en diferentes edades.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Captura y Mantenición de animales.*

Se capturaron 29 hembras y 25 machos adultos en el Fundo Rinconada de Maipú (33°23'S, 70°31'W; 30 km al oeste de Santiago), zona central de Chile, entre los meses de Abril y Mayo del 2014. Los animales se trasladaron al laboratorio, y se mantuvieron en cajas individuales, con un fotoperíodo 12L: 12O, a una temperatura ambiente de ( $T_a$ ) de  $22 \pm 2$  °C. El alimento consistió en alimento comercial de conejo (Champion) y fue proporcionado *ad libitum*.

Las hembras fueron monitoreadas para determinar la fecha de apertura de la vulva. Una vez abierta, las hembras fueron trasladadas a jaulas de apareamiento y mantenidas con el mismo macho por dos semanas. Una vez detectada la preñez, las hembras fueron trasladadas a jaulas individuales y pesadas diariamente y hacia el final del período de gestación (aproximadamente tres meses), las jaulas fueron chequeadas diariamente para detectar la presencia de crías. El día en que las crías fueron encontradas fue registrado como la fecha de nacimiento (día 0).

### *Calendario de inmunizaciones.*

Una vez comenzadas las pariciones, las crías dentro de cada camada fueron asignadas al azar a una de las cuatro condiciones experimentales. Así, un grupo fue inmunizado el día ocho (D8), otro grupo el día 15 (D15), un grupo el día 23 (D23) y finalmente el último grupo fue inmunizado el día 30 (D30) después del nacimiento. Se escogió este rango de edades, debido a que es el período en el cual las crías de degus muestran la mayor

ganancia de masa corporal (Reynolds y Wright, 1979), además de ser un período marcado por varios hitos importantes en el desarrollo de esta especie, tales como el consumo de alimento sólido después de la primera semana de vida, termoregulación cercano a la segunda semana de vida, mientras que el destete ocurre cercano a los 30 días de vida (Long y Ebensperger, 2010; Veloso, 1997; Veloso y Kenagy, 2005). Dentro de cada día de inmunización, un conjunto de individuos fue sometido a una inyección intraperitoneal de lipopolisacárido (LPS purificado de *Salmonella entérica*, Sigma; 500µg/kg) y otro grupo (control) fue inyectado con suero salino, en un volumen final de 200µl de solución.

Así, los tratamientos experimentales fueron: D8-LPS (n=7), D8-Suero Salino (n=7), D15-LPS (n=7), D15-Suero Salino (n=8), D22-LPS (n=8), D22-Suero Salino n=8), D30-LPS (n=11), D30-Suero Salino (n=8). De cada camada se eligió una cría para ser sometida al tratamiento con LPS o con suero salino. Además, un grupo de crías fue inmunizado con LPS (n=6) y otro con suero salino (n=6) a los 60 días post nacimiento, para evaluar la tasa metabólica de individuos que no fueron inmunizados en los primeros 30 días del desarrollo.

Las crías fueron mantenidas a 30°C desde el nacimiento hasta el día 40, separadas de la madre. Esta temperatura se encuentra dentro de la zona termoneutral de esta especie (Rosenmann, 1977), y por tanto no representa un desafío termoregulatorio para esta especie, y con fotoperíodo 12L:12O. Todas las inoculaciones se realizaron entre las 18:00 y 19:00 horas.

### *Masa corporal e índice corporal*

Se realizaron mediciones de masa corporal (mb), longitud total (Lt) y longitud de la cola (Lc) cada tres días, desde el día 3 post-nacimiento hasta el día 40 en una balanza digital ( $\pm 0.01\text{g}$ ). Luego del día 40, se volvieron a medir a los animales el día 90 post nacimiento. Las mediciones de longitud total (Lt) y longitud de la cola (Lc) se realizaron con una regla metálica ( $\pm 0.1\text{ cm}$ ) y siempre por el mismo observador. En cada sesión realizaron tres mediciones por animal y luego se calculó el promedio de cada medición. Para estimar el crecimiento relativo de las crías se dividió la masa corporal del día 40 por la masa de la primera medición (día 3), a manera de obtener el porcentaje de peso ganado (Soler y col., 2002)

El índice corporal (IC) se estimó como la razón entre el logaritmo de la masa corporal y el logaritmo de la longitud total ( $\log \text{mb} / \log \text{Lt}$ ). Laboche y col. (2014) argumentan que este índice predice la masa de grasa de los individuos, por lo tanto es un buen predictor de la condición corporal. Se calculó el IC a los 40 y 90 días post nacimiento.

### *Temperatura corporal*

La temperatura corporal se registró en la zona abdominal con un termómetro laser digital marca VeraTemp Sin-Contacto ( $\pm 0.2^\circ\text{C}$ ) antes de realizar las inoculaciones y 12, 15, 19 y 24 horas después de realizado el desafío.



*Niveles de interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ).*

Previo a las inoculaciones, a cada individuo se le extrajo una muestra de sangre de la vena safena lateral (UBC Animal Care Guidelines). A las 36 horas posteriores al desafío se extrajo una nueva muestra de sangre. Luego, estas muestras fueron centrifugadas por 6 min a 15000 rpm en una centrifuga Boeco M-240. Se extrajo el suero y se almacenó a -80°C para los análisis de los niveles de IL-1 $\beta$ . Los niveles de IL-1 $\beta$  fueron estimados en el suero mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Pocillos de placas de microtitulación de 96 pocillos fueron recubiertos durante la noche con un anticuerpo de captura monoclonal (Life Technologies). Las placas luego fueron bloqueadas por una hora con PBS que contenía 1% de BSA, 5% sacarosa y 0.05% NaN<sub>3</sub>. Las muestras de suero, fueron diluidas en PBS, y colocadas en los pocillos en duplicado e incubadas por 2h a temperatura ambiente. Luego, se agregaron anticuerpos de detección monoclonales (Life Technologies) y se incubó nuevamente por 2 h. A continuación, se agregó una solución (mezcla 1:1 de tetrametilbencidina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a cada pocillo, para luego detener la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N después de 20 min. La absorbancia de las placas se midió a 450 nm con una corrección de la longitud de onda a 540 nm usando un lector de placas de ELISA automatizado. Todos los lavados fueron hechos con PBS complementado con Tween 20 (0.05%). Finalmente, la absorbancia fue considerada como una medida de la concentración de IL-1 $\beta$ .

### *Conducta asociada a enfermedad*

Para evaluar la conducta de enfermedad correspondiente a la respuesta de fase aguda, se grabó a las crías en todos los tratamientos con una cámara grabadora (Handycam HDR CX220) montada en un trípode y localizada frente a las cajas. Las grabaciones duraron 30 min y se realizaron a las 15 h posteriores al desafío inmune. Se realizó un registro de las siguientes conductas: 1) *agazapado*, definido como el cuerpo encorvado hacia abajo con la cabeza baja y los pies escondidos (número de veces que el animal permanecía un período de 60 s agazapado), 2) *locomoción*, movimiento del animal de un extremo a otro de la jaula (número de veces), y 3) *ojos cerrados*, (número de veces que permanecía con los ojos cerrados por un período de 30 s). No existen registros previos de la existencia de la conducta de enfermedad en degus, ni tampoco que las crías de esta especie exhiban la conducta de agazapado, ojos cerrados o disminución en la locomoción como parte de la respuesta de fase aguda. Sin embargo, estas tres conductas han sido registradas como relevantes en el contexto de la respuesta de fase aguda en crías de *Cavia porcellus*, otro roedor caviomorfo (Hennesy y col., 2004).

### *Tasa metabólica basal (TMB)*

La tasa metabólica basal se estimó a través de la determinación del consumo de oxígeno ( $VO_2$ ) a los 90 días post nacimiento tanto en las crías inmunizadas dentro de los 30 días post nacimiento como aquellas tratadas a los 60 días. El  $VO_2$  se determinó en individuos postabsortivos en la fase de descanso del ritmo de actividad de la especie, mediante un sistema de respirometría de flujo abierto (Sable Systems) computarizado (Datacan V)

calibrado con una mezcla de oxígeno conocida (20%) y nitrógeno (80%) certificado por cromatografía (INDURA, Chile). Las determinaciones individuales se realizaron en cámaras de vidrio, en oscuridad, a temperatura ambiente correspondiente a termoneutralidad, i.e.,  $30 \pm 0.5$  °C (Novoa, 1993). Las cámaras metabólicas recibieron aire seco a una tasa de 750 ml/min desde un controlador de flujo (Sierra Instruments) para asegurar una mezcla adecuada en la cámara. El aire fue secado antes y después de la cámara y monitoreado cada 5 s mediante un analizador de oxígeno 1FC-1B (Sable System). El CO<sub>2</sub> se retiró antes de entrar al analizador de O<sub>2</sub> y el consumo de oxígeno se calculó utilizando la ecuación de Withers (1977: p 122):  $V.O_2 = [FR \cdot 60 \cdot (F_i O_2 - F_e O_2)] / (1 - F_i O_2)$ , donde FR es la tasa del flujo en ml/min después de la corrección STP, F<sub>i</sub> y F<sub>e</sub> son las fracciones de concentración de O<sub>2</sub> al ingreso y salida de la cámara metabólica, respectivamente.

#### *Análisis estadístico*

Previo a los análisis de los efectos de la edad y desafío inmune sobre las variables dependientes, se evaluó el efecto del sexo mediante un análisis de varianza (ANOVA) sobre todas las variables estudiadas de la crías a los 40 y 90 días posteriores al nacimiento. El efecto del día de desafío y el tipo de desafío sobre la masa se evaluó mediante un análisis de varianza de medidas repetidas de dos vías. Para evaluar las diferencias específicas entre tratamientos se utilizó el test *a posteriori* de Tukey. El índice corporal fue evaluado mediante un análisis de varianza de dos vías, donde día de desafío y tipo de desafío fueron las variables independientes. A los 90 días post nacimiento, se realizaron análisis de dos vías para evaluar el efecto del día de desafío y

tipo de desafío sobre la masa corporal e índice corporal. La temperatura corporal de los individuos en los cuatro tratamientos se comparó durante un período de 12 h después de cada inoculación. Para ello se utilizó un análisis de varianza de medidas repetidas de dos vías, con el efecto del día de desafío, tipo de desafío y el tiempo como los tratamientos. Para evaluar las diferencias específicas se utilizó el test a posteriori de *Tukey*. Los niveles de IL-1 $\beta$  fueron evaluados mediante un análisis de varianza de dos vías, siendo el día de desafío y del tipo de desafío las variables independientes. Se utilizó un test a posteriori de *Tukey* para las comparaciones específicas.

Las variables conductuales se analizaron mediante análisis paramétricos y no paramétricos. La locomoción fue evaluada mediante un análisis de varianza de dos vías, siendo el día de desafío y el tipo de desafío los factores. El número de veces que los animales permanecieron con los ojos cerrados, y el número de intervalos en estado agazapado fueron evaluado mediante la transformación de rangos alineados (ART; Wobbrock y col., 2001). Esta aproximación permite análisis factoriales de datos no paramétricos, incluyendo la interacción entre factores, primero aplicando una transformación que alinea los datos para cada efecto, y luego realiza un ranking de los datos. Los datos alineados y ranqueados son luego analizados mediante un análisis de varianza factorial. Para evaluar las diferencias específicas se utilizó el test a posteriori *Tukey*.

Para evaluar el efecto del desafío inmune y el día de desafío sobre la tasa metabólica basal (TMB) a los 90 días de vida, se realizó un análisis de covarianza de dos vías (ANCOVA), siendo la masa corporal la covariable. Para evaluar las diferencias

específicas se utilizó el test a posteriori de *Tukey*. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statistica 7 para Windows. Los resultados son presentados con el promedio  $\pm$  error estándar.

## RESULTADOS

De un total de nueve camadas y 58 crías analizadas, tres crías murieron por el desafío con LPS. Dos murieron en el tratamiento correspondiente al día 30, mientras que una cría murió el día 15 de tratamiento. Una cuarta cría murió a los 60 días por razones ajenas al tratamiento con LPS.

### *Análisis de Normalidad*

Previo a los análisis, se evaluó la normalidad de los datos, mediante de pruebas de Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors y Shapiro-Wilk. La masa corporal a los 40 y 90 días, tasa metabólica basal y niveles de IL-1 $\beta$  fueron transformando usando la función logaritmo para cumplir con el supuesto de normalidad. La temperatura corporal fue transformada usando la función inversa (1/X), mientras que las variables conductuales fueron evaluadas con estadística no paramétrica.

### *Desarrollo, masa corporal y desafío inmune*

A los 40 días posterior al nacimiento, no se encontraron diferencias significativas en el masa corporal entre crías machos y hembras (ANOVA:  $F_{5,46}=1.4$ ,  $p=0.24$ ), por lo tanto, no se realizaron análisis separado por sexo. El análisis de varianza de medidas repetidas, reveló un efecto del día de desafío sobre la masa corporal (ANOVA-MR:  $F_{3,44}=3.74$ ,  $p=0.018$ ; Tabla 1), donde las crías desafiadas el día 30 presentaron una menor masa al día 40 (Prueba de *Tukey*  $p<0.05$ ). Sin embargo, no se observó un efecto significativo del

tipo de desafío (ANOVA-MR:  $F_{1,44}=0.02$ ,  $p=0.89$ ) o la interacción entre estas variables (ANOVA-MR:  $F_{3,44}=0.34$ ,  $p=0.8$ ). La ganancia de masa corporal no presentó diferencias significativas entre día de desafío (ANOVA factorial:  $F_{3,38}=0.84$ ,  $p=0.48$ ), tipo desafío (ANOVA factorial:  $F_{1,38}=1.82$ ,  $p=0.18$ ) o la interacción entre tratamientos (ANOVA factorial:  $F_{3,38}=0.44$ ,  $p=0.72$ ). El IC no fue afectado de manera significativa por el tipo de desafío (ANOVA:  $F_{1,43}=0.55$ ,  $p=0.46$ ), el día de desafío (ANOVA:  $F_{3,43}=1.84$ ,  $p=0.15$ ) o la interacción (ANOVA:  $F_{3,43}=0.42$ ,  $p=0.74$ ; Tabla 1).

**Tabla 1.** Valores de masa corporal (MC), Índice corporal (IC) medidos a los 40 y 90 días posterior al nacimiento y tasa metabólica basal (TMB) medido a los 90 días de crías de distintas edades, desafiadas con LPS y control.

Desafío	Día desafío	MC D40	IC D40	Mb D90	IC D90	TMB D90
LPS	8(7)	76.52 ± 7.43	0.016 ± 0.03	137.3 ± 4.25	-0.015 ± 0.008	106.83 ± 9.16
Suero Salino	8(7)	79.73 ± 6.81	0.011 ± 0.03	136.97 ± 4.58	0.005 ± 0.007	92.69 ± 7.91
LPS	15(7)	72.82 ± 2.37	0.016 ± 0.02	122.63 ± 5.50	-0.003 ± 0.014	82.42 ± 6.75
Suero Salino	15(8)	78.29 ± 2.97	0.036 ± 0.01	128.86 ± 5.63	-0.001 ± 0.009	89.28 ± 9.44
LPS	22(8)	768.31 ± 6.03	0.015 ± 0.05	125.79 ± 2.89	0.015 ± 0.01	81.96 ± 5.02
Suero Salino	22(8)	70.88 ± 5.9	-0.03 ± 0.03	128.53 ± 4.00	0.004 ± 0.006	84.08 ± 6.29
LPS	30(11)	63.63 ± 10.79	-0.05 ± 0.03	128.11 ± 7.94	0.013 ± 0.006	102.81 ± 4.97
Suero Salino	30(8)	53.76 ± 10.55	-0.1 ± 0.07	127.88 ± 4.81	0.006 ± 0.007	95.83 ± 7.58
LPS	60 (6)	-	-	141.2 ± 4.69	-	91.15 ± 5.50
Suero Salino	60 (6)	-	-	154.63 ± 8.49	-	88.19 ± 8.27

En paréntesis se muestra el número de replicas por tratamiento

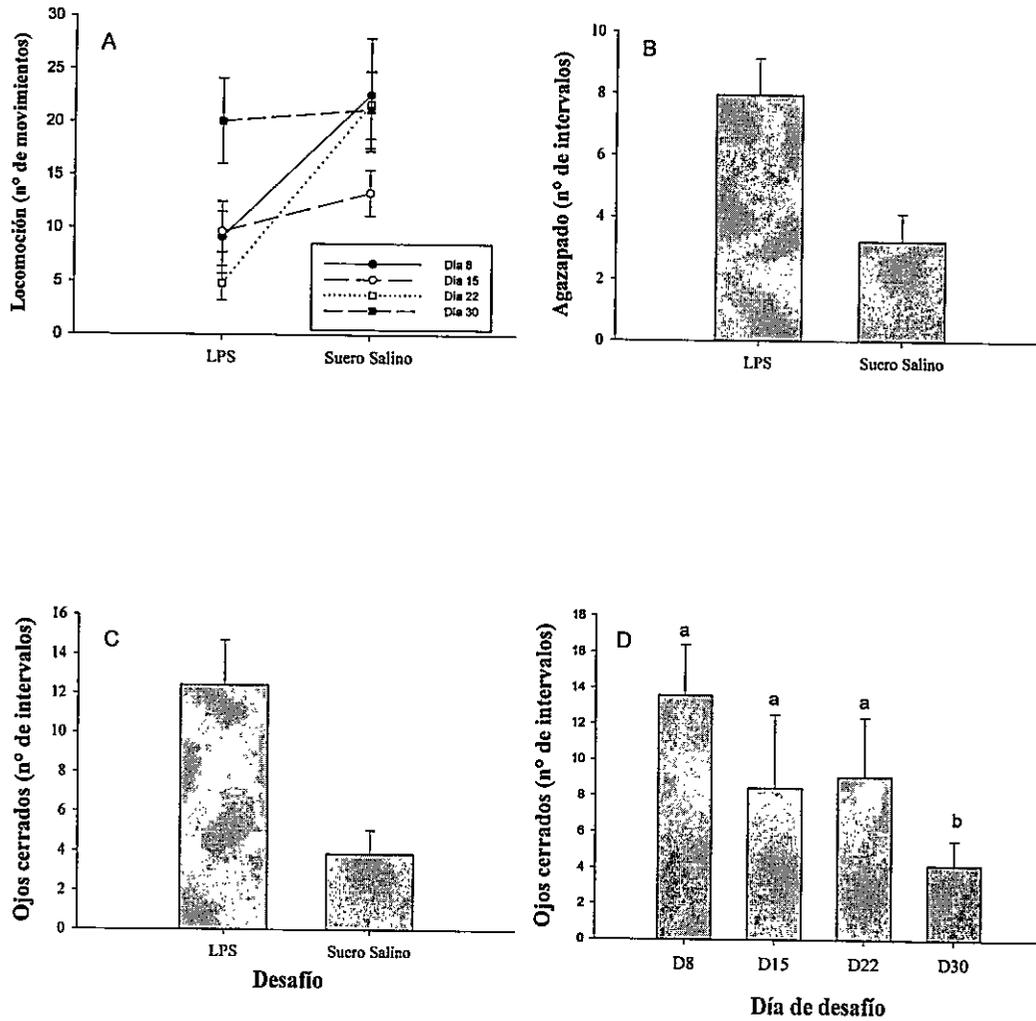
### *Conducta de enfermedad en el desarrollo*

La variable locomoción fue afectada de manera significativa por el día de desafío (ANOVA:  $F_{3,46}=3.04$ ,  $p=0.04$ ), el tipo de desafío (ANOVA:  $F_{1,46}=16.85$ ,  $p=0.0002$ ) y la interacción entre ambas variables (ANOVA:  $F_{3,46}=3.39$ ,  $p=0.03$ ). El test *a posteriori* reveló que las crías desafiadas a los 22 días con LPS presentaron el menor número de movimientos en la jaula (Prueba de *Tukey*:  $p<0.05$ ; Fig. 1a). Para el caso de la variable *agazapado*, el análisis de varianza de dos vías con un procedimiento de ART (ver metodología) mostró que las crías desafiadas con LPS mostraron un mayor número de intervalos agazapados (ANOVA:  $F_{1,46}=10.3$ ,  $p=0.002$ ; Fig. 1b). Sin embargo, no se observó un efecto del día de desafío (ANOVA:  $F_{3,46}=0.77$ ,  $p=0.52$ ) ni de la interacción entre el día de desafío y tipo de desafío (ANOVA:  $F_{3,46}=2.1$ ,  $p=0.11$ ). Por último, las crías desafiadas con LPS presentaron un mayor número de intervalos con los ojos cerrados (ANOVA:  $F_{1,46}=16.43$ ,  $p=0.0002$ ; Fig. 1c). Además, las crías inoculadas en el día 30 presentaron el menor número de intervalos con los ojos cerrados (ANOVA:  $F_{3,46}=3.69$ ,  $p=0.02$ ; Fig. 1d), pero no se observó un efecto significativo de la interacción (ANOVA:  $F_{3,46}=1.69$ ,  $p=0.18$ ).

### *Temperatura corporal y niveles Interleucina-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) en el desarrollo*

No se observó un efecto significativo del día de desafío (ANOVA:  $F_{3,47}=0.47$ ,  $p=0.71$ ), tipo de desafío (ANOVA:  $F_{1,47}=2.11$ ,  $p=0.15$ ) o de la interacción entre ambos factores (ANOVA:  $F_{3,47}=0.31$ ,  $p=0.83$ ; Tabla 2) sobre los niveles de IL-1 $\beta$ . Para el caso de la temperatura corporal, el análisis de medidas repetidas reveló un efecto de la interacción

entre el tiempo (hora post desafío) y día de desafío (ANOVA-MR:  $F_{12,192}=5.0$ ,  $p<0.0001$ ), donde las crías tratadas en el día 30 y al inicio del desafío (0h), presentaron las mayores temperaturas corporales (Prueba de Tukey  $p<0.05$ , Fig. 2). La interacción entre el tipo de desafío y el tiempo no afectó de manera significativa la temperatura corporal (ANOVA-RM:  $F_{4,192}=0.7$ ,  $p=0.6$ ) ni tampoco la interacción de los factores con la edad (ANOVA:  $F_{12,192}=0.3$ ,  $p=0.98$ ; Tabla 2).

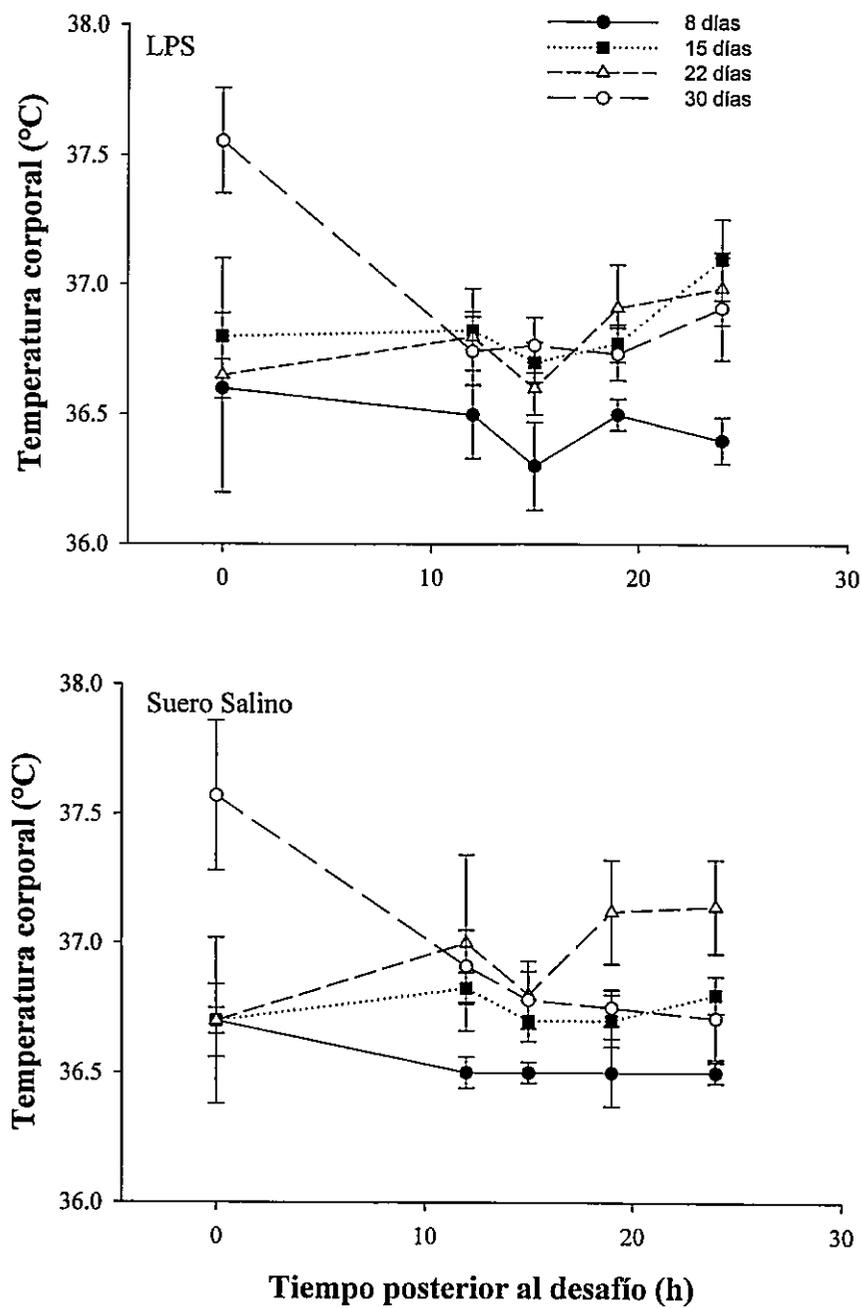


**Figura 1.** Conducta asociada a enfermedad. a) Interacción entre el desafío con LPS y la edad sobre la locomoción, b) efecto del desafío con LPS sobre el estado agazapado, c) efecto del desafío con LPS sobre el número de intervalos con los ojos cerrados y d) efecto del día de desafío sobre el número de intervalos con los ojos cerrados.

**Tabla 2.** Valores de Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y temperatura corporal de crías de distintas edades, desafiadas con LPS y crías control.

Tipo desafío	Día desafío	IL-1 $\beta$ (pg/ml)	Temperatura corporal (°C)				
			0 hora	12 horas	15 horas	19 horas	24 horas
LPS	8(7)	1444.4 $\pm$ 654.1	36.6 $\pm$ 0.04	36.5 $\pm$ 0.2	36.3 $\pm$ 0.2	36.5 $\pm$ 0.1	36.4 $\pm$ 0.1
Suero Salino	8(7)	2970.7 $\pm$ 2550.5	36.6 $\pm$ 0.04	36.5 $\pm$ 0.2	36.3 $\pm$ 0.2	36.5 $\pm$ 0.1	36.4 $\pm$ 0.1
LPS	15(8)	1811.8 $\pm$ 1003.9	36.8 $\pm$ 0.1	36.8 $\pm$ 0.1	36.7 $\pm$ 0.1	36.8 $\pm$ 0.1	37.1 $\pm$ 0.2
Suero Salino	15(9)	491.06 $\pm$ 85.3	36.8 $\pm$ 0.1	36.8 $\pm$ 0.1	36.7 $\pm$ 0.1	36.8 $\pm$ 0.1	37.1 $\pm$ 0.2
LPS	22(7)	824.5 $\pm$ 331.1	36.7 $\pm$ 0.5	36.8 $\pm$ 0.2	36.6 $\pm$ 0.1	36.9 $\pm$ 0.2	37.0 $\pm$ .1
Suero Salino	22(8)	588.01 $\pm$ 109.8	36.7 $\pm$ 0.5	36.8 $\pm$ 0.2	36.6 $\pm$ 0.1	36.9 $\pm$ 0.2	37 $\pm$ 0.1
LPS	30(7)	842.6 $\pm$ 170.8	37.6 $\pm$ 0.2	37.7 $\pm$ 0.1	36.8 $\pm$ 0.1	36.7 $\pm$ 0.1	36.9 $\pm$ 0.2
Suero Salino	30(8)	1037.1 $\pm$ 457.9	36.9 $\pm$ 0.2	36.7 $\pm$ 0.1	36.8 $\pm$ 0.1	36.7 $\pm$ 0.1	36.9 $\pm$ 0.2

En paréntesis se muestra el número de réplicas para cada tratamiento

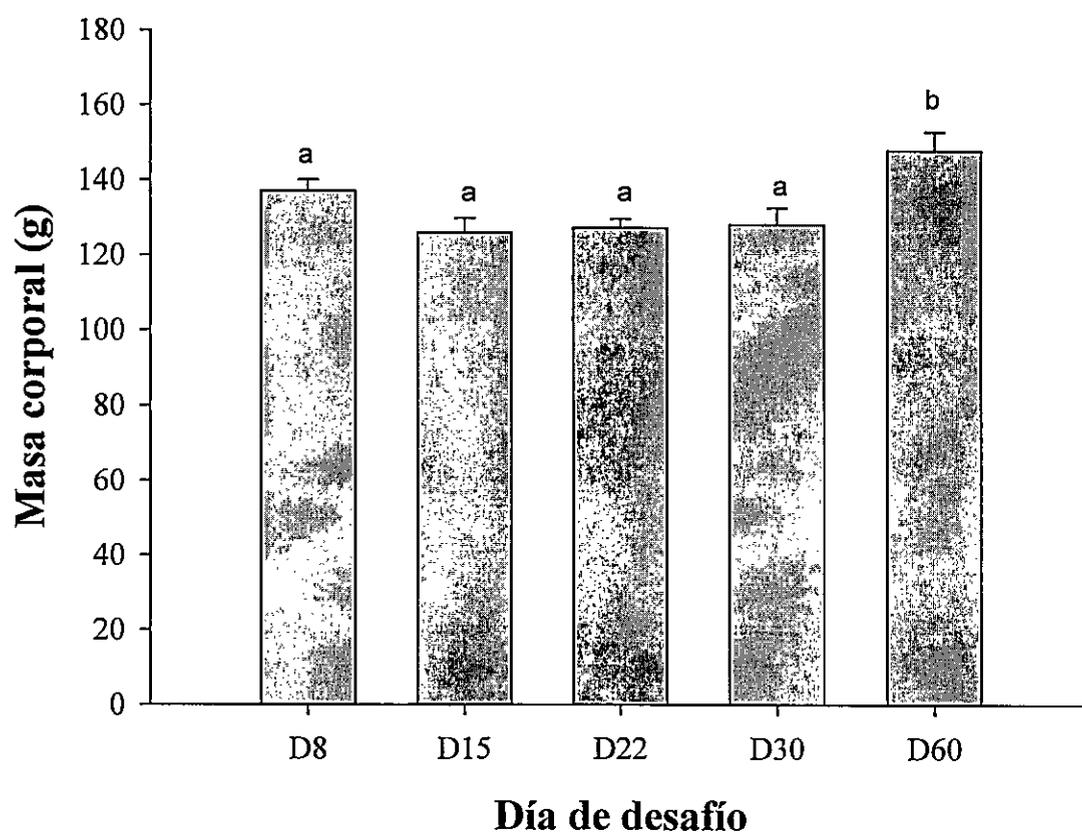


**Figura 2.** Temperatura corporal registrada a las 12 horas posteriores de realizado el desafío con LPS (panel superior) o suero salino (panel inferior) a las cuatro edades (8, 15, 22 y 30).

### *Tasa metabólica basal e índice corporal en adultos*

No se observó un efecto significativo del sexo sobre la TMB (ANOVA:  $F_{1,73}=0.005$ ;  $p=0.95$ ). El análisis reveló que no hubo un efecto significativo del tipo de desafío (ANOVA:  $F_{1,65}=1.65$ ,  $p=0.27$ ) ni de la interacción entre día de desafío y tipo de desafío (ANOVA:  $F_{4,65}=0.5$ ;  $p=0.73$ ). Sin embargo, se observó un efecto del día de desafío sobre el metabolismo basal (ANOVA:  $F_{4,65}=2.51$ ,  $p=0.05$ ; Tabla 1), donde las crías desafiadas a los 60 días presentaron las mayores tasas metabólicas basales (Prueba de *Tukey*  $p<0.05$ ).

No se encontraron diferencias significativas entre machos y hembras en el índice corporal estimado a los 90 días (ANOVA:  $F_{1,63}=0.04$ ,  $p=0.85$ ). El índice corporal en el día 90 posterior al nacimiento no fue afectado por el día de desafío (ANOVA:  $F_{3,56}=1.55$ ,  $p=0.21$ ), el tipo de desafío (ANOVA:  $F_{1,63}=1.9$ ,  $p=0.17$ ) o la interacción entre día y tipo de desafío (ANOVA:  $F_{3,63}=1.2$ ,  $p=0.32$ ; tabla 1). Por último, la masa corporal al día 90 de machos y hembras no fueron significativamente distintas (ANOVA:  $F_{1,74}=0.7$ ,  $p=0.41$ ). El día de desafío tuvo un efecto significativo sobre la masa corporal de los individuos a los 90 días (ANOVA:  $F_{4,64}=4.2$ ,  $p=0.004$ ), pero no fue afectado por el tipo de desafío (ANOVA:  $F_{1,64}=1.3$ ,  $p=0.26$ ) o la interacción entre ambos factores (ANOVA:  $F_{4,64}=0.3$ ,  $p=0.9$ ). En este sentido, los animales manipulados en el día 60 después de nacer, presentaron las mayores masas corporales a los 90 días (Prueba de *Tukey*  $p<0.05$ , Fig. 3).



**Figura 3.** Masa corporal medida a los 90 días en individuos desafiados con LPS a los 8, 15, 22, 30 y 60 días.

## DISCUSIÓN

Los estudios realizados tanto en humanos como animales domésticos o de laboratorio indican que la eficacia de la respuesta inmune se encuentra comprometida en ambos extremos de la vida, debido al desarrollo durante las primeras semanas de vida y a la senescencia en organismos de edades avanzadas (Levy, 2007). Nuestro estudio se enfocó en la respuesta a un antígeno, en las primeras semanas de vida de crías de la especie *Octodon degus*. Un desafío con LPS a distintas edades resultó en cambios en la conducta de las crías de esta especie, pero no en la respuesta febril o en la masa corporal. Por otra parte, tampoco observamos un efecto a largo plazo de un desafío inmune realizado durante el desarrollo.

### *Ontogenia del sistema inmune en Octodon degus*

En nuestro estudio desafiamos con LPS a crías de *O. degus* en cuatro edades distintas. La comparación de las crías desafiadas el día 8, 15, 22 y 30 reveló que no existen diferencias en respuesta al antígeno, salvo en algunos rasgos de la conducta asociada a enfermedad (Fig.1). Específicamente, la evaluación de la conducta de enfermedad reveló que un desafío con LPS en el día 22 después del nacimiento produce una disminución de la locomoción (Fig. 1). No obstante, el número de veces estando en posición agazapada y el número de intervalos con los ojos cerrados solo fueron afectados por el tipo de desafío pero no por la edad; es decir no existiría un efecto de la edad en estas conductas. Por otra parte, los niveles de IL-1 $\beta$  no fueron afectados por el tipo de desafío realizado o por el día en que se realizó el desafío, es decir en *O. degus* los niveles de IL-1 $\beta$  no

presentarían una variación en función de la edad. Es notable que la temperatura corporal tampoco fue afectada por el LPS, pero sí por el día de desafío, donde las crías tratadas el día 30 (con LPS o suero salino) presentaron las mayores temperaturas corporales antes de iniciar el desafío (0 h). Por último, el análisis de la masa corporal y del índice corporal medido a los 40 días de vida, reveló que las crías tratadas al día 30 presentaron una menor masa corporal, independiente del tratamiento que recibieron (LPS o suero salino), mientras que no se observaron diferencias significativas entre tratamientos en las edades restantes. La ganancia en masa corporal no presentó diferencias significativas entre los días de desafío y el tratamiento recibido.

Los estudios enfocados en la ontogenia del sistema inmune, han determinado que la respuesta inmune presenta variaciones en su desarrollo asociadas a la edad (Burl y col., 2011; Palacios y col., 2009; Reikie y col., 2012, Stamugh y col., 2011). Por ejemplo, en humanos los niveles de IL-1 $\beta$  son mayores en recién nacidos que en individuos adultos (Burl y col., 2011; Reikie y col., 2012), observándose una lenta disminución hasta alcanzar niveles observados en adultos (Kollmann y col., 2009). En especies altriciales, como ratas y ratones, se ha observado que la capacidad fagocítica de neutrófilos se encuentra atenuada en los primeros días de vida, (Carr, 2000). Por último, en aves se ha reportado que la actividad de neutrofilos disminuye con la edad (Killpack y col., 2013), mientras que los niveles de inmunoglobulinas incrementan con la edad (Killpack y col., 2013). Nuestros resultados sugieren que sólo algunos componentes de la respuesta inmune innata, como la conducta asociada a enfermedad, presentarían una variación en términos de la edad. Stambaugh y col. (2011) reportaron que en polluelos de *Tachycineta bicolor*, la respuesta innata alcanza los niveles vistos en adultos solo

después emplumar (día 18 posterior a la eclosión). Por su parte, Palacios y col. (2009) demostró que la lisis mediada por células y los niveles de anticuerpos naturales no se desarrollan completamente sino hasta el período de emplumaje (día 18). De esta manera, durante las primeras dos semanas de vida, las crías asignarían más recursos a un rápido crecimiento (Ricklefs y Wikelski, 2002), con una escasa asignación de recursos al desarrollo del funcionamiento del sistema inmune. Sin embargo, la asignación de recursos a la función inmune comenzaría a incrementar una vez que las crías han alcanzado cierto nivel de desarrollo (Palacios y col., 2009; Stambaugh y col., 2011). De esta manera, la disminución observada en la locomoción en crías desafiadas con LPS sólo en el día 22, parece relacionarse con un mayor grado de desarrollo, lo que permitiría utilizar los recursos para la generación de la respuesta inmune. No obstante, los intervalos estando agazapado y con los ojos cerrados no variaron con la edad. Se ha observado que en polluelos de *Parus major* los anticuerpos naturales se encuentran en niveles de adulto al final de desarrollo, pero no el sistema del complemento (DeCoster y col., 2010). En este sentido, es posible que sólo algunos componentes de la conducta de enfermedad presenten un desarrollo diferencial dependiente de la edad mientras que otros no.

A diferencia de los cambios observados en la conducta, los niveles de IL-1 $\beta$ , la temperatura corporal, la masa corporal y la condición corporal no mostraron una variación con la edad según lo esperado por los estudios previos. Los resultados de nuestro estudio pueden deberse a un posible efecto de las variables ambientales experimentadas por las crías. Son diversos los estudios que han demostrado un efecto modulador de la temperatura ambiental sobre la función inmune (Buchanan y col., 2006;

Cichon y col., 2002., Zhang y col., 2015). En algunos estudios se ha reportado un efecto inmunosupresor de las bajas temperaturas (Cichon y col., 2002) mientras que en otros la exposición a altas temperaturas produce una atenuación de la respuesta inmune (Henken y col., 1983a; Subba Rao y Glick, 1970; Thaxton y col., 1968). En términos de individuos en desarrollo se ha demostrado que la aclimatación a altas temperaturas (sobre el límite superior de la zona termoneutral) resulta en una disminución de los niveles de anticuerpos (Thaxton y col., 1968) o una reducción en el título de hemaglutinación (Subba Rao y Glick, 1970). En el presente estudio, las crías de *O. degus* fueron mantenidas a 30°C, temperatura que se encuentra dentro de la zona termoneutral para individuos adultos de esta especie (Rosenmann, 1977). Sin embargo, es posible que esta temperatura no se encuentre dentro de la zona termoneutral de individuos que se encuentran en desarrollo, afectando de manera negativa la respuesta a LPS. La similitud en los niveles de IL-1 $\beta$  entre individuos tratados con LPS y los individuos control (suero salino) parece apoyar la idea de que la aclimatación a temperaturas ambientales elevadas podría haber afectado negativamente la función inmune, independiente de la edad a la cual se produzca el desafío. Por ejemplo, crías de cobayos (*Cavia porcellus*) desafiadas a cuatro edades distintas y mantenidas a temperatura ambiente (23°C) presentaron un aumento del título de inmunoglobulina G (IgG), no obstante, este aumento fue similar en las cuatro edades analizadas (Pilorz y col., 2005). Por lo tanto, es posible proponer que la exposición a altas temperaturas tuvo un efecto atenuante en algunos aspectos de la respuesta a LPS, impidiendo determinar la ontogenia de la función inmune y los costos asociados en esta especie.

Es posible que los intervalos de tiempo en los cuales se realizaron los registros de temperatura corporal, cambios en masa corporal y niveles de IL-1 $\beta$  no fueran los adecuados para registrar la totalidad de los cambios esperados. En este sentido, se ha observado que las mayores variaciones en la temperatura corporal ocurren en las primeras 7-8 horas posteriores al desafío con LPS (Blatteiss 2003., Martin y col., 2008). Sin embargo, nuestros registros comenzaron a las 12 horas posteriores al desafío con LPS, por lo que es posible suponer que los mayores cambios en la temperatura corporal ocurrieron en esta ventana temporal y no fueron registrados en nuestro estudio.

Así, con los resultados expuestos podemos concluir que solo algunos componentes de la respuesta inmune innata en crías de *Octodon degus* varían con la edad como la conducta asociada a enfermedad, específicamente la locomoción (ver fig. 1). De esta manera, es esperable que factores ambientales como la temperatura o la disponibilidad de alimentos, tengan un mayor efecto sobre las variables analizadas. Por ejemplo, se ha observado que la magnitud de la respuesta febril en ratones depende de la temperatura ambiental (Conrad y col., 1997; Rudaya y col., 2005), mientras que los costos sobre el crecimiento de la respuesta inmune de aves dependen de la disponibilidad de recursos (Brzęk y Konarzewski, 2007). Por lo tanto, es necesario evaluar los posibles efectos de variables ambientales, como temperatura o disponibilidad de alimento, sobre la ontogenia de la función inmune y los costos asociados a la respuesta a un antígeno. Por último, observamos que las crías manipuladas a los 30 días posteriores al nacimiento, presentaron las menores masas corporales al día 40. Es posible que la manipulación tenga un efecto mayor sobre la masa corporal, comparado

con el desafío inmune, y que esta manipulación esté asociada a hormonas de estrés. Por ejemplo, se ha observado que la elevación artificial de hormonas de estrés puede atenuar la actividad inmune en eideres (*Somateria sp.*; Bourgeon y Raclot, 2006) y pinzones cebrá (*Poephilia guttata*; Roberts y col., 2007b). Así, la evaluación de la posible interacción entre la respuesta inmune y las hormonas de estrés podría dar cuenta de los resultados observados en este estudio.

*Desafío inmune durante el desarrollo: ¿existen efectos a largo plazo sobre la tasa metabólica basal?*

En nuestro estudio, un desafío inmune realizado durante los primeros días de vida, no tiene efectos sobre la tasa metabólica basal, la masa corporal o la condición corporal tanto de machos como de hembras juveniles (90 días de vida). En particular, no encontramos diferencias significativas entre individuos desafiados con LPS y control en estas tres variables. Estos resultados se contradicen lo reportado por otros estudios previos realizados en animales endotermos, como aves y roedores (Buttler y McGraw, 2012; Butler y col., 2011; Fair y col., 1999; Galic y col., 2009). Estos estudios han demostrado que la administración de LPS a ratas durante los primeros días de vida (3-5 días) resulta en una reducción de la masa corporal (Galic y col., 2009; Spencer y col., 2009) o una reducción de la respuesta febril (Galic y col., 2009; Spencer y col., 2009) una vez los individuos han alcanzado la adultez. Por ejemplo, se ha observado que la administración de LPS a ratas a los 7 días después de nacer, se traduce en una menor masa corporal en la adultez (Spencer y col., 2009). Es más, se ha demostrado que en especies altriciales, como ratas o ratones, la respuesta inmune pareciese estar sometida a

una programación neonatal. Así, ratas desafiadas en las primeras semanas de vida, presentan una atenuación en la respuesta febril (Spencer y col., 2009). En esta línea, una inmunización realizada durante el desarrollo podría relacionarse con variaciones de la tasa metabólica basal, debido a los costos energéticos de la respuesta inmune observado tanto en aves (Martin y col., 2003; Schmid-hempel, 2012) como en roedores (Demas y col., 1997; Schmid-hempel, 2012), sin embargo dicha relación no se observó en este trabajo.

Dentro del campo de la inmunología ecológica, existe un gran interés por determinar cómo la asignación de energía puede ser mediada por variables ambientales, como temperatura y disponibilidad de alimento, así como determinar la ocurrencia de compromisos de la asignación de recursos entre la defensa inmunitaria y otros procesos, como el crecimiento, cuando los recursos son limitados (Hasselquist y Nilsson, 2012; Lochmiller y Deerenberg, 2000). Así, en estudios de restricción de alimento se ha demostrado que el compromiso entre crecimiento y respuesta inmune se produce cuando los recursos son limitados (Brzęk y Konarzewski, 2007; Killpack y col., 2015). Sin embargo, dicho compromiso no se observa cuando las crías no se encontraban bajo restricción de alimento, lo que indicaría un umbral de dependencia de recursos de la respuesta inmune (Alonso-Alvarez y Tella, 2001; Martín-Vivaldi y col., 2006; Snoeijs y col., 2005). En nuestro estudio, el régimen de alimentación consistió en alimento *ad libitum*, por lo tanto no existió limitación de recursos. Es posible que tanto la tasa metabólica basal como la masa corporal de nuestra especie, no fuesen afectadas por desafíos inmunes realizados en el desarrollo, debido a que los recursos no eran

limitados. De esta manera, la carencia de efectos a largo plazo de la respuesta inmune sobre la tasa metabólica basal reportada en este estudio, podría ser resultado de condiciones ambientales favorables en termino de abundancia de alimento (Downs y col., 2014; Hasselquist y Nilsson, 2012; Lochmiller y Deerenberg, 2000).

Por último, en nuestro estudio evaluamos la tasa metabólica basal de individuos juveniles (90 días) que aún se encuentran en una etapa de crecimiento (Ardiles y col., 2013) y que no han alcanzado la madurez sexual. Así, es posible que los efectos de un desafío con LPS durante el desarrollo se observen en el estado adulto o en edades más avanzadas. Por ejemplo, Hanssen y col. (2004) demostraron que la respuesta del sistema inmune de crías eíderes (*Somateria sp.*) no conlleva ningún costo a corto plazo. Sin embargo, estos autores reportaron costos a largo plazo (en adultez). Nuestros resultados no permiten eliminar potenciales costos a largo plazo para nuestros animales de experimentación y por lo tanto, no podemos descartar que en el largo plazo la existencia de compromisos entre la respuesta inmune y rasgos asociados a la adecuación biológica.

Así, los resultados de este estudio sugieren que un desafío inmune realizado durante el desarrollo no tiene efectos sobre la tasa metabólica o la masa corporal de individuos juveniles. Al parecer la respuesta anoréxica producida por la administración de LPS documentada en otras especies (Nemzek y col., 2008), parece no ocurrir en *O. degus*, lo que se traduce en un nulo efecto en la masa corporal de los individuos adultos. En este sentido, se propone que la leptina no sería afectada por un desafío con LPS durante el desarrollo debido a que la regulación de la ingesta de alimentos como el metabolismo son funciones que no se encuentran completamente desarrolladas en esta etapa, resultando en una carencia de efectos en organismo adultos. La leptina es una

hormona derivada de los adipocitos y juega un rol esencial en la regulación del sistema inmune, en el gasto de energía y en la ingesta de alimentos (Loffreda y col., 1998; LaCava y Matarese, 2004; Matarese y col., 2005), por lo que resulta esencial evaluar cómo los niveles de esta hormona se relacionan con los costos energéticos de la respuesta inmune en organismos en desarrollo y los efectos a largo plazo que estos costos tendrían.

## REFERENCIAS

- Adkins B, Leclerc C, Marshall-Clarke S. 2004. Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nature rev.* 4: 553-564.
- Alonso-Alvarez C, Bertrand S, Devevey G, Gaillard M, Prost J, Faivre B, Sorci G. 2004. An experimental test of the dose-dependent effect of carotenoids and immune activation on sexual signals and antioxidant activity. *Am. Nat.* 164: 651-659.
- Ardia DR, Parmentier HK, Vogel LA. 2011. The role of constraints and limitation in driving individual variation in immune response. *Funct. Ecol.* 25: 61-73.
- Ardiles AO, Ewer J, Acosta ML, Kirkwood A, Martinez A, Ebensperger L, Bozinovic F, Lee TM, Palacios AG. 2013. *Octodon degus* (Molina 1782): a model in comparative biology and biomedicine. *Cold. Spring. Harb. Protoc.* doi:10.1101/pdb.emo071357.
- Bao C, Noble PW, Lane MD, Diehl AM. 1998. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J* 12: 57.
- Becker MI, De Ioannes AE, León C, Ebensperger LA. 2007. Females of the communally breeding rodent, *Octodon degus*, transfer antibodies to their offspring during pregnancy and lactation. *J. Reprod. Immunol.* 74:68-77.
- Begon M, Townsend CR, Harper JL. 2006. *Ecology: From Individuals to Ecosystems* Blackwell Pub, 4th ed.
- Blatteis CM. 2003. Fever: pathological or physiological, injurious or beneficial? *J Ther. Biol.* 28: 1-13.
- Bonneaud C, Mazuc J, Gonzalez G, Haussy C, Chastel O, Faivre B, Sorci G. 2003. Assessing the cost of mounting an immune response. *Am. Nat.* 161:367-379.
- Bourgeon S, Raclot T. 2006. Corticosterone selectively decreases humoral immunity in female eiders during incubation. *J. Exp. Biol.* 209: 4957-4965.
- Brambell FWR, Rogers TW. 1970. The transmission of passive immunity from mother to young. In *Frontiers in Biology*. Ed. A. Neuberger y E.L. Tatum. Amsterdam, The Netherlands. 34-47.

- Brommer JE. 2004. Immunocompetence and its costs during development: an experimental study in blue tit nestlings. *Proc. R. Soc. Lond. B* 271: S110–S113.
- Brzęk P, Konarzewski M. 2007. Relationship between avian growth rate and immune response depends on food availability. *J. Exp. Biol.* 210: 2361–2367.
- Buchanan JS, Peloso F, Satinoff E. 2003. Thermoregulatory and metabolic changes during fever in young and old rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285: R1165–R1169.
- Burl S et al. 2011. Age-dependent maturation of toll-like receptor-mediated cytokine responses in Gambian infants. *PLoS ONE* 6: e18185.
- Butler MW, McGraw KJ. 2012. Differential effects of early- and late-life access to carotenoids on adult immune function and ornamentation in mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *PLoS ONE* 7: e38043.
- Butler MW, Matthew B. Toomey, Kevin J. McGraw and Melissa Rowe. 2011. Ontogenetic immune challenges shape adult personality in mallard ducks. *Proc. R. Soc. B* doi: 10.1098/rspb.2011.0842
- Carr R. 2000. Neutrophil production and function in newborn infants. *Br. J. Haematol.* 110: 18–28.
- Cichon M, Chadzin M, Ksia A, Konarzewski M. 2002. Delayed effects of cold stress on immune response in laboratory mice. *Proc. R. Soc. Lond. B* 269: 1493–1497.
- Conrad S, Bull DF, King MG, Husband AJ. 1997. The Effects of Lipopolysaccharide (LPS) on the Fever Response in Rats at Different Ambient Temperatures. *Physiol. Behav.* 62: 1197–1201.
- De Block M, Stoks R. 2008. Compensatory growth and oxidative stress in a damselfly. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 275: 781–785.
- De Coster G, De Neve L, Martin-Galvez D, Therry L, Lens L. 2010. Variation in innate immunity in relation to ectoparasite load, age and season: a field experiment in great tits (*Parus major*). *J. Exp. Biol.* 213: 3012–3018.
- Delves P, Martin S, Burton D, Roitt I. 2008. *Roitt Immunología. Fundamentos*. Editorial Médica Panamericana.
- Demas GE, Chefer V, Talan MI, Nelson RJ. 1997. Metabolic costs of mounting an antigen-stimulated immune response in adult and aged C57BL/6J mice. *Am. J. Physiol.* 273: R1631–R1637.

- Fair JM, Hansen ES, Ricklefs RE. 1999. Growth, development stability and immune response in juvenile Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). *Proc. R. Soc. Lond. B* 266:1735–42.
- Firth, M. A., P. E. Shewen, and D. C. Hodgins. 2005. Passive and active components of neonatal innate immune defenses. *Anim. Health Res. Rev.* 6:143-158.
- Fitze PS, Tschirren B, Richner H. 2004. Life history and fitness consequences of ectoparasites. *J. Anim. Ecol.* 73:216-226.
- Francesci C, Bonafe M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, DeBenedictis G. 2000. Inflammaging: an evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann. NY Acad. Sci.* 908:244–254.
- Fulk GW. 1976. Notes on the activity, reproduction, and social behavior of *Octodon degus*. *J. Mammal.* 57:495–505.
- Galic MA, Spencer SJ, Mouihate A, Pittman QJ. 2009. Postnatal programming of the innate immune response. *Integrat. Comp. Biol.* 49: 237–245
- Grindstaff JL. 2008. Maternal antibodies reduce costs of an immune response during development. *J. Exp. Biol.* 211: 654-660.
- Gustafsson L, Nordling D, Andersson MS, Sheldon B, Qvarnstrom A. 1994. Infectious diseases, reproductive effort and the cost of reproduction in birds. *Phil. Trans. R. Soc. B* 346: 323-331.
- Hasselquist D, Nilsson JA. 2012. Physiological mechanisms mediating costs of immune responses: what can we learn from studies of birds? *Anim Behav* 83: 1303–1312.
- Haywood S, Perrins C.M. 1992 Is clutch size in birds affected by environmental-conditions during growth?. *Proc. R. Soc. B* 249: 195 197.
- Heller ED, Leitner G, Drabkin N, Melamed D. 1990. Passive immunization of chicks against *Escherichia coli*. *Avian. Pathol.* 19: 345–354.
- Henken AM, Groote Schaarsberg AMJ, Nieuwland MGB. 1983a. The effect of environmental temperature on immune response and metabolism of the young chicken. 3. Effect of environmental temperature on the humoral immune response following injection of sheep red blood cells. *Poultry. Sci.* 62:51–58.
- Hennessy M, Deak T, Schiml-Webb PA, Wilson SE, Greenlee TM, McCall E. 2004. Responses of guinea pig pups during isolation in a novel environment may represent stress-induced sickness behaviors. *Physiol. Behav.* 81:5-13.

- Ilmonen P, Taarna T, Hasselquist D. 2000. Experimentally activated immune defence in female pied flycatchers results in reduced breeding success. *Proc. R. Soc. B.* 267: 665–670.
- Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M. 2005. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 6th edn. Garland Science, New York, NY, USA.
- Jones AC, Burdge GC, Warner JA, Postle AD, Warner JO. 1996. Ontogeny of circulating leukocytes in the fetal guinea pig. *Biol. Neonate*: 70:108 – 15.
- Killpack T, Oguchi Y, Karasov WH. 2013. Ontogenetic patterns of constitutive immune parameters in altricial house sparrows. *J. Avian Biol.* 44: 513– 520.
- Killpack T, Carrel E, Karasov WH. 2015. Impacts of Short-Term Food Restriction on Immune Development in Altricial House Sparrow Nestlings. *Physiol. Biochem. Zool.* 88:195–207.
- King MO, Swanson DL. 2013. Activation of the immune system incurs energetic costs but has no effect on the thermogenic performance of house sparrows during acute cold challenge. *J. Exp. Biol.* 216: 2097-2102.
- Klasing KC, Laurin DE, Peng RK, Fry DM. 1987. Immunologically mediated growth depression in chicks: influence of feed intake, corticosterone and interleukin-1. *J. Nutr.* 117: 1629-1637.
- Klasing KC, Leshichinsky TV. 1999. Functions, costs and benefits of the immune system during development. En: Adams N, Slotow R, editors. *Proceedings of the 22<sup>nd</sup> international ornithological congress, 16 – 22 August 1998. Johannesburg' Birdlife South Africa*; p. 2817 – 35.
- Kollmann, TR et al. 2009. Neonatal innate TLR-mediated responses are distinct from those of adults. *J. Immunol.* 183: 7150–7160.
- Kovarik J, Siegrist CA. 1998. Immunity in early life. *Immunol. Today* 19: 150-152.
- Labocha MK, Schutz H, Hayes JP. 2014. Which body condition index is best? *OIKOS* 123: 111-119.
- La Cava A, Matarese G. 2004. The weight of leptin in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 371-379.
- Levy O. 2007. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat. Rev. Immunol.* 7:379–90.

- Lindström J. 1999. Early development and fitness in birds and mammals. *TREE* 14: 343-348.
- Lochmiller RL, Deerenberg C. 2000. Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos* 88: 87-98.
- Loffreda S et al. 1998. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J.* 12: 57-65.
- Long CV, Ebensperger LA. 2010. Pup Growth Rates and Breeding Female Weight Changes in Two Populations of Captive Bred Degus (*Octodon degus*), a Precocial Caviomorph Rodent. *Reprod. Dom. Anim.* 45: 975-982.
- Mangel M, Stamps JA. 2001. Trade-offs between growth and mortality and the maintenance of individual variation in growth. *Evol. Ecol. Res.* 3: 538-593.
- Martín-Vivaldi M, Ruiz-Rodríguez M, Méndez M Soler J.J. 2006. Relative importance of factors affecting nestling immune response differs between junior and senior nestlings within broods of hoopoes *Upupa epops*. *J. Avian Biol.* 37: 467-476.
- Martin LB, Scheurlein A, Wikelski M. 2003. Immune activity elevates energy expenditure of house sparrows: a link between direct and indirect costs? *Proc. R. Soc. Lond. B* 270:153-158.
- Martin LB, Weil ZM, Nelson RJ. 2008. Fever and sickness behaviour vary among congeneric rodents. *Funct Ecol* 22: 68-77.
- Moreno J, Sanz JJ, Arriero E. 1999. Reproductive effort and T-lymphocyte cell-mediated immunocompetence in female pied flycatchers *Ficedula hypoleuca*. *Proc. R. Soc. B.* 266: 1105-1109.
- Monaghan P, Metcalfe NB, Torres R. 2009. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecol. Lett.* 12: 75-92.
- Møller AP, Haussy C. 2007. Fitness consequences of variation in natural antibodies and complement in the barn swallow *Hirundo rustica*. *Funct. Ecol.* 21: 363-371
- Møller AP, Allander K, Dufva R. 1990. Fitness effects of parasites on Passerine birds: a review. En: J. Blondel, A. Gosler, J.-D. Lebreton, R. McCleery (Eds.): *Population biology of passerine birds: an integrated approach*. Nato ASI Subseries G: vol. G24. Pp. 269-280. SpringerVerlag, Berlin, Heidelberg.

- Matarese G et al. 2005. Leptin in immunology. *J. Immunol.* 174: 3137–3142.
- Nemzek JA, Morrison L, Peterson JE, Bolgos GL, Rush HG. 2003. Quantification of TNF- $\alpha$  and IL-6 Bioactivity in Response to Lipopolysaccharide in the Degu (*Octodon degus*) *Cont. Top.* 42: 39-42.
- Nemzek JA, Kelly MS, Hugunin, L and Mark R Opp. 2008. Modeling Sepsis in the Laboratory: Merging Sound Science with Animal Well-Being. *Comp. Med.* 58: 120–128.
- Nilsson C, Jennische E, Hoi-Por H, Eriksson E, Bjorntorp P, Homang A. 2002. Postnatal endotoxin exposure results in increased insulin sensitivity and altered activity of neuroendocrine axes in adult female rats. *Eur. J. Endocrinol.* 146: 251–60.
- Nordling D, Andersson M, Zohari S, Lars G. 1998. Reproductive effort reduces specific immune response and parasite resistance. *Proc. R. Soc. Lond. B* 265: 1291-1298.
- Norris K, Evans MR. 2000. Ecological immunology: life history trade-offs and immune defense in birds. *Behav. Ecol.* 11: 19-26.
- Novoa FF. 1993. *Ecofisiología de Zonotrichia capensis: cambios estacionales en el gasto y la adquisición de energía.* Ph.D. diss., Universidad Chile, Santiago.
- Ots I, Kerimov AB, Ivankina EV, Ilyina TA, Horak P. 2001. Immune challenge affects basal metabolic activity in wintering great tits. *Proc. R. Soc. B* 268: 1175-1181.
- Palacios M, Cunnick J, Vleck D, Vleck C. 2009. Ontogeny of innate and adaptive immune defense components in freelifving tree swallows, *Tachycineta bicolor*. *Dev. Compar. Immunol.* 33: 456 – 463.
- Pilorz V, Jäckel M, Knudsen K, Trillmic F. 2005. The cost of a specific immune response in young guinea pigs. *Physiol. Behav.* 85: 205- 211.
- Raina N, Matsui J, Jeejeebhoy KN. 2000. Nutritional and metabolic effects of the endotoxin bacterial lipopolysaccharide in orally and parenterally fed rats. *Am. J. Clin. Nutr.* 71:835–843.
- Reynolds TJ, Wright JW. 1979. Early postnatal physical and behavioural development of degus (*Octodon degus*). *Lab. Anim.* 13: 93-99.
- Ricklefs, R.E. and Wikelski, M. 2002. The physiology/life-history nexus. *TREE* 17: 462–468

- Roberts ML, Buchanan KL, Hasselquist D, Evans MR. 2007b. Effects of testosterone and corticosterone on immunocompetence in the zebra finch. *Horm. Behav.* 51: 126–134.
- Rosenmann M. 1977. Regulacion térmica en *Octodon degus*. *Medio Ambiente* 3: 127-131.
- Rudaya AY, Steiner AA, Robbins JR, Dragic AS, Romanovsky AA. 2005. Thermoregulatory responses to lipopolysaccharide in the mouse: dependence on the dose and ambient temperature. *Am. J. Physiol. – Reg. Int. Comp. Physiol.* 289: R1244–R1252.
- Schmid-Hempel P. 2011. *Evolutionary Parasitology: The Integrated Study of Infections, Immunology, Ecology, and Genetics*. Oxford University Press Inc.
- Sheldon BC, Verhulst S. 1996. Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *TREE* 11: 317-321.
- Siva-Jothy MT, Tsubaki Y, Hooper RE. 1998. Decreased immune response as a proximate cost of copulation and oviposition in a damselfly. *Physiol. Entomol.* 23:274–277.
- Snoeijs T, Dauwe T, Pinxten R, Darras VM, Arckens L, Eens M. 2005. The combined effect of lead exposure and high or low dietary calcium on health and immunocompetence in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *Environ. Pollu.* 134: 123–132.
- Soler JJ, de Neve L, Perez-Contreras T, Soler M, Sorci G. 2003. Tradeoff between immunocompetence and growth in magpies: an experimental study. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270: 241–248.
- Spencer SJ, Martin S, Mouihate A, Pittman QJ. 2006. Early-life immune challenge: defining a critical window for effects on adult responses to immune challenge. *Neuropsychopharmacol.* 31: 1910–1918.
- Stambaugh T, Houdek BJ, Lombardo MP, Thorpe PA, Hahn DC. 2011. Innate immune response development in nestling tree swallows. – *Wilson J. Ornithol.* 123: 779 – 787.
- SubbaRao DSV, Glick B. 1970. Immunosuppressive action of heat in chickens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 133:445-448.



- Sun CM, Fiette L, Tanguy M, Leclerc C, Lo-Man R. 2003. Ontogeny and innate properties of neonatal dendritic cells. *Blood* 102: 585-591.
- Thaxton P, Sadler CR, Glick B. 1968. Immune response of chickens following heat exposure or injections with ACTH. *Poultry Sci.* 47:264-266.
- van der Ziel CE, Visser H. 2001. The effect of food restriction on morphological and metabolic development in two lines of growing Japanese quail chicks. *Physiol Biochem. Zool.* 74: 52-65.
- Veiga JP, Salvador A, Merino S, Puerta M. 1998. Reproductive effort affects immune response and parasite infection in a lizard: a phenotypic manipulation using testosterone. *Oikos* 82: 313-318.
- Veloso C, Kenagy GJ. 2005. Temporal dynamics of milk composition of the precocial caviomorph *Octodon degus* (Rodentia: Octodontidae). *Rev. Chi. Hist. Nat.* 78: 247-252.
- Walker FR, Owens JA, Ali S, Hodgson DM. 2006. Individual differences in glucose homeostasis: do our early life interactions with bacteria matter? *Brain. Behav. Immun.* 20: 401-409.
- Wobbrock JO, Findlater L, Gergle D, Higgins JJ. 2011. The aligned rank transform for nonparametric factorial analyses using only ANOVA procedures. *Proc. Conf. on Hum. Factors in Comput. Syst.* 1:143-146
- Woods CA, Boraker DK. 1975. *Octodon degus*. *Mammal. Spec.* 67: 1-5.
- Withers PC. 1977. Measurements of metabolic rate,  $V_{CO_2}$  and evaporative water loss with a flow through mask. *J. Appl. Physiol.* 42:120-123.
- Yáñez JL. 1976. *Ecología de Octodon degus*. Tesis de Pregrado, Universidad de Chile, Santiago.
- Zhang Z, Chen B, Yuan J, Niu C. 2015. Acute cold stress improved the transcription of pro-inflammatory cytokines of Chinese soft-shelled turtle against *Aeromonas hydrophila*. *Develop. Comp. Immunol.* 49: 127-137.

## III. Capítulo II:

---

**Efecto de la temperatura ambiental sobre la respuesta  
inmune innata y costos energéticos**

## RESUMEN

La temperatura ambiental afecta casi todos los aspectos de los organismos, desde rasgos fisiológicos y morfológicos como atributos conductuales. De esta manera, se ha reportado que la temperatura ambiental sería una variable capaz de modificar la capacidad termoregulatoria de los organismos y la función inmune, dos procesos biológicos costosos en términos de energía. Así, y basado en la teoría de historias de vida, la capacidad termoregulatoria y la función inmune serían dos procesos que se encontrarían en compromiso debido al uso de recursos en común. De esta manera, la termorregulación podría limitar energéticamente a la función inmune. Los estudios realizados a la fecha en individuos adultos, han reportado resultados contradictorios, observándose un efecto negativo de las bajas temperaturas sobre la eficiencia de la respuesta inmune, mientras que en otros estudios no se observaron efectos. Así, con lo anteriormente expuesto, el objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de la temperatura ambiental experimentada durante el desarrollo en la generación de una respuesta a un antígeno no patogénico como el lipopolisacárido (LPS) y sobre los costos energéticos asociados a la respuesta, en crías de *Octodon degus* (Octodontidae; Hystricognathi). Las crías fueron aclimatadas desde el día de nacimiento (día 0) hasta el destete (día 28) a dos temperaturas contrastantes: 15°C y 30°C. En el día 30, realizamos los desafíos inmunes. A las 12 h posteriores al desafío, se realizaron mediciones de conducta asociada a enfermedad, cambios en la temperatura corporal y cambios en la masa corporal como rasgos de la respuesta inmune. Finalmente, se realizaron mediciones de los niveles de la citoquina pro-inflamatoria Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ),

Nuestros resultados demostraron que la temperatura ambiental tiene un efecto modulador sobre algunas características de la respuesta inmune innata, pero no sobre los costos energéticos. Los niveles de IL-1 $\beta$ , la temperatura corporal y algunos rasgos conductuales fueron afectados por la temperatura de aclimatación. De manera específica, las crías que crecieron a 30°C presentaron una respuesta inmune atenuada, donde se observaron diferencias entre los individuos tratados con LPS y las crías control (suero salino). En este sentido, la aclimatación a 30°C podría tener un efecto supresor de la respuesta inmune, debido a un posible estrés termal asociado a la producción de hormonas de estrés. Por otra parte, tanto el cambio en masa corporal como el cambio en la tasa metabólica basal (previo y posterior al desafío) no fueron afectados por la aclimatación pero sí por el tipo de desafío. Específicamente, las crías desafiadas con LPS presentaron las mayores pérdidas de masa corporal y los mayores incrementos en la tasa metabólica basal comparada con las crías control, independientemente de la aclimatación. En este sentido, es posible que el efecto de la temperatura ambiental sobre la tasa metabólica sea marcado sólo cuando las capacidades del animal para mantener la homeotermia son afectadas.

Así, nuestros resultados sugieren que en individuos que se encuentran en desarrollo, la temperatura ambiental representaría un factor modulador clave en algunos componentes de la respuesta inmune en *O. degus*. Sin embargo, no observamos un efecto de la temperatura ambiental sobre los costos energéticos de la respuesta inmune. Es posible que los regímenes alimentarios experimentados por nuestras crías pudiesen estar enmascarando o compensando los posibles efectos de la temperatura ambiental.

Por lo tanto, es necesario evaluar cómo la interacción entre distintas variables ambientales afecta la respuesta inmune de esta especie.

## ABSTRACT

The ambient temperature influences all aspects of organisms, from physiological and morphological traits to behavioral attributes. Thus, it has been reported that the ambient temperature would be able to modify the thermoregulatory capacity of organism and the immune function, two costly biological processes in terms of energy. Based on the theory of life history, thermoregulatory capacity and immune function would be two processes that would be traded-off, due the use of common resources. Thus, thermoregulation could represent a strong energy restriction to immune function. Studies to date in adult individuals have reported contradictory results, showing a negative effect of low temperatures on the efficiency of the immune response, while in other studies, no effects were observed. Moreover, in free-living animals that are in development studies are scarce.

The aim of this study was to evaluate the effects of the ambient temperature experienced during development in mounting a response to a non-pathogenic antigen such as lipopolysaccharide (LPS) and evaluate de effects on the energetic costs associated to the response in offspring of *Octodon degus* (Octodontidae; Hystricognathi). The pups were acclimatized from the day of birth (day 0) until weaning (day 28) to two different temperatures: 15°C and 30°C. On day 30, we made immune challenges and the levels of the pro-inflammatory cytokine interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) sickness behavior, changes in body temperature and changes in body mass were measured as features of the immune response.

Our results showed that the ambient temperature has a modulatory effect on certain characteristics of the immune response, but not on energy costs. The levels of IL-1 $\beta$ , body temperature and certain behavioral traits were affected by temperature acclimation. Specifically, the pups that grew at 30°C showed an attenuated immune response, where differences between individuals treated with LPS and control were observed. In this respect, the acclimatization to high temperatures might have a suppressive effect on the immune response, due to a possible thermal stress associated with the production of stress hormones. Moreover, both the change in body mass as the change in the basal metabolic rate (before and after the challenge) were not affected by acclimation, but the immune challenge affected these variables. Specifically, the pups challenged with LPS had the highest body mass losses and the largest increases in basal metabolic rate compared to the control animals, independent acclimatization. In this sense, it is possible that the effect of ambient temperature on metabolic rate is marked only when the capabilities of the animal to maintain homeothermy are affected.

Thus, our results suggest that ambient temperature may represent a key factor in some components of immune response in developing individuals of *O. degus*. However, we did not observe an effect of ambient temperature on the energetic costs of the immune response. It is possible that dietary regimes experienced by young could be masking the possible effects of environmental temperature. Therefore, it is necessary to evaluate how the interactions between environmental variables affect the immune response of this species.

## INTRODUCCIÓN

Tanto la sobrevivencia como la fecundidad de los organismos, dos componentes de la adecuación biológica (Mills y Beatty, 2006; Sober, 2006), dependen de las condiciones ambientales a las que se encuentran expuestos (Begon, 2006; Mills y Beatty, 2006; Sober, 2006). Dentro de estas variables ambientales se encuentra el riesgo a enfermedades debido a la presencia de parásitos y patógenos (Begon, 2006; Schmid-Hempel, 2011). Así, la mayoría de los organismos es o ha sido parte de una interacción parásito-hospedero, una de las interacciones más comunes en la naturaleza (Begon, 2006; Schmid-Hempel, 2011). En este tipo de interacciones, generalmente la sobrevivencia y/o la reproducción del hospedero se ven afectadas, observándose una disminución en la adecuación biológica o *fitness* (Begon, 2006; Fitze y col., 2004; Møller y col., 1990).

Sin embargo, los hospederos cuentan con un sistema de resistencia, constituido por el sistema inmune, capaz de enfrentar una diversidad de patógenos presentes en el ambiente. De esta manera, la inversión en mecanismos de defensa puede contribuir a maximizar la adecuación biológica de los organismos. Sin embargo, la defensa contra las enfermedades también tiene altos costos energéticos asociados. Acorde con esta idea, se ha reportado que la generación de una respuesta inmune requiere recursos que pueden ser asignados a otras funciones vitales (Lochmiller y Deerenberg, 2000; Sandland y Minchella, 2003; Sheldon y Verhulst, 1996; pero véase Klasing, 1998; Hasselquist y Nilsson, 2012). Por ejemplo, existe evidencia que sugiere que durante el período

reproductivo la función inmune se ve reducida (Deerenberg y col., 1997; Nordling, 1998) o en otros casos donde la generación de una respuesta inmune afecta de manera negativa la masa corporal (Moreno-Rueda, 2011).

Por otra parte, la temperatura ambiental se ha reportado como una variable capaz de modificar la capacidad termoregulatoria de los organismos (Dawson y col., 1983b; Hinsley y col., 1993; Maldonado y col., 2009; Repasky, 1991; Swanson, 1993; Wiersma y col., 2007; Withers y Williams, 1990). De acuerdo a esto, la termoregulación constituiría una importante función biológica demandante de energía, donde las demandas energéticas de la termoregulación requieren de un aumento, del gasto energético y un reajuste de la maquinaria metabólica (Konarzewski y Diamond, 1994). Así, animales aclimatados y/o aclimatizados al frío, bajo el límite inferior de la zona termoneutral, presentan tasas metabólicas elevadas comparado con animales aclimatados a temperaturas dentro de la zona termoneutral (Dawson y col., 1983b; Hinsley y col., 1993; Maldonado y col., 2009; Repasky, 1991; Swanson, 1993; Wiersma y col., 2007; Withers y Williams, 1990) De esta manera, en animales endotermos la termoregulación podría constituir una importante restricción en términos energéticos para la función inmune, sugiriendo que ambas funciones se encontrarían comprometidas debido al uso de recursos en común. Por lo tanto, es esperable que la generación de una respuesta inmune sea suprimida durante la temporada de invierno o bajo condiciones de bajas temperaturas (Svensson y col., 1998, Dabbert y col., 1997, Cichón y col., 2002), de manera que los recursos disponibles puedan ser asignados a termoregulación. El efecto negativo de la aclimatación al frío en la respuesta inmune fue demostrada en el hererrillo común (*Cyanistes caeruleus*; Svensson y col., 1998), pero esta reducción en la respuesta

inmune no fue observada en *Colinus virginianus* (Dabbert y col., 1997). Estudios en mamíferos muestran que una exposición prolongada al frío (aproximadamente 10 días) tiene efectos negativos en la respuesta inmune en ratones (Cichon y col., 2002). Es decir, la respuesta inmune de ratones expuestos por un largo período de tiempo al frío es menor que aquellos animales expuestos al frío solo en el momento de la inmunización (Cichon y col., 2002). Por lo tanto, la intensidad y/o la duración de la aclimatación térmica influirían en la modulación que la temperatura tendría sobre la respuesta inmune (Thaxton, 1978; Cichon y col., 2002). Esto indicaría que el efecto de la temperatura ambiental en la respuesta inmune dependería de la historia térmica (aclimatación) que han experimentado los individuos al momento en que ocurre la inmunización.

Las condiciones térmicas experimentadas durante el desarrollo cobran relevancia debido a las posibles consecuencias que tendrían a largo plazo en el fitness (Lidstrom, 1999). Diversos estudios han reportado que la temperatura ambiental afecta varios procesos relacionados con el crecimiento y desarrollo de los organismos, así como atributos de la conducta, fisiología y la morfología (Barnett y Mount, 1967; Shinder y col., 2007; Weaver y Ingram, 1969). Específicamente, animales roedores aclimatados a bajas temperaturas durante su desarrollo presentan una menor masa corporal (Young y Shimano, 1998) y presentan una mayor proporción de grasa parda (Young y Shimano, 1998). Además, estudios que evalúan los efectos de la aclimatación al frío en la respuesta termoregulatoria de aves y mamíferos, demuestran que individuos bajo esta condición aumentan su capacidad termoregulatoria (Chaffee y Roberts, 1971; Cabanac, 1975).

En vertebrados, son escasos los estudios que han evaluado el rol de la temperatura ambiental experimentada durante el desarrollo sobre la capacidad de generar una respuesta inmune y los posibles costos energéticos asociados. La mayoría de estos estudios han explorado algunos componentes de la respuesta innata, específicamente en la respuesta de fase aguda (APR, de su sigla en inglés) debido a que esta respuesta podría representar un mediador de los compromisos existentes entre inmunidad y rasgos de historia de vida (Bonneaud y col., 2003; Lee y col., 2005; Owen-Ashley y Wingfield, 2007). La APR es un componente de la defensa inmune innata y es posible observarla en el transcurso de una infección (ver Introducción general: Sistema inmune de vertebrados). La mayoría de los estudios realizados en vertebrados se han centrado principalmente en aves y peces. En peces, la temperatura ambiental experimentada durante el desarrollo afecta características de la respuesta inmune, relacionadas con una respuesta no específica (Alcorn y col., 2002). Particularmente, se ha reportado que la aclimatación a bajas temperaturas produce un aumento en la actividad del complemento (Alcorn y col., 2002). En aves, se ha demostrado que la respuesta inmune no se ve afectada por la condición térmica en la cual crecen y se desarrollan los organismos, cuando la temperatura a la que son expuestos los animales en desarrollo se encuentran cercanos a la zona termoneutral (Thaxton y col., 1968; Thaxton y Siegel, 1970, 1973; Subba Rao y Glick, 1970, 1977). Esto se debe, posiblemente, a que los organismos se encontrarían más adaptados a las condiciones térmicas y menos susceptibles a factores inmunosupresores (Thaxton y Siegel, 1970). Sin embargo, cuando la temperatura ambiental es muy distante del límite inferior de la zona termoneutral es posible observar efectos en la respuesta inmune (Thaxton y col.,

1968; Thaxton y Siegel, 1970, 1973; Subba Rao y Glick, 1970, 1977). Este fenómeno se ha asociado a que temperaturas más extremas representarían un estrés en términos de la homeostasis térmica, lo que se traduciría en la producción de hormonas relacionadas a estrés (Marketon y Glaser, 2008). En roedores, los estudios que evalúen el efecto de la temperatura ambiental sobre la respuesta inmune innata y los costos energéticos asociados, en individuos que se encuentran en la etapa de desarrollo son escasos (Buchanan y col., 2003; Buchanan y col., 2006; Florez-Duquet y col., 2001). Estos estudios han demostrado, que la exposición de ratas juveniles, inculadas con LPS, a temperaturas dentro de la zona termoneutral (30°C) favorece la producción de fiebre y la producción de citoquinas inflamatorias como interleucina-1 $\beta$  ( Buchanan y col., 2003; Buchanan y col., 2006; Florez-Duquet y col., 2001).

En este estudio evaluamos los efectos de la temperatura ambiental experimentada durante el desarrollo en la generación de una respuesta a un antígeno no patogénico como el lipopolisacárido (LPS) y sobre los costos energéticos asociados a la respuesta, de crías de *Octodon degus* (Octodontidae; Hystricognathi). *Octodon degus* es un roedor precocial, social caviomorfo (Fulk, 1976; Yáñez, 1976), de hábitos diurnos que habita la zona centro-norte de Chile (Woods y Boraker, 1975). Debido a su carácter social y presentar una crianza comunal, *Octodon. degus* constituye un buen modelo de estudio, ya que las probabilidades de estar expuesto a patógenos son mayores, por lo que invertir en inmunidad en los primeros días de vida sería ventajoso.

## HIPÓTESIS

**La temperatura ambiental es una variable que afecta diversos atributos de los organismos, entre ellos la función inmune y la capacidad de termoregulación. Como estas dos funciones biológicas utilizan recursos en común, las bajas temperaturas producen una atenuación en la eficiencia y magnitud de la respuesta inmune y en los costos asociados de la respuesta, debido a una mayor asignación de recursos a termoregulación.**

### Predicciones específicas

- La tasa metabólica basal será mayor en individuos que fueron aclimatados desde el nacimiento a bajas temperaturas.
- La magnitud de la respuesta a LPS será menor en individuos inmunizados y que fueron aclimatados desde el nacimiento a bajas temperaturas.
- La masa corporal será menor en individuos inmunizados y aclimatados a altas temperaturas.

## OBJETIVO

Evaluar el efecto de la temperatura ambiental experimentada durante el desarrollo de los individuos sobre la generación de una respuesta inmune y los costos energéticos de dicha respuesta.

### Objetivos específicos:

- Determinar si existen diferencias en la respuesta a LPS (cambios conductuales, respuesta febril, niveles de citoquina inflamatoria) entre individuos aclimatados a dos temperaturas (15°C y 30°C) durante el desarrollo.
- Evaluar el efecto de la inmunización con LPS y la condición térmica experimentada durante el desarrollo (15°C y 30°C) en la tasa metabólica basal.
- Evaluar el efecto de la inmunización y la condición térmica experimentada durante el desarrollo (15°C y 30°C) sobre la masa corporal.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Captura y mantención de los animales*

Se capturaron hembras (n=29) y machos adultos (n=25) en Rinconada de Maipú (33°23'S, 70°31'W; 30 km al oeste de Santiago), zona central de Chile, en los meses de Abril y Mayo 2013. Los animales fueron trasladados al laboratorio, mantenidos en cajas individuales, con fotoperíodo 12L: 12O, a una temperatura ambiente de ( $T_a$ ) de  $22 \pm 2$  °C, por un periodo de un mes. El alimento consistió en alimento comercial de ratón y fue proporcionado *ad libitum*.

Las hembras fueron monitoreadas para determinar la fecha de apertura de la vulva. Una vez abierta, las hembras fueron trasladadas a jaulas de apareamiento y mantenidas con machos. Las hembras preñadas fueron trasladadas a jaulas individuales y pesadas diariamente y hacia el final del período de gestación (tres meses), las jaulas fueron chequeadas diariamente para detectar la presencia de crías. El día en que las crías fueron encontradas se registró como la fecha de nacimiento (día 0).

### *Aclimataciones e inmunizaciones*

Una vez comenzadas las pariciones, las hembras y sus crías fueron asignados al azar a una de dos condiciones experimentales. Un grupo fue aclimatado a 15°C (n=16), temperatura que se encuentra bajo la zona termoneutral y que ha sido reportada como una condición térmica que aumenta el gasto de energía y conducta de termorregulación y (Nuñez-Villegas y col., 2014). El segundo grupo fue aclimatado a 30°C (n=17),

temperatura que se encuentra dentro de la zona termoneutral (Rosenmann, 1977) y que por tanto no representa un desafío en términos termoregulatorios para esta especie. Las crías fueron aclimatadas desde el día 0 (D0) hasta el día 28 (D28), día que se encuentra comprendido en el período de destete para esta especie. En el día 28, las crías de ambas aclimataciones fueron separadas de la madre y trasladadas a una sala a temperatura ambiental ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ) y con fotoperíodo de 12L:12O.

Las inmunizaciones de ambos grupos se realizaron el día 30 (D30) después del nacimiento, donde un grupo fue desafiado con lipopolisacárido (LPS purificado de *Salmonella entérica*, Sigma;  $500\mu\text{g}/\text{kg}$ ) mientras que el otro grupo (grupo control) fue inoculado con suero salino, en un volumen de  $200\mu\text{l}$  por inoculación, administrados intraperitonealmente. El antígeno LPS, corresponde al componente inmunogénico de la pared celular de las bacterias gram negativas y se ha observado que induce shock séptico en roedores (Nemzek et al 2008). La utilización de LPS permite reproducir la respuesta de los individuos a una infección, sin los efectos replicativos de los patógenos. Así, los tratamientos experimentales fueron: LPS- $30^\circ\text{C}$  (n=9), LPS- $15^\circ\text{C}$  (n=9), Suero- $30^\circ\text{C}$  (n=8) y Suero- $15^\circ\text{C}$  (n=7). Todas las inoculaciones se realizaron entre las 18:00 y 19:00 horas y luego de realizadas, los animales fueron separados de acuerdo al tipo de tratamiento que recibieron. La masa corporal de las crías fue medida antes de la inoculación y 24 horas posteriores al desafío, en una balanza digital ( $\pm 0.01\text{gr}$ ).

### *Temperatura corporal*

La temperatura corporal se registró con un termómetro laser digital marca VeraTemp Sin-Contacto ( $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ ) antes de realizar las inoculaciones y 12, 15, 19 y 24 horas después de realizado el desafío. La temperatura se midió en la zona abdominal.

### *Niveles de interleucina-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )*

Previo a las inoculaciones se extrajo una muestra de sangre de la vena safena lateral (UBC Animal Care Guidelines). A las 36 horas posteriores al desafío se extrajo una nueva muestra de sangre. Estas muestras fueron centrifugadas por 6 min a 15000rpm en una centrifuga Boeco M-240. Se extrajo el suero y se reservó para los análisis de los niveles de IL-1 $\beta$ . Los niveles de IL-1 $\beta$  fueron estimados en el suero mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Pocillos de placas de microtitulación de 96 pocillos fueron recubiertos durante la noche con un anticuerpo de captura monoclonar (Life Technologies). Las placas luego fueron bloqueadas por una hora con PBS que contenía 1% de BSA, 5% sacarosa y 0.05% NaN<sub>3</sub>. Las muestras de suero fueron diluidas en PBS, y colocadas en los pocillos en duplicado e incubadas por 2h a temperatura ambiente. Luego, se agregaron anticuerpos de detección monoclonales (Life Technologies) y se incubó nuevamente por 2h. A continuación, una solución (mezcla 1:1 de tetrametilbencidina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) fue agregada a cada pocillo, para luego detener la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N después de 20 min. La absorbancia de las placas se midió a 450nm con una corrección de la longitud de onda a 540nm usando un lector de placas de ELISA automatizado. Todos los lavados fueron hechos con PBS complementado con Tween 20 (0.05%).

### *Conducta asociada a enfermedad*

Para evaluar la conducta de enfermedad correspondiente a la respuesta de fase aguda, se realizan videos de las crías de los cuatro tratamientos con una cámara grabadora (Handycam HDR CX220) montada en un trípode y localizada frente a las cajas. Las grabaciones duraron 30 minutos y se realizaron a las 15 horas posteriores al desafío inmune. Se realizó un registro de las siguientes conductas: 1) agazapado, definido como el cuerpo encorvado hacia abajo con la cabeza baja y las extremidades (número de veces que el animal permanecía un período de 60 segundos agazapado) 2) locomoción, movimiento del animal de un extremo a otro de la jaula (número de veces) y 3) ojos cerrados, (número de veces que permanecía con los ojos cerrados por un período de 30 segundos). No existen registros previos de la existencia de la conducta de enfermedad en degus, ni tampoco que las crías de esta especie exhiban la conducta de agazapado, ojos cerrados o disminución en la locomoción como parte de la respuesta de fase aguda. Sin embargo, estas tres conductas han sido registradas como relevantes en el contexto de la respuesta de fase aguda en crías de cobayos (Hennesy y col., 2004).

### *Tasa metabólica basal*

Se determinó el consumo oxígeno ( $VO_2$ ) a las 24 h antes y 24 h después de realizar desafío inmune. La tasa metabólica basal (TMB) se determinó en la fase de descanso del ritmo de actividad de la especie, en individuos postabsortivos, mediante un sistema de respirometría de flujo abierto (Sable Systems) computarizado (Datacan V) calibrado con una mezcla de oxígeno conocida (20%) y nitrógeno (80%) certificado por cromatografía

(INDURA, Chile). Las determinaciones individuales se realizaron en cámaras de vidrio, en oscuridad, a temperatura ambiente correspondiente a termoneutralidad, i.e.,  $30 \pm 0.5$  °C (Novoa, 1993; Rosenmann 1977). Las cámaras metabólicas recibieron aire seco a una tasa de 750 a ml/min desde un controlador de flujo (Sierra Instruments) para asegurar una mezcla adecuada en la cámara. El aire fue secado antes y después de la cámara y monitoreado cada 5s mediante un Analizador de Oxígeno 1FC-1B (Sable System). El CO<sub>2</sub> se retiró antes de entrar al analizador de O<sub>2</sub> y el consumo de oxígeno se calculó utilizando la ecuación de Withers (1977: p 122):  $V.O_2 = [FR*60*(F_i O_2 - F_e O_2)]/(1-F_i O_2)$ , donde FR es la tasa del flujo en ml/min después de la corrección. STP, F<sub>i</sub> y F<sub>e</sub> son las fracciones de concentración de O<sub>2</sub> al ingreso y salida de la cámara metabólica, respectivamente.

#### *Análisis estadístico*

Previo a los análisis de los efectos de aclimatación y desafío inmune sobre las variables dependientes, se evaluó el efecto del sexo mediante un análisis de varianza (ANOVA) sobre todas las variables estudiadas. EL efecto de la temperatura ambiental y el tipo de desafío sobre el cambio en masa se evaluó mediante un análisis de varianza de dos vías. Para evaluar las diferencias específicas se utilizó la prueba *a posteriori* de Tukey. La temperatura corporal de los cuatro tratamientos se comparó durante un período de 12 h después de cada inoculación. Para ello se utilizó un anova de medidas repetidas de dos vías (con el efecto de la temperatura, tipo de desafío y el tiempo como factores principales). Para evaluar las diferencias específicas se utilizó el test *a posteriori* de Tukey.

El efecto de la temperatura de aclimatación y del tipo de desafío sobre los niveles de IL-1 $\beta$  fue evaluado mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA). Para evaluar las diferencias específicas se utilizó la prueba *a posteriori* de Tukey.

Las variables conductuales se analizaron mediante análisis paramétricos y no paramétricos. El efecto de la temperatura ambiental y el tipo de desafío inmune sobre la locomoción y el agazapamiento fueron evaluados mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA). Para evaluar las diferencias específicas se utilizó la prueba *a posteriori* de Tukey. El número de veces que los animales permanecieron con los ojos cerrados fue evaluado mediante la transformación de rangos alineados (ART; Wobbrock y col., 2001). Esta aproximación permite análisis factoriales de datos no paramétricos, incluyendo la interacción entre factores, primero realizando una transformación que alinea los datos para cada efecto, y luego un ranking de los datos. Los datos alineados y ranqueados fueron luego analizados mediante un análisis de varianza factorial. Para evaluar las diferencias específicas se utilizó la prueba *a posteriori* de Tukey.

Para evaluar el efecto del desafío inmune y de la temperatura sobre la TMB antes y después de realizado el desafío (0h y 24h), se realizó un análisis de covarianza de medidas repetidas de dos vías (RM-ANCOVA), siendo la masa corporal la covariable. Para evaluar las diferencias específicas se utilizó el test *a posteriori* de Tukey. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statistica 7 para Windows. Los resultados son presentados con el promedio  $\pm$  error estándar.

## RESULTADOS

### *Análisis de Normalidad*

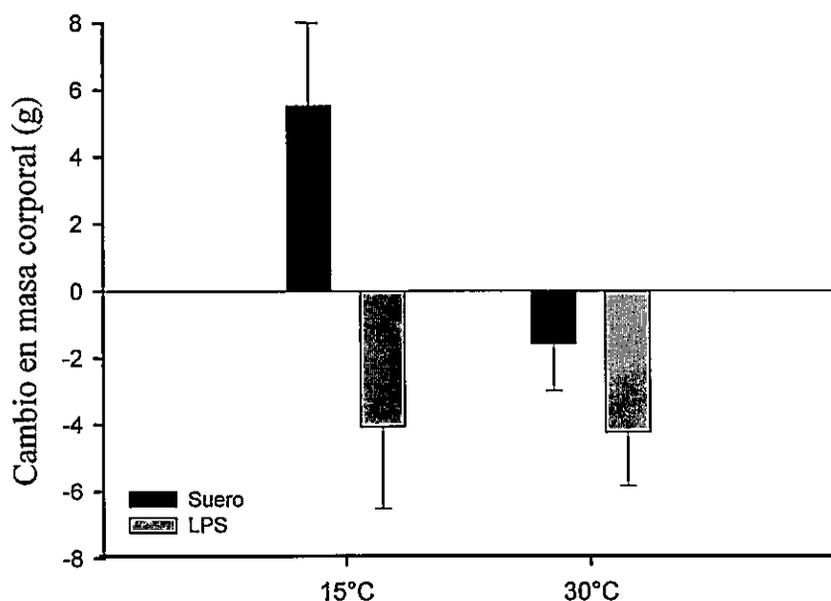
Previo a los análisis, se evaluó la normalidad de los datos mediante pruebas de Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors y Shapiro-Wilk. La masa corporal de las crías aclimatadas a 15°C y 30°C, tasa metabólica basal y niveles de IL-1b fueron transformando usando la función logaritmo para cumplir con el supuesto de normalidad. La temperatura corporal fue transformada usando la función inversa (1/X), mientras que las variables conductuales fueron evaluadas con estadística no paramétrica.

### *Cambios en masa corporal y tasa metabólica basal (tmb).*

La masa corporal no presentó diferencias significativas entre sexos antes del desafío (ANCOVA:  $F_{1,29} = 0.007$ ;  $p=0.94$ ). La mb inicial (previa al desafío inmune) fue afectada de manera significativa por la aclimatación (ANCOVA-MR:  $F_{1,18} = 7.16$ ;  $p=0.015$ ), donde las crías que crecieron a 15°C presentaron una menor masa corporal (prueba de *Tukey*  $p<0.05$ ; Tabla 1). Después de realizado el desafío, se encontró un efecto significativo de la aclimatación (ANOVA-MR:  $F_{1,18} = 10.55$ ;  $p=0.004$ ) y tipo de desafío (ANCOVA-MR:  $F_{1,18} = 59.04$ ;  $p<0.0001$ ), donde las crías desafiadas con LPS perdieron 2.7% de la masa corporal inicial (prueba de *Tukey*  $p<0.05$  Fig. 1). La interacción entre aclimatación y el tipo de desafío mostró soloun efecto marginal (ANCOVA-MR:  $F_{1,18} = 3.34$ ;  $p=0.08$ ).

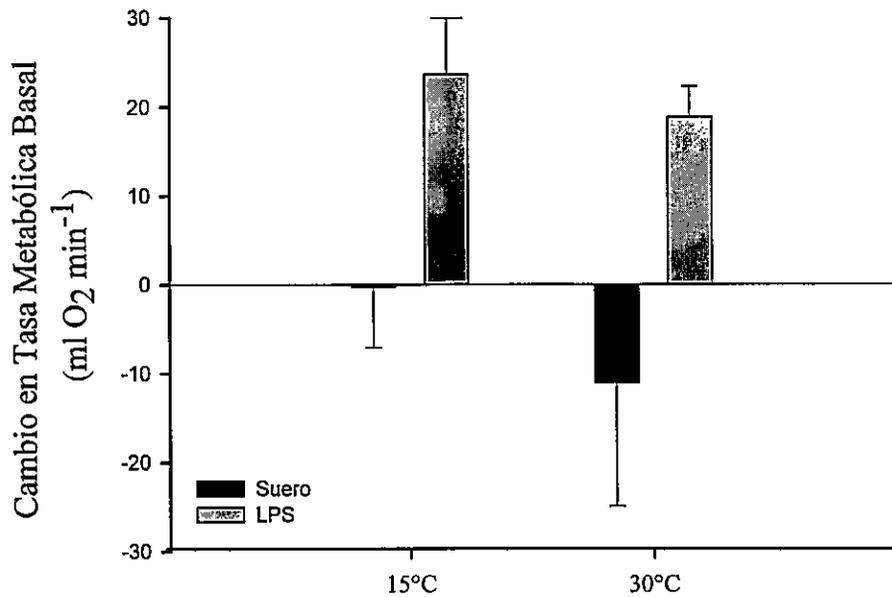
**Tabla 1.** Masa corporal y tasa metabólica basal (TMB) medidos antes (0h) y después (24h) del desafío con LPS, en crías aclimatadas a 15°C y 30°C. Valores se expresan como promedio  $\pm$  error estándar.

<b>Temperatura-Desafío</b>	<b>n</b>	<b>Masa corporal 0h</b>	<b>Masa corporal 24h</b>	<b>TMB 0h</b>	<b>TMB 24h</b>
30°C-LPS	9	76.75 $\pm$ 6.01	72.52 $\pm$ 6.1	81.56 $\pm$ 8.53	100.47 $\pm$ 7.76
30°C-Suero salino	8	73.37 $\pm$ 6.77	71.79 $\pm$ 5.81	80.18 $\pm$ 11.4	78.17 $\pm$ 7.72
15°C-LPS	9	53.79 $\pm$ 2.59	49.73 $\pm$ 1.04	56.16 $\pm$ 5.05	79.83 $\pm$ 5.37
15°C-Suero salino	7	52.07 $\pm$ 3.24	57.6 $\pm$ 3.26	70.19 $\pm$ 8.55	69.87 $\pm$ 6.23



**Figura 1.** Cambio en masa corporal de crías de *O. degus*, desafiadas con LPS y control y aclimatadas a dos temperaturas ambientales (15° y 30°C)

No se encontró un efecto significativo del sexo sobre la TMB (ANOVA:  $F_{1,29}=0.57$ ;  $p=0.46$ ), por lo que los análisis posteriores se realizaron agrupando sólo por tratamiento. No se observó una diferencia significativa de la aclimatación térmica sobre la TMB (ANOVA-MR:  $F_{1,28}=0.14$ ;  $p=0.71$ ). Sin embargo, la TMB fue afectada de manera significativa por el tipo de desafío (ANOVA-MR:  $F_{1,28}=11.51$ ;  $p=0.002$ ), donde el desafío con LPS produjo un incremento de un 28% en el gasto energético de las crías aclimatadas a 30°C y de un 14% para las crías aclimatadas a 15°C (*test de t*:  $p=0.15$ ; tabla 1), respecto de lo observado en las crías tratadas con suero salino (Fig. 2). Por último, no se observó un efecto significativo de la interacción entre aclimatación y tipo de desafío (ANOVA-MR:  $F_{1,28}= 1.76$ ;  $p=0.19$ ).



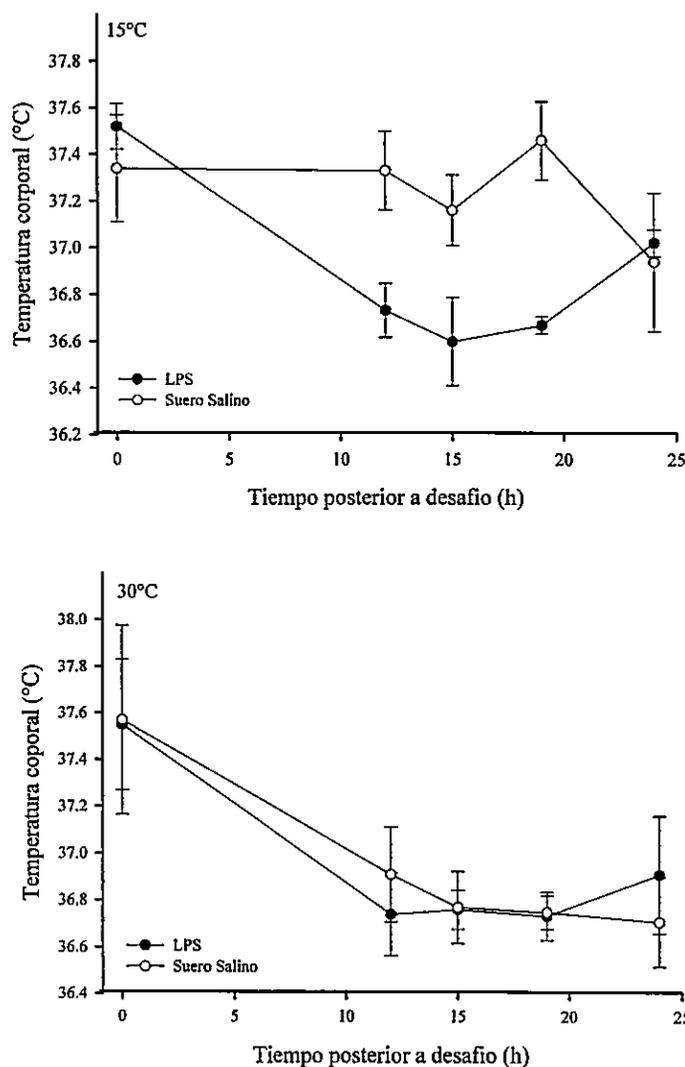
**Figura 2.** Cambio en tasa metabólica basal de crías de *O. degus*, desafiadas con LPS y control y aclimatadas a dos temperaturas ambientales (15°C y 30°C).

#### *Temperatura corporal y niveles de IL-1 $\beta$*

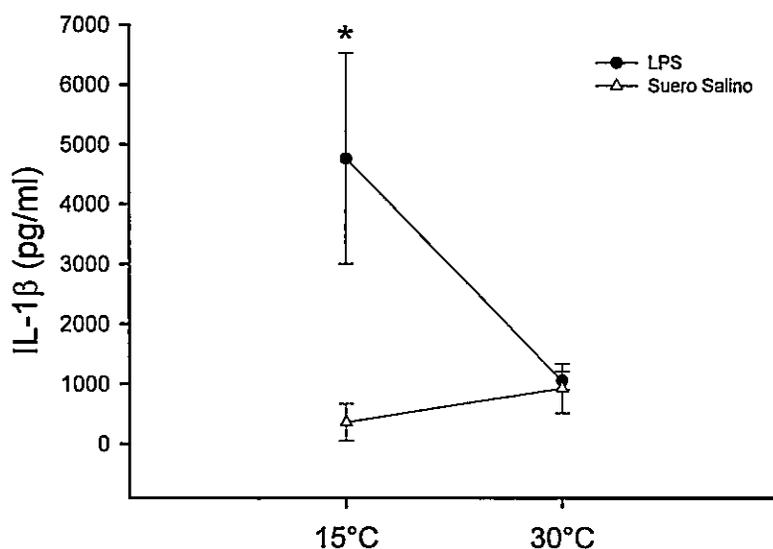
La comparación de la temperatura corporal en un intervalo de 24h posteriores al desafío inmune reveló un efecto significativo de la interacción entre la hora posterior al desafío y el tipo de desafío sobre esta variable (ANOVA-MR:  $F_{4,72}=2.75$ ;  $p=0.03$ ). El análisis *a posteriori* reveló que a las 19h posteriores al desafío, las crías inmunizadas con LPS presentaron las menores temperaturas corporales (Fig. 3). No se observó un efecto significativo de la interacción entre la hora post-desafío y aclimatación (ANOVA-MR:  $F_{4,72}=1.8$ ;  $p=0.14$ ) o de la interacción entre estas variables (ANOVA-MR:  $F_{4,72}=1.4$ ;  $p=0.24$ ) sobre la temperatura corporal.

No se encontraron diferencias entre machos y hembras en los niveles de la citoquina IL-1 $\beta$  (ANOVA:  $F_{1,26}=0.009$ ;  $p=0.92$ ), por lo que no se realizaron análisis por separado para cada sexo. Se observó un efecto significativo de la interacción entre la

temperatura de aclimatación y el tipo de desafío sobre los niveles de IL-1 $\beta$  (ANOVA:  $F_{1,16}=7.46$ ;  $p=0.01$ ). Específicamente, los niveles de esta citoquina fueron mayores en las crías aclimatadas a 15°C y que fueron desafiadas con LPS (test de *Tukey*  $p<0.05$ ; Fig. 4)



**Figura 3.** Temperatura corporal registrada a las 12, 15, 19 y 24 horas posteriores al desafío con LPS (círculos cerrados) o inoculación de suero salino (círculos abiertos) en crías de *O. degus* aclimatadas a dos temperaturas distintas, 15°C (panel superior) y 30°C (panel inferior). Las inoculaciones comenzaban a las 19:00, correspondiente a la hora 0.

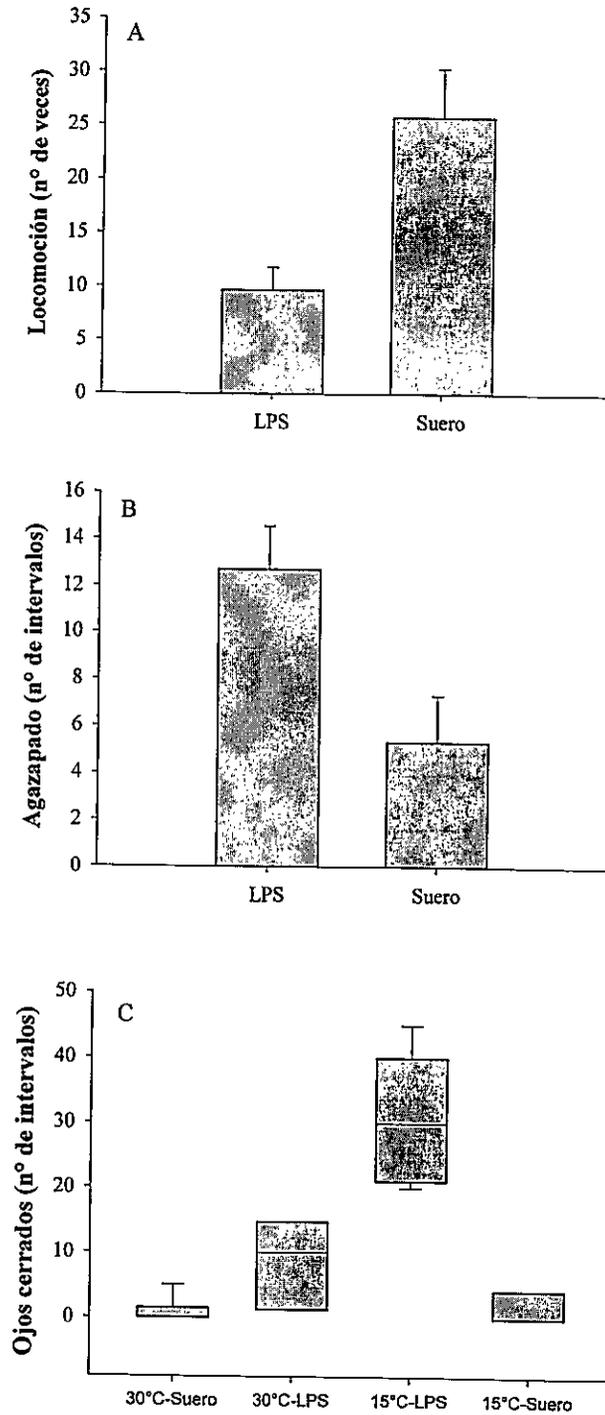


**Figura 4.** Niveles de IL-1 $\beta$  de crías de *O. degus*, desafiadas con LPS (círculos cerrados) o tratadas con suero salino (círculos abiertos) y aclimatadas a dos temperaturas (15°C y 30°C).

#### *Conducta de enfermedad*

El análisis de la conducta de las crías reveló que ninguna de las conductas evaluadas, locomoción, intervalos agazapado y ojos cerrados, presentaron diferencias entre sexos (ANOVA:  $F_{1,30}=0.0001$ ;  $p=0.99$ ;  $F_{1,30}=1.49$ ;  $p=0.23$ ; Kruskal-Wallis:  $H_{(1,n=32)}=0.54$ ;  $p=0.46$ ; respectivamente). Se observó que el desafío con LPS produjo una reducción significativa de la locomoción (ANOVA:  $F_{1,29}=13.76$ ,  $p=0.0009$ ; Fig. 5a); sin embargo, la aclimatación solo tuvo un efecto marginal (ANOVA:  $F_{1,29}=13.76$ ,  $p=0.06$ );. La interacción entre aclimatación y desafío inmune no afectó de manera significativa esta conducta (ANOVA:  $F_{1,29}= 1.11$ ;  $p=0.3$ ). Se observó que las crías desafiadas con LPS incrementaron los intervalos agazapados (ANOVA:  $F_{1,29}=10.23$ ,  $p=0.003$ ; Fig. 5b). No se observó de la aclimatación sobre el número de intervalos agazapado (ANOVA:  $F_{1,29}=2.92$ ,  $p=0.09$ ), de igual manera, el efecto de la interacción entre tipo de desafío y

aclimatación tampoco fue significativo (ANOVA:  $F_{1,29}=0.26$ ,  $p=0.62$ ). Debido a que el número de veces que los animales permanecieron con los ojos cerrados presentó una gran cantidad de eventos con frecuencia igual a cero, se utilizó una prueba no paramétrica. El análisis de varianza de dos vías con un procedimiento de ART (ver metodología) mostró un efecto significativo de la aclimatación (ANOVA:  $F_{1,29}=60.4$ ,  $p<0.0001$ ), donde las crías que crecieron a 15°C mostraron mayor número de intervalos con los ojos cerrados. El desafío con LPS provocó un aumento significativo del número de veces que las crías permanecieron con los ojos cerrados (ANOVA:  $F_{1,29}=103.67$ ,  $p<0.0001$ ). Por último, se observó un efecto significativo de la interacción (ANOVA:  $F_{1,29}=26.78$ ,  $p<0.0005$ ; Fig. 5c), donde las crías aclimatadas a 15°C y desafiadas con LPS presentaron el mayor número de intervalos con los ojos cerrados (prueba de *Tukey*  $p<0.05$ )



**Figura 5.** Conducta asociada a enfermedad. A) Locomoción, B) estado agazapado y C) intervalos con los ojos cerrados. Los registros se realizaron después de realizado el desafío con LPS (barras negras) o suero salino (barras grises) en crías de *O. degus* aclimatadas a 15°C y 30°C.

## DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó si la exposición a bajas temperaturas (15°C) se traducía en una atenuación de la respuesta inmune en crías de *Octodon degus* desafiadas con LPS, comparado con crías aclimatadas a una temperatura dentro de la zona termoneutral (30°C). Debido a los costos energéticos de la respuesta inmune, la exposición a bajas temperaturas significaría una reducción en la magnitud de la respuesta; sin embargo no encontramos evidencia que mostrara dicha reducción.

### *Niveles de IL-1 $\beta$ y cambios en la temperatura corporal.*

Las citoquinas interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) son citoquinas modificadores de la inflamación, y son esenciales para la activación óptima de la defensa de los organismos y la supervivencia en respuesta a la infección (Cross y col., 1995; Leon y col., 1998). En este estudio, sólo evaluamos la expresión de IL-1 $\beta$ , ya que reportes previos han documentado que *Octodon degus* carece de IL-6 (Nemzek, y col., 2003). Nuestros resultados mostraron que las crías aclimatadas a 15°C y desafiadas con LPS, presentaron los mayores niveles de IL-1 $\beta$ . Sin embargo, dicho incremento no se observó en las crías aclimatadas a 30° y desafiadas con el mismo antígeno. La IL-1 $\beta$  es una citoquina producida por células como macrófagos, fibroblastos y células endoteliales, que se encuentra relacionada con el proceso inflamatorio (Shirakawa y col., 1993), induciendo la coagulación, respuesta febril y un aumento de la permeabilidad vascular (Dinarello, 1997, 2004; Ohlsson y col.,

1990). Sin embargo, su sobreproducción se relaciona con un shock séptico y muerte, tanto en animales como en humanos (Natanson y col., 1989; Rees y col., 1990). Fairchild y col. (2000) reportaron que a temperaturas cercanas a 37°C, se produce una explosión/supresión de la producción de citoquinas pro-inflamatorias, entre ellas IL-1 $\beta$ , a modo de evitar una exposición prolongada a los efectos potencialmente citotóxicos de estas citoquinas. De esta manera, es posible que la exposición de las crías a 30°C provoque una reducción en la producción de IL-1 $\beta$ , a modo de evitar una expresión desregulada de esta citoquina y, por lo tanto, provocar daño celular, shock séptico y la muerte del animal (Muñoz y col., 1991; Tracy y col., 1990).

Al igual que lo observado en la conducta de ojos cerrados, estos resultados sugieren que la exposición a bajas temperaturas tendría un efecto estimulador más que supresor en la respuesta a LPS. Concordante con nuestros resultados, son variados los estudios que reportan un efecto estimulador de las bajas temperaturas en la respuesta inmune tanto en individuos adultos (Kaunisto y col., 2015; Zhang y col., 2015) como en crías (Henken y col., 1983a; Taxton y col., 1978). En esta vía, Demas y Nelson (1996) y posteriormente Sinclair y Lochmiller (2000) proponen la hipótesis de mejoramiento inmunológico en invierno. Esta hipótesis plantea que muchos mamíferos pequeños que experimentan condiciones térmicas desfavorables durante el invierno, han evolucionado hacia estrategias de historia de vida donde algunas funciones son suprimidas mientras se produce un mejoramiento de la función inmune. Así, animales que experimentan inviernos no tan severos se encontrarían expuestos un estrés térmico mas atenuado, lo que permitiría mantener una función inmune normal (no suprimida; Demas y Nelson

1996). De esta manera, es posible que la temperatura de 15°C experimentada por las crías en este estudio, no represente un desafío térmico severo, resultando en un posible efecto potenciador de la temperatura sobre la función inmune. Henken y col. (1983a) proponen que para que exista una influencia supresora de las condiciones térmicas sobre la respuesta inmune en organismos que se encuentran desarrollo, las temperaturas ambientales tendrían que ser más extremas (bajo los 15°C), debido a que el efecto de la temperatura sobre la función inmune dependería de la capacidad de los individuos de mantener la homotermia, como consecuencia de la existencia de compromisos entre estas dos funciones biológicas. Por último, y apoyando la hipótesis expuesta anteriormente, la falta de incremento en los niveles de IL-1 $\beta$  en los individuos aclimatados a 30°C y desafiados con LPS, comparado con los individuos control, parece evidenciar la existencia de un efecto supresor de las temperaturas elevadas. Resultados similares han sido observados en polluelos de gallina (Thaxton, 1978), en donde temperaturas cercanas a los 32°C producen una reducción de los niveles de anticuerpos. Si bien la temperatura seleccionada en este estudio se encuentra dentro de la zona termoneutral reportada para adultos de *O. degus* (Rosenmann, 1977), es posible que dicha zona no sea la misma en individuos que se encuentran en desarrollo. Nosotros solo evaluamos el límite inferior de la zona termoneutral en crías, pero no tenemos conocimiento sobre cuál es la temperatura ambiental correspondiente al límite superior de la zona termoneutral.

A los 15°C, las crías desafiadas con LPS presentaron una disminución en la temperatura corporal, sin embargo esta disminución no fue significativa (Fig. 4). Las crías control no presentaron cambios en la temperatura corporal a lo largo del registro. A

los 30°C, tanto las crías desafiadas con LPS como el grupo control presentaron el mismo patrón de disminución de la temperatura corporal. El desafío con LPS en ratones, produce una reducción en la temperatura corporal (Nemzek y col., 2008; Remick y col., 2000), probablemente debido a la rápida progresión del estado de enfermedad y la gran relación de área superficial en estos pequeños animales (Nemzek y col., 2008; Remick y col., 2000). Sin embargo, diversos autores (Conrad y col., 1997; Rudaya y col., 2005) han reportado que ratas adultas son capaces de desarrollar fiebre cuando son mantenidas a altas temperaturas (31°C). Estos resultados sugieren que la generación de fiebre ocurriría cuando los individuos son capaces de termoregular de manera conductual. En este sentido, es posible que la temperatura ambiental (23°C; ver metodología) a la cual se encontraban las crías al momento del desafío inmune pudiese influir sobre el desarrollo de la respuesta febril en degus. Sin embargo, las crías control aclimatadas a 30°C experimentaron el mismo descenso en la temperatura corporal, mientras que las crías control aclimatadas a 15°C no mostraron dicha disminución, por lo que no es posible asegurar que el patrón observado en la temperatura corporal sea debido a la temperatura ambiental. Por otra parte, se ha reportado que en algunas especies de roedores, la respuesta febril a LPS depende de la dosis administrada. Así, bajas dosis de LPS resultarían en hipertermia mientras que dosis más elevadas resultarían en hipotermia (Rudaya y col., 2005). La dosis utilizada en este estudio fue estimada de la única investigación realizada en degus, utilizando LPS como antígeno (Nemzek, y col., 2003). Sin embargo, el LPS se administró en muestras *in vitro* e *in vivo*, y los individuos fueron sacrificados inmediatamente después de administrado el LPS, por lo

que no es posible descartar que la dosis utilizada en el presente estudio fue lo suficientemente alta como para causar una respuesta de hipotermia.

Por último, Romanovsky y Szekely (1998) argumentan que tanto la hipertermia como la hipotermia representarían dos estrategias diferentes para combatir una inflamación sistémica, siendo cada una desarrollada como una respuesta adaptativa a las condiciones ambientales. Así bajo condiciones de baja productividad ambiental, la hipotermia representaría una respuesta adaptativa en roedores (Martin y col., 2008a).

#### *Cambios en la masa corporal y tasa metabólica basal*

La masa corporal de las crías fue afectada por la temperatura ambiental previa al desafío, siendo las crías que crecieron a 15°C las que presentaron una menor masa corporal. Una vez realizado la inmunización con LPS, la pérdida de masa corporal tanto en las crías que crecieron a 30°C como a 15°C fue similar. La falta de efecto de la interacción entre temperatura de aclimatación y desafío sobre la masa corporal, se debe posiblemente al estado corporal inicial de las crías, lo que ha sido documentado previamente (Lennie, 1998). Las crías aclimatadas a 15°C presentaron masas corporales 16% menores al momento de realizar el desafío inmune sugiriendo que su estado corporal inicial no sería igual al de las crías que crecieron a 30°C. Esto se traduciría en que después de realizar el desafío inmune, las crías aclimatadas a 30°C redujeran su masa corporal en el porcentaje esperado por el estímulo de LPS, debido a una posible reducción en la ingesta de alimentos (Lennie, 1998). En este sentido, las crías aclimatadas a 15°C ya presentarían una reducción previa en la masa corporal al momento de realizar el desafío, por lo tanto, la ingesta de alimento por parte de estas crías no se reduciría de una manera similar a las

crías aclimatadas a 30°C, de manera de mantener la masa corporal a este nivel previamente reducido (Lennie, 1998). Estudios previos han reportado que ratas con una malnutrición de proteínas reducen solo en un 1% su ingesta de alimentos, mientras que ratas normales la reducción fue de un 48% después de inducir una inflamación aguda (Jenning y Elia, 1998). Sin embargo, no contamos con datos sobre las tasas de ingesta de alimento, por lo que no es posible asegurar que las crías aclimatadas a 30°C presentaron las mayores reducciones en la ingesta de alimento comparado con las crías aclimatadas a 15°C.

En crías de *O. degus*, un desafío con LSP resultó en un incremento de un 28.5% de la tasa metabólica basal para las crías que crecieron a 30°C y 14.3% para las crías aclimatadas a 15°C, con respecto a las crías control. Demas y col. (1997) encontraron que en ratones adultos la respuesta a la hemocianina de *fisurella* (KLH) produce un aumento de un 27% de la tasa metabólica de reposo. Sin embargo, Pilorz y col. (2005), han reportado que la tasa metabólica para crías de cobayo desafiadas con KLH se mantiene invariante. El incremento de la tasa metabólica basal en nuestro estudio se encuentra dentro de los valores reportados previamente para individuos adultos (Demas y col., 1997; Schmid-Hempel, 2011). En este sentido, se ha argumentado que el incremento de los costos energéticos en respuesta a un antígeno inmunogénico podría deberse a la generación de la respuesta inmune, entre ellos la generación de la respuesta de fase aguda (Martin y col., 2008b) o a la generación de la respuesta febril (Kluger, 1991). De esta manera, elevar la temperatura corporal en 1°C involucra un incremento de un 10% de la tasa metabólica (Kluger, 1991). Sin embargo, no se observó un incremento de la temperatura corporal, en respuesta a LPS. Por lo tanto, el incremento

observado en la tasa metabólica podría ser principalmente el resultado de la producción de proteínas de fase aguda más que la generación de una respuesta febril (Borel y col., 1998; Klasing, 2004).

En nuestro estudio, esperábamos encontrar un efecto de la temperatura ambiental sobre la TMB. En este sentido, las crías mantenidas a 15°C presentarían los menores incrementos comparados con los animales mantenidos a 30°C. Sin embargo, el incremento en la tasa metabólica de ambos tratamientos no fue significativamente distinto (tabla 1). La carencia de un efecto de la temperatura ambiental sobre el metabolismo de animales desafiados con LPS podría deberse al tiempo o a la magnitud de la exposición a esa condición ambiental. Se ha reportado que en ratones adultos, una exposición prolongada al frío resultaría en una supresión de la respuesta inmune, debido a los ajustes en las capacidades termoregulatorias (Cichon y col., 2002). Sin embargo, es posible que en crías el fenómeno sea contrario, donde una exposición prolongada a cierta condición ambiental involucre un mayor grado de aclimatación y por tanto una menor susceptibilidad a factores estresores (Thaxton, 1978). Así, la aclimatación desde el nacimiento hasta el destete podría involucrar la mantención de un margen energético seguro en caso de presentarse demandas energéticas inesperadas (Diamond y Hammond, 1992). Por lo tanto, es posible que la aclimatación a 15°C resulte en mayores capacidades de reservas energéticas para estas crías. Por otra parte, y como se ha mencionado anteriormente, los efectos de la temperatura ambiental sobre las tasas metabólicas serían marcadas solo cuando las capacidades del animal para mantener la homeotermia son afectadas (Henken y col., 1983a). Así, es posible que a una temperatura de 15°C la capacidad termoregulatoria no sea afectada, por lo tanto el

requerimiento de energía para dicha función no sea incrementado. Además, la permanencia de las madres con las crías durante el período de aclimatación podría estar enmascarando posibles efectos de la temperatura ambiental. No obstante, no es posible restar el efecto de las madres a la aclimatación de las crías, ya que la separación produce cambios fisiológicos y conductuales similares a los observados en una respuesta frente a un antígeno (Hennesy y col., 2004).

### *Conducta de enfermedad*

Nuestros resultados presentan evidencia de la existencia de un efecto significativo a nivel conductual en respuesta a un antígeno no patogénico en *O. degus*. Específicamente, la inoculación con LPS resultó en un incremento del estado agazapado y una disminución en la locomoción. Hasta la fecha, este es el primer estudio que evalúa la existencia de una conducta estereotipada asociada a enfermedad en *degus*. Los cambios conductuales, como los registrados en este estudio, han sido descritos previamente en otros trabajos realizados en otros roedores precociales (Hennesy y col., 2004) y en aves (Burness y col., 2010). En estos estudios, se ha documentado que los individuos desafiados con LPS presentan una disminución en la locomoción y un aumento en la actividad de descanso (agazapado). Específicamente, en cuyes (*Cavia porcellus*; Hennesy y col., 2004), se ha reportado que crías desafiadas con LPS presentan una disminución en la locomoción y un aumento en la posición agazapada. La disminución en la actividad y el aumento en los estados de reposo podrían tener una función adaptativa si permiten a los individuos superar la infección y por tanto, aumentar la posibilidad de supervivencia (Hart 1988; Wingfield, 2003). En

consecuencia, una reducción en la actividad locomotora podría permitir conservar energía y utilizarla en la reparación de tejidos durante el transcurso de la infección o permitir la fiebre (Hart, 1988). En el presente estudio, tanto la locomoción como los intervalos agazapados no fueron afectados por la interacción entre la temperatura de aclimatación y el desafío con LPS, siendo el número de veces con los ojos cerrados la única conducta de enfermedad afectada por dicha interacción. Así, las crías que crecieron a 15°C y desafiadas con LPS, mostraron un mayor número de intervalos con los ojos cerrados sugiriendo un efecto positivo de las bajas temperaturas en algunos componentes de la respuesta de fase aguda.

El efecto de la temperatura ambiental sobre la conducta de enfermedad ha sido reportado en algunas especies en estado adulto, pero los efectos observados han sido de manera opuesta a lo observado en nuestros resultados. Por ejemplo, se ha observado que aves adultas aclimatadas a 34°C y desafiadas con LPS disminuyeron el acicalamiento comparado con individuos aclimatados a 15°C, sugiriendo la existencia de un compromiso entre termorregulación y función inmune (Burness y col., 2010). Sin embargo, en nuestro estudio dicho compromiso no fue observado. La falta de detección de un efecto de la interacción (desafío x temperatura) sobre la locomoción y el tiempo en reposo, podría ser causado por la limitación producida por el poco tiempo de duración de nuestras grabaciones (30 min). Sin embargo, las observaciones realizadas por este corto período de tiempo fueron suficientes para detectar un efecto del LPS en las tres conductas analizadas, por lo que dicha limitación podría ser descartada.

En resumen, nuestros resultados sugieren que en individuos que se encuentran en desarrollo la temperatura ambiental representaría un factor clave en algunos componentes de la respuesta a LPS. En este sentido, y contrario a lo esperado, la exposición a bajas temperaturas parece potenciar la producción de la citoquina IL-1 $\beta$ . Sin embargo, este aumento en los niveles de esta citoquina no se relaciona con un aumento en la TMB. Es posible, que los regímenes dietarios experimentados por nuestras crías pudiesen estar enmascarando los posibles efectos de la temperatura ambiental. En polluelos de *Riparia riparia* (Brz $\acute{e}$ k y Konarzewski, 2007), los costos de la función inmune dependen de factores ambientales como la disponibilidad de alimento. El hecho que en el presente estudio el alimento se proporcionó *ad libitum* podría explicar la ausencia de efectos de la temperatura ambiental sobre la mayoría de las variables analizadas. Futuras investigaciones deberán tomar en consideración el posible efecto de la calidad de la dieta y la ingesta calórica sobre la función inmune y su posible interacción con otras variables ambientales.

## REFERENCIAS

- Aubert A. 1999. Sickness and behaviour in animals: a motivational perspective. *Biobehav. Rev.* 23:1029–36.
- Alcorn SW, Murray AL, Pascho RJ. 2002. Effects of rearing temperature on immune functions in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Fish Shellfish Immunol.* 12: 303 – 334.
- Barnett SA, Mount LE. 1967. Resistance to cold in mammals. En *Thermobiology*, (Rose, AS. ED) Academic Press: London.
- Begon M, Townsend CR, Harper JL. 2006. *Ecology: From Individuals to Ecosystems* Blackwell Pub, 4th ed.
- Best EV, Schwartz MD. 2014. Fever. *Evolu Med Pub Health* 1: 92.
- Blackburn WD. 1994. Validity of acute phase proteins as markers of disease activity. *J. Rheumatol.* 21: 9-13.
- Bonneaud C, Mazuc J, Gonzalez G, Haussy C, Chastel O, Faivre B, Sorci G. 2003. Assessing the cost of mounting an immune response. *Am. Nat.* 161:367–379.
- Borel MJ, Buchowski MS, Turner EA et al. 1998. Alterations in basal nutrient metabolism increase resting energy expenditure in sickle cell disease. *Am. J. Physiol Endocrinol Metab* 274: E357–E364.
- Brzęk P, Konarzewski M. 2007. Relationship between avian growth rate and immune response depends on food availability. *J. Exp. Biol.* 210: 2361-2367.
- Buchanan JB, Peloso E, Satinoff E. 2006. Influence of ambient temperature on peripherally induced interleukin-1 $\beta$  fever in young and old rats. *Physiol. Behav.* 88: 453–458.
- Buchanan JB, Peloso E, Satinoff E. 2003. Thermoregulatory and metabolic changes during fever in young and old rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285: R1165–R1169.
- Burness G, Armstrong C, Feel T, Tilman-Schindel E. 2010. Is there an energetic-based trade-off between thermoregulation and the acute phase response in zebra finches? *J. Exp. Biol.* 213: 1386-1394.
- Cabanac M. 1975. Temperature Regulation. *Ann. Rev. Physiol.* 37: 415-439.

- Chaffee RRJ, Roberts JC. 1971. Temperature Acclimation in Birds and Mammals. *Ann. Rev. Physiol.* 33: 155-202.
- Cichon M, Chadzin M, Ksia A, Konarzewski M. 2002. Delayed effects of cold stress on immune response in laboratory mice. *Proc. R. Soc. Lond. B* 269: 1493-1497.
- Conrad A, Bull DF, King MG, Husband AJ. 1997. The Effects of Lipopolysaccharide (LPS) on the Fever Response in Rats at Different Ambient Temperatures. *Physiol. Behav.* 62: 1197-1201.
- Cooper EH, Ward AH, 1979. Acute phase reactant proteins as aids to monitoring disease. *Invest. Cell. Pathol.* 2: 293-301.
- Cross A, Asher L, Seguin M, Yuan L, Kelly N, Hammack C, Sadoff J, Gemski P Jr. 1995. The importance of a lipopolysaccharide-initiated, cytokine-mediated host defense mechanism in mice against extraintestinally invasive *Escherichia coli*. *J Clin Invest* 96: 676-686.
- Dabbert CB, Lochmiller RL, Teeter RG. 1997. Effects of acute thermal stress on the immune system of the northern bobwhite (*Colinus virginianus*). *Auk* 110: 103-109.
- Deerenberg C, Arpanus V, Dann S, Bos N. 1997. Reproductive effort decreases antibody responsiveness. *Proc. R. Soc. Lond. B* 264: 1021-1029.
- Demas GE, Chefer V, Talan MI, Nelson RJ. 1997. Metabolic costs of mounting an antigen-stimulated immune response in adult and aged C57BL/6J mice. *Am. J. Physiol.* 273: R1631-R1637.
- Demas G, Greives T, Chester E, French S. 2011. The energetic of immunity: mechanisms mediating trade-offs in ecoimmunology, pp 259-296, *En Ecoimmunology*, Ed. Demas G, Nelson R, Oxford University Press, Oxford.
- Diamond J, Hammond K. 1992. The matches, achieved by natural selection, between biological capacities and their natural loads. *Experientia* 48: 551-557.
- Dinarello CA. 1997. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* 112: 321S-329S.
- Dinarello CA. 2004. Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. *J. Endotox. Res.* 10: 201-222.

- Dawson WR, Marsh RL, Buttemer WA, Carey C. 1983a. Seasonal and geographic-variation of cold resistance in house Wnches *Carpodacus mexicanus*. *Physiol. Zool.* 56:353-369
- Fairchild KD, Viscardi RM, Hester L, Singh IS, Hasday JD. 2000. Effects of Hypothermia and Hyperthermia on Cytokine Production by Cultured Human Mononuclear Phagocytes from Adults and Newborns. *J. Interf. Cytok. Res.* 20:1049-1055.
- Fitze PS, Tschirren B, Richner H. 2004. Life history and fitness consequences of ectoparasites. *J. Anim. Ecol.* 73:216-226.
- Florez-Duquet M, Peloso E, Satinoff F. 2001. Fever and behavioral thermoregulation in young and old rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integ. Comp. Physiol.* 280: R1457-R1461.
- Fulk GW. 1976. Notes on the activity, reproduction, and social behavior of *Octodon degus*. *J. Mammal.* 57:495-505.
- Hangalapura, B.N., M.G. Nieuwland, G. De Vries Reilingh, M.J. Heetkamp, H. Van Den Brand, et al. 2003. Effects of cold stress on immune responses and body weight of chicken lines divergently selected for antibody responses to sheep red blood cells. *Poult. Sci.* 82: 1692-700.
- Hasselquist D, Nilsson JA. 2012. Physiological mechanisms mediating costs of immune responses: what can we learn from studies of birds? *Anim. Behav.* 83: 1303-1312.
- Hart BL. 1988. Biological basis of the behavior of sick animals. *Neurosci. Res. Rev.* 12: 151 -158.
- Hinsley SA, Ferns PN, Thomas DH, Pinshow B. 1993. Black-Bellied Sandgrouse (*Pterocles-Orientalis*) and Pin-Tailed Sandgrouse (*Pterocles alchata*)—Closely related species with diVering bioenergetic adaptations to arid zones. *Physiol. Zool.* 66:20-42.
- Henken AM, Groote Schaarsberg AMJ, Nieuwland MGB. 1983a. The effect of environmental temperature on immune response and metabolism of the young chicken. 3. Effect of environmental temperature on the humoral immune response following injection of sheep red blood cells. *Poult. Sci.* 62:51-58.
- Hennessy M, Deak T, Schiml-Webb PA, Wilson SE, Greenlee TM, McCall E. 2004. Responses of guinea pig pups during isolation in a novel environment may represent stress-induced sickness behaviors. *Physiol. Behav.* 81:5-13.

- Jennings G, Elia M. 1996. Changes in protein distribution in normal and protein-deficient rats during an acute phase 'injury' response. *Br. J. Nutr.* 76:123-132.
- Kaunisto S, Härkönen L, Rantala MJ, Kortet R. 2015. Early-life temperature modifies adult encapsulation response in an invasive ectoparasite. *Parasitology*: 1 - 7.
- Klasing, K.C. 1998. Nutritional modulation of resistance to infectious diseases. *Poult. Sci.* 77: 1119-25.
- Klasing KC. 2004. The costs of immunity. *Acta. Zool. Sin.* 50: 961-969.
- Kluger MJ, Rothenburg BA. 1979. Fever and reduced iron: their interaction as a host defense response to bacterial infection. *Science* 203: 374-376.
- Kluger MJ. 1991. Fever: role of pyrogens and cryogens. *Physiol. Rev.* 71:93-127.
- Konarzowski M., Diamond J. 1994. Peak sustained metabolic rate and its individual variation in cold-stressed mice. *Physiol. Zool.* 67:1186-1212.
- Lee K P, Cory JS, Wilson K, Raubenheimer D, Simpson SJ. 2006. Flexible diet choice offsets protein costs of pathogen resistance in a caterpillar. *Proc. R. Soc. B* 273: 823-829.
- Lennie TA. 1998. Relationship of body energy status to inflammation-induced anorexia and weight loss. *Physiol. Behav.* 64: 475-481.
- Leon L, White AA, Kluger MJ. 1998. Role of IL-6 and TNF in thermoregulation and survival during sepsis in mice. *Am. J. Physiol.* 275: R269-R277.
- Lindström J. 1999. Early development and fitness in birds and mammals. *TREE* 14: 343-348.
- Lochmiller RL, Deerenberg C. 2000. Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos* 88: 87-98.
- Maldonado KE, Cavieres G, Veloso C, Canals M, Sabat P. 2009. Physiological responses in rufous-collared sparrows to thermal acclimation and seasonal acclimatization. *J. Comp. Physiol. B* 179: 335-343.
- Marketon JI, Glaser R. 2008. Stress hormones and immune function. *Cell Immun.* 252: 16-26.
- Martin LB, Weil ZM, Nelson RJ. 2008. Seasonal changes in vertebrate immune activity: mediation by physiological trade-offs. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 363: 321-339.

- Mills SK, Beatty JH. 2006. The Propensity Interpretation of Fitness, Ed Sober E Conceptual Issues in Evolutionary Biology, 3° edición Massachusetts Institute of Technology pp 3-24.
- Moreno-Rueda G. 2001. Trade-off between immune response and body mass in wintering house sparrows (*Passer domesticus*). Ecol. Res. 26: 943-947.
- Møller AP, Allander K, Dufva R. 1990. Fitness effects of parasites on Passerine birds: a review. En: J. Blondel, A. Gosler, J.-D. Lebreton, R. McCleery (Eds.): Population biology of passerine birds: an integrated approach. Nato ASI Subseries G: vol. G24. Pp. 269-280. SpringerVerlag, Berlin, Heidelberg.
- Muñoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Bleriot JP, Cavaillon JM. 1991. Dysregulation of *in vitro* cytokine production by monocytes during sepsis. J. Clin. Invest. 88: 1747-1754.
- Natanson C, Eichenholz PW, Danner RL, Eichacker PQ, Hojman WD, Kuo GC, Banks SM, Macvittie TJ, Parrillo JE. 1989. Endotoxin and tumor necrosis factor challenges in dogs simulate the cardiovascular profile of human septic shock. J. Exp. Med. 169: 823-832.
- Nemzek JA, Morrison L, Peterson JE, Bolgos GL, Rush HG. 2003. Quantification of TNF- $\alpha$  and IL-6 Bioactivity in Response to Lipopolysaccharide in the Degu (*Octodon degus*). J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. 42: 39-42.
- Nemzek JA, Hugunin KMS, Opp MR. 2008. Modeling Sepsis in the Laboratory: Merging Sound Science with Animal Well-Being. Comp. Med. 58: 120- 128.
- Nordling D, Andersson M, Zohari S Lars G. 1998. Reproductive effort reduces specific immune response and parasite resistance. Proc. R. Soc. Lond. B 265: 1291-1298.
- Novoa FF. 1993. Ecofisiología de *Zonotrichia capensis*: cambios estacionales en el gasto y la adquisición de energía. Ph.D. diss., Universidad Chile, Santiago.
- Nuñez-Villegas M, Bozinovic F, Sabat P. 2014. Interplay between group size, huddling behavior and basal metabolism: an experimental approach in the social degu. J. Exp. Biol. 217: 997-1002.
- Ohlsson K, Bjork P, Bergenfeldt M, Hageman R, Thompson RC. 1990. Interleukin-1 receptor antagonist reduces mortality from endotoxin shock. Nature 348: 550-552.

- Owen-Ashley NT, Wingfield JC. 2006. Seasonal modulation of sickness behavior in free-living northwestern song sparrows (*Melospiza melodia morphna*). *J. Exp. Biol.* 209: 3062–3070.
- Pilorz V, Jäckel M, Knudsen K, Trillmich F. 2005. The cost of a specific immune response in young guinea pigs. *Physiol. Behav.* 85: 205–211.
- Rees DD, Celtek S, Palmer RMJ, Moncada S. 1990. Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effects on vascular tone: an insight into endotoxin shock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173:541–547.
- Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, Call DR. 2000. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs cecal ligation and puncture. *Shock* 13:110–116.
- Repasky RR. 1991. Temperature and the Northern distributions of wintering birds. *Ecology* 72: 2274–2285.
- Rosenmann M. 1977. Regulacion térmica en *Octodon degus*. *Medio Ambiente* 3: 127–131.
- Romanovsky AA, Szekely M. 1998. Fever and hypothermia: two adaptive thermoregulatory responses to systemic inflammation. *Med. Hypo.* 50: 219–226.
- Rudaya AY, Steiner AA, Robbins JR, Dragic AS, Romanovsky AA. 2005. Thermoregulatory responses to lipopolysaccharide in the mouse: dependence on the dose and ambient temperature. *Am. J. Physiol. – Reg. Int. Comp. Physiol.* 289: R1244–R1252.
- Sandland GJ, Minchella DJ. 2003. Costs of immune defense: an enigma wrapped in an environmental cloak? *Trends Parasitol.* 19: 571–4.
- Satinoff E, Peloso E, Plata-Salaman C. 1999. Prostaglandin E2-induced fever in young and old Long–Evans rats. *Physiol. Behav.* 99: 149–52.
- Schmid-Hempel P. 2011. *Evolutionary Parasitology: The Integrated Study of Infections, Immunology, Ecology, and Genetics*. Oxford University Press Inc.
- Sheldon BC, Verhulst S. 1996. Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *TREE* 11: 317–321.

- Shinder Rusal M., Tanny J, Druyan S, Yahav S. 2007. Thermoregulatory Responses of Chicks (*Gallus domesticus*) to Low Ambient Temperatures at an Early Age. *Poult. Sci.* 86:2200–2209.
- Shirakawa F, Saito K, Bonagura CA, Galson DL, Fenton MJ, Webb AC, Auron PE. 1993. The human prointerleukin 1 beta gene requires DNA sequences both proximal and distal to the transcription start site for tissue-specific induction. *Mol. Cell. Biol.* 13: 1332–44.
- Sinclair JA, Lochmiller RL. 1999. Resistance to a pathogenic challenge lacks seasonal specificity in prairie voles (*Microtus ochrogaster*) and cotton rats (*Sigmodon hispidus*). *J. Mamm.* 80: 1331–1335.
- Sober E. 2006. The Two Faces of Fitness, pp 25-30, en *Conceptual Issues in Evolutionary Biology*, Ed Sober E, 3<sup>o</sup> edición Massachusetts Institute of Technology.
- Subba Rao DSV, Glick B. 1970. Immunosuppressive action of heat in chickens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 133:445-448.
- Subba Rao DSV, Glick B. 1977. Effects of cold exposure on the immune response of chickens. *Poult. Sci.* 56: 992-6.
- Svensson E, Råberg L, Koch C, Hasselquist D. 1998. Energetic stress, immunosuppression and the costs of an antibody response. *Funct. Ecol.* 6: 912-9.
- Swanson DL. 1993. Cold tolerance and thermogenic capacity in darkeyed juncos in winter—geographic-variation and comparison with American Tree Sparrows. *J. Therm. Biol.* 18:275–281
- Thaxton P, Sadler CR, Glick B. 1968. Immune response of chickens following heat exposure or injections with ACTH. *Poult. Sci.* 47:264-266
- Thaxton JP, Siegel HS. 1970. Immunodepression in young chickens by high environmental temperature. *Poult. Sci.* 49: 202- 205.
- Thaxton JP, Siegel HS. 1973. Modification of high temperature and ACTH-induced immunodepression by metyrapone. *Poult. Sci.* 52:618–624.
- Thaxton P. 1978. Influence of temperature on the immune response of birds. *Poult. Sci.* 57: 1430-1440.

- Tracey K.J., Lowry SF. 1990. The role of cytokine mediators in septic shock. *Adv. Surg.* 23: 21–56.
- Weaver ME, Ingram DL. 1969. Morphological Changes in Swine Associated with Environmental Temperature. *Ecology* 50:710–713
- Webster Marketon JI, Glaser R. 2008. Stress hormones and immune function. *Cell Immunol.* 252:16-26.
- Wiersma P, Munoz-Garcia A, Walker A, Williams JB. 2007. Tropical birds have a slow pace of life. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104:9340–9345.
- Wingfield JC. 2003. Control of behavioral strategies for capricious environments. *Anim. Behav.* 66: 807 -816.
- Withers PC, Williams JB. 1990. Metabolic and respiratory physiology of an arid-adapted Australian bird, the Spinifex pigeon. *Condor* 92:961–969.
- Wobbrock JO, Findlater L, Gergle D, Higgins JJ. 2011. The aligned rank transform for nonparametric factorial analyses using only ANOVA procedures. *Proc. CHI. Conf. on Hum. Factors in Comput. Syst.* 1:143–146.
- Woods CA, Boraker DK. 1975. *Octodon degus*. *Mammal. Species* 67: 1-5.
- Yáñez JL. 1976. *Ecología de Octodon degus*. Tesis de Pregrado, Universidad de Chile, Santiago.
- Young JB, Shimano Y. 1998. Effects of rearing temperature on body weight and abdominal fat in male and female rats. *Am. J. Physiol.* 274:R398–R405.
- Zhang Z, Chen B, Yuan L, Niu C. 2015. Acute cold stress improved the transcription of pro-inflammatory cytokines of Chinese soft-shelled turtle against *Aeromonas hydrophila*. *Develop. Comp. Immunol.* 49: 127–1.

#### IV. Conclusiones generales

## CONCLUSIONES GENERALES

Entender la variación en la susceptibilidad a enfermedades ha sido el principal objetivo de la ecoinmunología. La ecoinmunología propone que la susceptibilidad a infecciones varía porque la defensa inmune es una respuesta a enfermedades que depende del contexto ecológico en el que se encuentran los organismos (Ardia, Parmentier y Vogel, 2011; Baucom y de Roode, 2011; Demas y col., 2011; Graham y col., 2011). Si los recursos son limitantes, o si la adecuación biológica se puede maximizar mediante el crecimiento o la reproducción en lugar de supervivencia de la infección, la inversión de recursos a la defensa inmune puede verse reducida.

En esta tesis evaluamos si los costos asociados a la respuesta inmune varían con la ontogenia de los animales, evaluando los efectos inmediatos en el crecimiento y supervivencia, y a largo plazo en términos del presupuesto energético y condición corporal de los individuos juveniles. Adicionalmente, estimamos cómo un factor ambiental como la temperatura modula la asignación de recursos a dos procesos fisiológicos demandantes de energía como termorregulación y generación de una respuesta inmune, determinando el efecto en la eficiencia de estos dos procesos. Para esto, utilizamos un antígeno derivado de un patógeno bacteriano (LPS) para generar una respuesta inmune, simulando de esta manera los cambios fisiológicos que experimentaría un individuo que es expuesto a un patógeno. Optamos por utilizar el antígeno en lugar de patógenos vivos debido al escaso control que tendríamos sobre las tasas de crecimiento poblacional de los patógenos vivos, teniendo un efecto sobre los cambios fisiológicos y conductuales registrados en esta tesis.

En el primer capítulo de esta tesis, se estudió la ontogenia de la función inmune, evaluando los costos de la respuesta inmune en términos de crecimiento y condición corporal de los individuos en desarrollo. Además, evaluamos los posibles efectos a largo plazo, en el fenotipo de juveniles, como resultado de la inversión de recursos a la respuesta inmune durante el desarrollo. Los resultados obtenidos indican que la generación de una respuesta inmune durante el desarrollo no afecta la ganancia de masa corporal o el índice corporal, y tampoco la sobrevivencia de las crías. Es posible, que la generación de una respuesta inmune no presente costos inmediatos, en términos de sobrevivencia y crecimiento, para las crías. Estos resultados concuerdan con reportes previos obtenidos en otra especie precocial (*Cavia porcellus*; Pilorz y col., 2005), donde un desafío inmune no afectó la ganancia de masa corporal en animales en desarrollo. En relación a los niveles de IL-1 $\beta$  y la respuesta febril, nuestros resultados indicaron que no existe una variación asociada a la edad en los niveles de esta citoquina. El mismo fenómeno se observó en la temperatura corporal. Además, no encontramos diferencias entre los animales tratados con LPS y los animales control. Estos resultados sugieren que un efecto de la temperatura de aclimatción y de la dieta. En este sentido, se ha demostrado que la función inmune presenta un desarrollo postnatal, hasta alcanzar los niveles observados en adultos (Burl y col., 2011; Killpack y col., 2013; Palacios y col., 2009; Stambaugh y col., 2011) y que además el uso de LPS como antígeno produce cambios fisiológicos en individuos en desarrollo (Nemzek y col., 2008). Por lo tanto, es posible que tanto la temperatura ambiental, en la cual crecieron y se realizaron los desafíos inmunes, como la disponibilidad de alimento, sean variables que afecten la

inmunocompetencia en esta especie, modulando la inversión de recursos a la respuesta inmune y el crecimiento. Con respecto a la conducta asociada a enfermedad, tanto la “conducta de locomoción” como “la condición de agazapado” y “ojos cerrados” fueron afectadas por el desafío con LPS; sin embargo, no se observaron cambios en la magnitud de estas conductas asociadas a la edad. Es importante señalar que, al igual que otros estudios realizados en ecoinmunología (e.g. Dabbert col., 1997; Svensson y col., 1998), solo evaluamos un componente de la función inmune. En este sentido, carecemos de información sobre si la función de todo el sistema inmune varía en magnitud con la edad o si los costos de la respuesta inmune dependen del tipo de respuesta que se genere. Es posible que a medida que los animales avancen en su desarrollo, el tipo de respuesta se modifique, siendo predominante un tipo de respuesta inmune (humoral o celular) mientras se desarrollan los demás componentes de la función inmune, a modo de compensar y equilibrar la inversión de recursos entre la función inmune y el crecimiento. De esta manera, tener una completa comprensión de los cambios ontogenéticos de toda la función inmune tendría implicancias importantes en estudios sobre la evolución de las estrategias de historia de vida.

Con respecto a los posibles efectos a largo plazo, nuestros resultados indican que la generación de una respuesta inmune durante el desarrollo no afecta el presupuesto energético, la ganancia en masa corporal o la condición corporal en individuos juveniles. El riesgo de contraer una infección durante el desarrollo, corresponde a uno de los factores a los que mayormente se encuentran expuestos los individuos en desarrollo. De este hecho surge la pregunta: ¿la generación de una respuesta inmune durante la ontogenia afecta el desarrollo normal de la función inmune y otras funciones biológicas?

Reportes previos han demostrado que la activación de la respuesta inmune durante los primeros días de vida tiene efecto sobre la masa corporal de ratas adultas (Spencer y col., 2006). Sin embargo, nuestros resultados indican convincentemente que una breve inflamación neonatal en los puntos temporales examinados aquí, no afecta los indicadores de crecimiento y el presupuesto energético en la edad adulta. Es posible, sin embargo, que las condiciones de mantenimiento de los animales influyeran en los resultados. Como ya hemos mencionado, la disponibilidad *ad libitum* de alimento y la temperatura ambiental cercana a la termoneutralidad podría relacionarse con una inversión de recursos por igual a la función inmune y al crecimiento, evadiendo los costos energéticos de la respuesta inmune y el compromiso reportado entre la función inmune y el crecimiento (Brommer, 2004; Brzęk y Konarzewski, 2007; Soler y col., 2003). Por último, en este estudio, evaluamos a los posibles efectos a largo plazo en individuos juveniles (90 días) que no han alcanzado la madurez sexual (Ardiles y col., 2013). Es posible que los efectos sean revelados en la etapa adulta, cuando los individuos entran en la etapa reproductiva. En este sentido, no descartamos la existencia de efectos en individuos que han alcanzado las características de adultos.

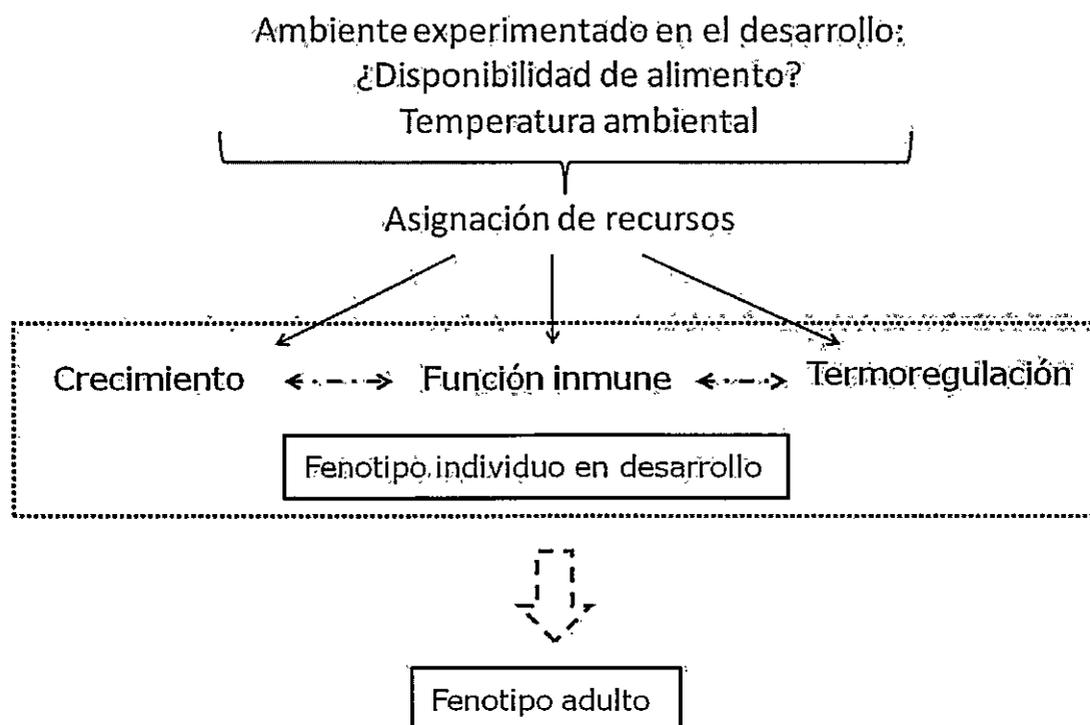
En el segundo capítulo, se determinaron los costos energéticos de la respuesta inmune en crías aclimatadas a dos temperaturas contrastantes (15°C y 30°C) desde el nacimiento hasta el destete. Se ha documentado ampliamente que la activación de una respuesta inmune produce un aumento de las demandas energéticas en animales endotermos (Demas y col., 1997; Henken y Brandsma, 1982; Martín y col., 2003) y una disminución de la masa corporal (Moreno-Rueda, 2001). En nuestro estudio, un desafío

con LPS produjo un incremento cercano al 20% de la tasa metabólica basal en relación a los animales control, independiente de la aclimatación a la cual fueron sometidas las crías. En este sentido, la aclimatación a distintas temperaturas desde el nacimiento, no afectó los costos generados por la respuesta inmune de los animales desafiados. Este es un resultado importante porque indica que el aparente compromiso entre la función inmune y la termorregulación no se basa en una repartición inmediata de recursos, y dependería del grado de aclimatación de los animales al momento de realizado el desafío. En este sentido, es posible que las crías aclimatadas a 15°C presenten un margen energético seguro, que permite compensar períodos demandas energéticas inesperadas, como es el caso de una infección (Diamond y Hammond, 1992).

La mayoría de los estudios previos han reportado una atenuación de la respuesta inmune en animales aclimatados a bajas temperaturas (Cichon y col., 2002, King y Swansson, 2013), debido a que la mayor inversión de recursos en termorregulación limitaría los recursos disponibles para la función inmune. Estos autores argumentan que la termoregulación constituiría un proceso fisiológico demandante de energía, compitiendo por recursos con la función inmune, atenuando la respuesta inmune de animales sometidos a bajas temperaturas (Cichon y col., 2002; Deerenberg y col., 1997; Nordling, 1998). Sorprendentemente, los niveles de IL-1 $\beta$  fueron mayores en magnitud en los animales aclimatados a 15°C, mientras que a 30°C la respuesta de los animales desafiados con LPS y control no fue distinta, indicando que a altas temperaturas se produce una atenuación de la función inmune, contrario a lo observado en reportes previos. Es posible observar un efecto supresor de las condiciones térmicas sobre la función inmune cuando la temperatura ambiental representa un estrés termal para el

animal, elevando los niveles de hormonas de estrés, como glucocorticoides (Schmid-Hempel, 2011), una hormona supresora de la función inmune (Marketon y Glaser, 2008). Así, en individuos en crecimiento, la exposición a temperaturas elevadas (sobre los 32°C) produciría un aumento de los niveles de corticosteroides (Decuyper y col., 1990). Es posible, entonces, que las crías de nuestros estudios expuestas a 30°C estuvieran bajo un estrés termal, provocando una atenuación de la respuesta inmune.

Así, podemos concluir que tanto la magnitud de la respuesta inmune como los costos asociados se encuentran relacionadas con las condiciones ambientales (Fig.1). Este hecho es especialmente importante en organismos en desarrollo, debido a la constante inversión de recursos en crecimiento y formación de estructuras. En este sentido, la asignación de recursos a la función inmune sería dependiente de los factores ambientales y del grado de exposición a estos factores, independiente de la edad a la cual se produzca el desafío. De esta manera, los posibles compromisos entre la función inmune y el crecimiento o la termorregulación, solo serían observables cuando los individuos se enfrentan a condiciones ambientales limitantes en términos de recursos (Fig. 1). En este sentido, el correcto balance entre la defensa inmune y los costos asociados a la activación de la respuesta inmune son necesarios para la adecuación biológica de los organismos, balance dependiente del estado de vida en que se encuentre el animal.



**Figura 1.** Representación gráfica de las principales conclusiones de esta tesis. En individuos que se encuentran en la etapa de desarrollo, la asignación de recursos a crecimiento, función inmune y termorregulación dependería de las variables ambientales, afectando los posibles compromisos entre la función inmune y los otros procesos biológicos (flechas discontinuas). Este efecto ambiental tendría posibles repercusiones en el fenotipo (inmunológico) del individuo adulto.

La ecoinmunología es un área en desarrollo que ofrece un amplio campo de investigación. Desde la publicación de Sheldon y Vehrly (1997), la investigación sobre los costos energéticos y de nutrientes, y los compromisos de la función inmune con otras funciones biológicas ha generado grandes avances en el conocimiento. Sin embargo, existen vacíos que aun no han sido explorados en su totalidad. De esta manera, el estudio del sistema inmune desde un contexto ecológico ofrece un campo de investigación

novedoso que permite responder múltiples preguntas a diferentes escalas, desde la ecológica a la evolutiva.

## REFERENCIAS

- Ardia, D.R., Parmentier, H.K. & Vogel, L.A. (2011) The role of constraints and limitation in driving individual variation in immune response. *Funct. Ecol.* 25: 61–73.
- Ardiles AO, Ewer J, Acosta ML, Kirkwood A, Martinez A, Ebensperger L, Bozinovic F, Lee TM, Palacios AG. 2013. *Octodon degus* (Molina 1782): a model in comparative biology and biomedicine *Cold. Spring Harb. Protoc.* doi:10.1101/pdb.emo071357.
- Baucom RS, de Roode JC. 2011. Ecological immunology and tolerance in plants and animals. *Funct. Ecol.* 25: 18-28.
- Brommer JE. 2004. Immunocompetence and its costs during development: an experimental study in blue tit nestlings. *Proc. R. Soc. Lond. B* 271: S110–S113.
- Brzęk P, Konarzewski M. 2007. Relationship between avian growth rate and immune response depends on food availability. *J. Exp. Biol.* 210: 2361-2367
- Burl, S. et al. 2011. Age-dependent maturation of toll-like receptor-mediated cytokine responses in gambian infants. *PLoS ONE* 6: e18185
- Cichon M, Chadzin M, Ksia A, Konarzewski M. 2002. Delayed effects of cold stress on immune response in laboratory mice. *Proc. R. Soc. Lond. B* 269: 1493–1497.
- Dabbert CB, Lochmiller RL, Teeter RG. 1997. Effects of acute thermal stress on the immune system of the northern bobwhite (*Colinus virginianus*). *Auk* 110: 103–109.
- Decuypere E, Dewil E, Kühn ER. 1990. The hatching process and the role of hormones. Pages 239–256 in *British Poultry Symposium*. Butterworths, London.
- Deerenberg C, Arpanius V, Daan S, Bos N .1997. Reproductive effort decreases antibody responsiveness. *Proc. R. Soc. Lon.* 264: 1021–1029.
- Demas GE, Chefer V, Talan M I, Nelson RJ .1997. Metabolic costs of mounting an antigen-stimulated immune response in adult and aged C57BL/6J mice. *Am. J. Physiol. —Reg. Integ. Comp. Physiol.* 42: R1631 R1637.

- Demas GE, French SS, Adamo S. 2011. Mechanisms of energetic tradeoffs: Lessons from vertebrate and invertebrate systems. *Funct. Ecol.* 25: 29-39.
- Diamond J, Hammond K. 1992. The matches, achieved by natural selection, between biological capacities and their natural loads. *Experientia* 48: 551-557.
- Graham. AL, Shuker DM, Pollitt LC, Auld SKJR, Wilson AJ, Little TL. 2011. Fitness consequences of immune responses: strengthening the empirical framework for ecoimmunology. *Funct. Ecol.* 25: 5-17.
- Henken, A. M. and Brandsma, H. A. 1982. The effect of environmental temperature on immune response and metabolism of the young chicken. 2. Effect of the immune response to sheep red blood cells on energy metabolism. – *Poult. Sci.* 61: 1667-1673.
- Killpack T, Oguchi Y, Karasov WH. 2013. Ontogenetic patterns of constitutive immune parameters in altricial house sparrows. *J. Av. Biol.* 44: 513-520.
- King MO, Swanson DL. 2013. Activation of the immune system incurs energetic costs but has no effect on the thermogenic performance of house sparrows during acute cold challenge. *J. Exp. Biol.* 216: 2097-2102.
- Marketon JI, Glaser R. 2008. Stress hormones and immune function. *Cell Immun.* 252: 16-26.
- Martin II LB, Scheuerlein A, Wikelski M. 2003. Immune activity elevates energy expenditure of house sparrows: a link between direct and indirect costs? *Proc. R. Soc. B* 270: 153-158.
- Moreno-Rueda G. 2001. Trade-off between immune response and body mass in wintering house sparrows (*Passer domesticus*). *Ecol. Res.* 26: 943-947.
- Nemzek JA, Hugunin KMS, Opp MR .2008. Modeling Sepsis in the Laboratory: Merging Sound Science with Animal Well-Being. *Comp. Med.* 58: 120-128.
- Nordling D, Andersson M, Zohari S, Gustafsson L. 1998 Reproductive effort reduces specific immune response and parasite resistance. *Proc. R. Soc. B* 265: 1291-1298.

- Palacios M, Cunnick J, Vleck D, Vleck C. 2009. Ontogeny of innate and adaptive immune defense components in freeliving tree swallows, *Tachycineta bicolor*. – Dev. Compar. Immunol. 33: 456 – 463.
- Pilorz V, Jäckel M, Knudsen K, Trillmich F. 2005. The cost of a specific immune response in young guinea pigs. Physiol.Behav. 85: 205 – 211.
- Schmid-Hempel P. 2011. Evolutionary Parasitology: The Integrated Study of Infections, Immunology, Ecology, and Genetics. Oxford University Press Inc., New York.
- Sheldon BC, Verhulst S .1996. Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. TREE 11: 317-321.
- Schulenburg H, Kurtz J, Moret Y, Siva-Jothy M .2009. Introduction. Ecological immunology. Phil. Trans. R. Soc. B 364: 3-14.
- Soler JJ, de Neve L, Perez-Contreras T, Soler M, Sorci G. 2003. Tradeoff between immunocompetence and growth in magpies: an experimental study Proc R Soc Lond B 270: 241–248
- Spencer SJ, Martin S, Mouihate A, Pittman QJ. 2006. Early-life immune challenge: defining a critical window for effects on adult responses to immune challenge. Neuropsychopharmacol. 31: 1910–1918.
- Stambaugh T, Houdek BJ, Lombardo MP, Thorpe A, Hahn D C. 2011. Innate immune response development in nestling tree swallows. – Wilson J. Ornithol. 123: 779 – 787.
- Svensson E, Råberg L, Koch C, Hasselquist D. 1998. Energetic stress, immunosuppression and the costs of an antibody response. Funct. Ecol. 6: p. 912-9.