



Universidad Nacional del Comahue
Centro Regional Universitario Bariloche

¿Fiebre o Hipotermia en reptiles? Estudio de las respuestas termofisiológicas conductuales frente a una infección bacteriana en lagartos Patagónicos.



Trabajo de Tesis para optar al título de Doctor en Biología

Tesista: Lic. Fernando Duran.

Directora: Dra. Nora R. Ibargüengoytía.

Co-Directora: Dra. Jorgelina M. Boretto.

2021

RESUMEN

Los reptiles, como ectotermos, dependen estrechamente de la temperatura ambiental, aunque muchas especies son capaces de regular con notable precisión su temperatura corporal (T_c) por medio de mecanismos comportamentales y fisiológicos. En particular, los reptiles tienden a mantener sus T_c cercanas a las temperaturas “óptimas” en términos de actividad metabólica y de desempeño fisiológico. Los ajustes termorregulatorios para mantener la T_c adecuada resultan de un balance entre diversos requerimientos como el forrajeo, la evitación de depredadores, y el desarrollo de actividades sociales y reproductivas, además de la necesidad circunstancial de fortalecer el sistema inmune mediante el aumento de la T_c . Las respuestas a una infección pueden observarse no sólo en diferencias de la T_c media, sino también en un ajuste de la precisión en la termorregulación. Algunos estudios realizados en lagartos demostraron que, ante una infección simulada, los individuos podrían optar entre dos posibles estrategias conductuales, la fiebre o la hipotermia. Se considera que los dos mecanismos termorregulatorios representan estrategias complementarias de supervivencia ante un proceso de inflamación sistémica; la fiebre conductual asegura el ataque activo contra el agente infeccioso, mientras que la hipotermia permite contrarrestar la infección conservando la energía disponible.

Las diferentes respuestas termorregulatorias ante una infección bacteriana pueden estar afectadas tanto por el estado de salud y reproductivo de los individuos, como por la disponibilidad de microambientes térmicos predominantes en su ambiente. Los individuos con un bajo índice de condición corporal (indicador de bajas reservas energéticas) y aquellos que habitan ambientes rigurosos fríos suelen desarrollar hipotermia conductual. En cambio, los individuos que presentan un índice de condición corporal normal y que habitan ambientes más benignos, tienden a aumentar la temperatura ante un desafío inmune, desarrollando fiebre conductual. En ambos casos la posibilidad de realizar respuestas conductuales o fisiológicas impacta en la adecuación biológica dado que el estado de salud puede afectar la capacidad de locomoción y la resistencia física, influyendo así en actividades vitales tales como el forrajeo, las interacciones sociales y la reproducción.

En esta tesis presento información de base respecto al estado de salud (presencia de ectoparásitos, valores hematológicos, ensayo de inflamación de la piel con fitohemaglutinina e índice de condición corporal) y la respuesta termorregulatoria a una endotoxina bacteriana (lipopolisacárido, LPS) de dos especies hermanas de liolaémidos vivíparos, de la Patagonia, Argentina: *Liolaemus kingii* y *Liolaemus sarmiento*. Ante un mismo desafío inmune, se espera que estas especies que habitan a diferentes latitudes, termorregulen según la disponibilidad térmica de su ambiente natural. Predecimos que los individuos de *L. kingii*, que habitan ambientes con climas templados, tenderán a desarrollar fiebre conductual, mientras que los individuos de *L. sarmiento* que habitan en climas fríos, seleccionarán menores temperaturas desarrollando hipotermia conductual. También se espera que la respuesta termorregulatoria muestre interacción con el estado de salud inicial de los individuos. Además, se analiza sólo para *L. sarmiento*, cómo el estado de salud que presentan en su ambiente natural afecta la termorregulación y el rendimiento locomotor (velocidad y resistencia).

Los individuos de *L. sarmiento* mostraron capacidad de realizar un ajuste fisiológico para mejorar la respuesta inmune a una posible infección o enfermedad dado que se observó relación entre la termorregulación y el rendimiento locomotor con

el perfil leucocitario. Los juveniles y machos adultos de esta especie fueron capaces de seleccionar mayores temperaturas corporales preferidas (T_p y T_{p-max}) cuando presentaron altos recuentos de eosinófilos o basófilos, y mejorar así, la actividad fagocítica de estos leucocitos mediante un incremento de la temperatura corporal. En contraste, las hembras preñadas de *L. sarmientoi* mantuvieron sus temperaturas preferidas estables y no mostraron relación con el perfil leucocitario. En cuanto al rendimiento locomotor sólo en los juveniles, la resistencia locomotora fue menor en los individuos que presentaron un alto porcentaje de heterófilos, relacionados con la respuesta inmune innata. En cambio, tanto en machos adultos como en hembras preñadas, no se halló una relación entre el rendimiento locomotor (velocidades de carrera corta y larga, y resistencia locomotora) y el perfil leucocitario.

Los individuos de ambas especies estudiadas *Liolaemus kingii* y *Liolaemus sarmientoi*, presentaron un buen estado de salud en su ambiente natural, evidenciado por la ausencia de lesiones externas o ectoparásitos, un índice similar de condición corporal entre individuos y la capacidad para desarrollar una respuesta inflamatoria temporal y localizada cuando fueron inyectados con fitohemaglutinina (PHA). *Liolaemus kingii* y *L. sarmientoi*, termorregularon en forma diferente ante el desafío inmune, aunque no variaron en el perfil leucocitario entre individuos inyectados con una endotoxina bacteriana (lipopolisacárido, LPS) y los controles. Ante la misma amenaza de patógeno (LPS) en condiciones experimentales de laboratorio similares, las lagartijas termorregularon a temperaturas cercanas a la temperatura corporal (T_c) que experimentan en su ambiente a diferencia de los individuos control (inyectados con solución fisiológica). Los resultados sugieren que la disponibilidad de temperaturas en los ambientes de *L. kingii* ($T_e = 18.6$ °C) y *L. sarmientoi* ($T_e = 11.7$ °C; $T_{e\text{ media}}$ de los meses de actividad) resulta en una adaptación, modelando diferentes caminos evolutivos para las respuestas termofisiológicas a los desafíos inmunitarios apoyando la hipótesis de esta tesis. Los individuos de *L. kingii* inyectados con LPS en el laboratorio mantuvieron su T_p alta y estable dentro del rango del T_{set} a lo largo de todo el experimento. En cambio, los individuos de *L. sarmientoi* inyectados con LPS, disminuyeron su T_p mostrando la capacidad de realizar termorregulación conductual, desarrollando hipotermia. Se espera que surjan futuras investigaciones para avanzar en el entendimiento de la ecoinmunología en lagartos y responder interrogantes relacionados con los posibles desafíos del cambio climático que están afectando la diversidad de ambientes para la termorregulación y sometiendo las poblaciones a nuevos patógenos.

ABSTRACT

Reptiles, as ectotherms, closely depend on environmental temperature, although many species are capable of regulating their body temperature (T_c) with remarkable precision through behavioral and physiological mechanisms. In particular, reptiles tend to keep their T_c close to "optimal" temperatures in terms of metabolic activity and physiological performance. In order to maintain adequate T_c , thermoregulatory adjustments result from a balance among various requirements such as foraging, avoidance of predators, and the development of social and reproductive activities, in addition to the circumstantial need to strengthen the immune system by increasing T_c . Responses to an infection can be seen not only in differences in mean T_c , but also in thermoregulation precision. Some studies carried out in lizards showed that, when faced with a simulated infection, individuals could choose between two possible behavioral strategies, fever or hypothermia. It is considered that the two thermoregulatory mechanisms represent complementary survival strategies in the face of a systemic inflammation process; behavioral fever ensures the active attack against the infectious agent, while hypothermia allows to counteract the infection while conserving the available energy.

The different thermoregulatory responses to a bacterial infection can be affected both by the health and reproductive status of individuals, and by the availability of predominant thermal microenvironments in their environment. Individuals with a low body condition index (indicator of low energy reserves) and those which live in harsh cold environments often develop behavioral hypothermia. In contrast, individuals which present a normal body condition index and living in milder environments tend to increase the temperature when faced with an immune challenge, developing behavioral fever. In both cases, the possibility of carrying out behavioral or physiological responses impacts fitness since the state of health can affect locomotion capacity and physical resistance, thus influencing vital activities such as foraging, social interactions and reproduction.

In this thesis I present basic information regarding the health status (presence of ectoparasites, hematological values, skin inflammation test with phytohemagglutinin and body condition index) and the thermoregulatory response to a bacterial endotoxin (lipopolysaccharide, LPS) of two sister species of viviparous liolaemids, from Patagonia, Argentina: *Liolaemus kingii* and *Liolaemus sarmientoi*. Faced with the same immune challenge, it is expected that these species that inhabit different latitudes, thermoregulate according to the thermal availability of their natural environment. We predict that *L. kingii* individuals, which inhabit environments with temperate climates, will tend to develop behavioral fever, while *L. sarmientoi* individuals that live in cold climates will select lower temperatures, developing behavioral hypothermia. The thermoregulatory response is also expected to show interaction with the initial health status of individuals. In addition, it is analyzed only for *L. sarmientoi*, how the state of health that they present in their natural environment affects thermoregulation and locomotor performance (speed and endurance).

The individuals of *L. sarmientoi* showed the ability to perform a physiological adjustment to improve the immune response to a possible infection or disease, since a relationship between thermoregulation and locomotor performance with the leukocyte profile was observed. Juveniles and adult males of this species were able to select higher preferred body temperatures (T_p and T_{p-max}) when they presented high counts of eosinophils or basophils, thus, improving the phagocytic activity of these

leukocytes through an increase in body temperature. In contrast, the *L. sarmientoi* pregnant females maintained their preferred temperatures stable and showed no relationship with the leukocyte profile. Regarding locomotor performance only in juveniles, locomotor resistance was lower in individuals which presented a high percentage of heterophiles, related to the innate immune response. In contrast, in both adult males and pregnant females, no relationship was found between locomotor performance (short and long running speeds, and locomotor endurance) and the leukocyte profile.

The individuals of both species studied, *Liolaemus kingii* and *Liolaemus sarmientoi*, presented a good state of health in their natural environment, evidenced by the absence of external lesions or ectoparasites, a similar index of body condition among individuals and the ability to develop a temporary inflammatory response and localized when they were injected with phytohemagglutinin (PHA). *Liolaemus kingii* and *L. sarmientoi*, thermoregulated differently before the immune challenge, although they did not vary in the leukocyte profile between individuals injected with a bacterial endotoxin (lipopolysaccharide, LPS) and the controls. Faced with the same pathogen threat (LPS) in similar experimental laboratory conditions, the lizards thermoregulated at temperatures close to the body temperature (T_c) that they experience in their environment unlike control individuals (injected with physiological solution). The results suggest that the availability of temperatures in the environments of *L. kingii* ($T_e = 18.6$ °C) and *L. sarmientoi* ($T_e = 11.7$ °C; mean T_e of the activity months) result in an adaptation, modeling different evolutionary pathways for thermophysiological responses to immune challenges supporting the hypothesis of this thesis. *Liolaemus kingii* individuals injected with LPS in the laboratory kept their T_p high and stable within the T_{set} range throughout the entire experiment. In contrast, *L. sarmientoi* individuals injected with LPS, decreased their T_p showing the ability to perform behavioral thermoregulation, developing hypothermia. Future research is expected to advance in the understanding of ecoimmunology in lizards and in answering questions related to the possible climate change challenges that are affecting the diversity of environments for thermoregulation and subjecting populations to new pathogens.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
ORGANIZACIÓN DE LA TESIS	7
INTRODUCCIÓN GENERAL	8
OBJETIVO GENERAL	12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
HIPÓTESIS Y PREDICCIONES	13
ANTECEDENTES SOBRE LAS ESPECIES	15
Especies elegidas para el estudio.....	15
Área de estudio	18
CAPÍTULO 1: ESTUDIOS PRELIMINARES DEL PERFIL LEUCOCITARIO Y SU RELACIÓN CON LA BIOLOGÍA TÉRMICA Y EL RENDIMIENTO FISIOLÓGICO EN INDIVIDUOS DE <i>Liolaemus sarmientoi</i>	20
1.1 Introducción	20
1.2 Materiales y Métodos	23
1.3 Resultados	31
1.4 Discusión	37
INTRODUCCIÓN DE LOS CAPÍTULOS 2, 3 Y 4	43
CAPÍTULO 2: EVALUACIÓN DEL ESTADO DE SALUD DE POBLACIONES SILVESTRES DE <i>Liolaemus kingii</i> Y <i>Liolaemus sarmientoi</i>	49
2.1 Materiales y Métodos	49
2.2 Resultados	60
CAPÍTULO 3: BIOLOGÍA TÉRMICA Y EFICIENCIA DE TERMORREGULACIÓN	70
3.1 Materiales y Métodos	71
3.2 Resultados	77
CAPÍTULO 4: EFECTOS DE UNA ENDOTOXINA BACTERIANA (LIPOPOLISACÁRIDO; LPS) EN LAS TEMPERATURAS PREFERIDAS Y EN LA CONDICIÓN CORPORAL	84
4.1 Materiales y Métodos	85
4.2 Resultados	89
DISCUSIÓN DE LOS CAPÍTULOS 2, 3 Y 4	106
CONCLUSIONES FINALES	116
BIBLIOGRAFÍA CITADA	117

AGRADECIMIENTOS	129
PUBLICACIONES	131

ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

Esta Tesis se encuentra organizada comenzando con una introducción general y la presentación del objetivo general, los objetivos específicos, las hipótesis y predicciones. Luego se desarrollan 4 Capítulos con la finalidad de resolver lo planteado en el objetivo general y objetivos específicos, destacando que la organización de la tesis en capítulos es principalmente para ayudar en su lectura, ya que todos se encuentran estrechamente relacionados entre sí. En el primer Capítulo presento un estudio de base realizado durante esta Tesis Doctoral, pero con datos obtenidos en trabajos de campo previos. En este Capítulo, analizo frotis de sangre de individuos de una población silvestre de *Liolaemus sarmientoi* y determino el perfil leucocitario como parámetro basal del estado inmunológico y estos resultados los analizo y comparo con variables de temperatura corporal y de rendimiento locomotor. Luego presento una introducción común para los Capítulos 2, 3 y 4 en los cuales utilizo individuos capturados durante el desarrollo de esta Tesis. En el Capítulo 2 evalúo el estado de salud de las poblaciones de *L. kingii* y *L. sarmientoi*. En el Capítulo 3 presento los estudios de biología térmica y eficiencia de termorregulación para ambas especies, y en el Capítulo 4 presento los estudios de las respuestas termofisiológicas conductuales y posibles cambios en el índice de condición corporal después de la administración de una endotoxina bacteriana (lipopolisacárido; LPS). Luego presento una única discusión en la cual integro los resultados de los Capítulos 2, 3 y 4, y por último presento las conclusiones generales que se desprenden de los 4 Capítulos que conforman la Tesis.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La fiebre es considerada un mecanismo fisiológico ancestral de defensa del hospedador ante una infección y forma parte de la respuesta inmune innata frente a la invasión de agentes patógenos (Zeisberger 1999; Evans et al. 2015). El incremento de la temperatura corporal permite optimizar muchos componentes tanto de la defensa inespecífica como de la defensa específica del hospedador, como la movilidad leucocitaria, los efectos del interferón y la transformación linfocitaria (Kluger 1986; Zimmerman et al. 2010; Rakus et al. 2017). Este mecanismo fisiológico de defensa está presente tanto en invertebrados (Casterlin y Reynolds 1977a; Bronstein y Conner 1984; Stahlschmidt y Adamo 2013) como en todos los taxones de vertebrados, encontrándose estudios de referencias en mamíferos (Stitt 1973; Urison et al. 1993), aves (D'Alecy y Kluger 1975; Maloney y Gray 1998), peces (Reynolds et al. 1976, 1978; Cabanac y Laberge 1998), anfibios (Hutchison y Erskine 1981; Sherman et al. 1991; Kluger 1977) y reptiles (Vaughn et al. 1974; Bernheim y Kluger 1976; Goessling et al. 2017). En vertebrados ectotermos, la fiebre conductual se ha descrito como respuesta a una infección, definida como un cambio en la temperatura preferida del individuo (Casterlin y Reynolds 1977b; Monagas y Gatten 1983; Boltaña et al. 2013) acompañada, como en mamíferos, de un cambio en el punto crítico hipotalámico (Vaughn et al. 1974; Kluger et al. 1975; Bernheim y Kluger 1976; Kluger 1977; Ramos et al. 1993).

Los reptiles, como animales ectotermos, dependen estrechamente de la temperatura ambiental, aunque muchas especies son capaces de regular con notable precisión su temperatura corporal (T_c) por medio de mecanismos comportamentales y fisiológicos (termorregulación activa). Así, los individuos podrían mantener sus T_c cercanas a las temperaturas “óptimas” en términos de actividad metabólica y de desempeño fisiológico (Huey y Slatkin 1976; Carothers et al. 1997; Angilletta et al. 2002). Los ajustes termorregulatorios que un reptil realiza en su ambiente natural para mantener la T_c adecuada resultan de un balance entre diversos requerimientos como la necesidad de obtención del alimento adecuado, la posibilidad de evitar depredadores, los requerimientos ligados a los procesos reproductivos y sociales, y la necesidad circunstancial de fortalecer el sistema inmune mediante el aumento de la T_c (Zimmerman et al. 2010; Rakus et al. 2017). En reptiles, el aumento de la T_c frente a un desafío inmune ha sido demostrado en tortugas (Monagas y Gatten 1983),

cocodrilos (Lang 1987; Merchant et al. 2007), serpientes (Burns et al. 1996) y lagartos (Muchlinski et al. 1989; Ortega et al. 1991). Asimismo, se ha propuesto que los efectos de una infección simulada pueden observarse no sólo en un aumento de la T_c media, sino también en un ajuste de la precisión termorregulatoria (menor varianza de las T_c ; Hutchison y Dupré 1992; Deen y Hutchison 2001). Sin embargo, las respuestas ante una infección pueden ser variables y algunos estudios realizados en reptiles demostraron que, ante un desafío inmune, una misma especie podría optar entre dos posibles estrategias, un aumento de la temperatura, la fiebre conductual, o una disminución de la temperatura, denominada hipotermia conductual (Burns et al. 1996; Deen y Hutchison 2001). La estrategia de hipotermia conductual fue registrada, por ejemplo, en el cocodrilo americano *Alligator mississippiensis* (Merchant et al. 2007), el anolis verde *Anolis carolinensis* (Merchant et al. 2008) y la culebra rayada *Thamnophis sirtalis* (Burns et al. 1996).

La hipotermia conductual se define como un mecanismo de respuesta frente a infecciones bacterianas que consiste en la disminución de la T_c mediante termorregulación activa (Burns et al. 1996; Romanovsky y Szekely 1998; Romanovsky et al. 2005). Los individuos seleccionan temperaturas más bajas a fin de disminuir la actividad y el gasto energético, y conservar la energía disponible para contrarrestar con más eficacia la infección (Merchant et al. 2008). Asimismo, se considera que la respuesta de hipotermia conductual en lagartos estaría relacionada con la posibilidad de reducir, mediante la elección de temperaturas corporales bajas, la tasa de crecimiento de un microorganismo patógeno, aumentando así el tiempo disponible por el hospedador para desarrollar un ataque inmunológico completo (Merchant et al. 2008). Se ha observado que cuando las reservas energéticas de un organismo son bajas (bajo índice de condición corporal) la hipotermia conductual se convierte en la estrategia más ventajosa frente a infecciones, dado que permite conservar las reservas energéticas del individuo (Deen y Hutchison 2001; Romanovsky y Szekely 1998). En cambio, se considera que la fiebre conductual ocurriría sólo cuando no existen amenazas inmediatas de un déficit sustancial de energía (Romanovsky y Szekely 1998). De esta forma se considera que los dos mecanismos de respuestas termorreguladoras frente a un desafío inmune representan estrategias complementarias de supervivencia ante un proceso de inflamación sistémica: la fiebre conductual asegura el ataque activo y rápido contra el agente infeccioso, mientras que la hipotermia conductual otorga más tiempo para el desarrollo de una respuesta

inmune, debilitando al agente patógeno y conservando la energía disponible (Romanovsky y Szekely 1998; Garami et al. 2018).

El grado de contribución de cada mecanismo de respuesta frente a una infección dependerá de la gravedad de la misma, del tipo de agente infeccioso, de las características de la patología premórbida, de las condiciones del individuo como por ejemplo el estado nutricional y el nivel de estrés, y también, como factor muy importante, de la disponibilidad de temperaturas microambientales para la termorregulación (Romanovsky y Szekely 1998; Deen y Hutchison 2001; do Amaral et al. 2002). En condiciones de laboratorio, también se ha demostrado que algunas especies de reptiles no presentan un aumento de la T_c ante la inyección de un pirógeno, ni tampoco desarrollan hipotermia conductual, como es el caso del lagarto armadillo *Cordylus catuphractus* (Laburn et al. 1981) y la tortuga leopardo *Geochelone pardalis* (Zurovsky et al. 1987), y esta falta de respuesta termofisiológica se ha atribuido al tipo de endotoxina utilizada y a la dosis del pirógeno suministrada (Hallman et al. 1990; Muchlinski et al. 1995).

De esta forma, las diferentes respuestas termorregulatorias observadas ante una infección bacteriana en ectotermos se encuentran afectadas por factores tanto bióticos, como por factores abióticos. Entre los principales factores bióticos podemos mencionar el estado de las reservas energéticas del individuo, el estado reproductivo, la presencia de depredadores o las interacciones sociales, así como el estado de salud que afecta la temperatura corporal (T_c), el comportamiento termorregulatorio (T_p), la velocidad de carrera (Oppliger et al. 1996; Zamora Camacho et al. 2015) y la resistencia física (Schall 1990; Husak et al. 2021). En particular, el índice de condición corporal, indicador de la cantidad de reservas energéticas de un organismo (Peig y Green 2009, 2010) y de su adecuación biológica, se relaciona directamente con el tipo de respuesta termorregulatoria ante infecciones (Bradshaw y Dèath 1991; Carranza y Hidalgo de Trucios 1993; Dobson y Michener 1995; Cuadrado 1998; Tomašević et al. 2007). Por otra parte, entre los factores abióticos, las características climáticas determinan en gran parte la disponibilidad de microambientes térmicos para la termorregulación, y así, los reptiles con menor disponibilidad de microambientes térmicos, por ej. con escasez de vegetación o refugios (Smith y Ballinger 2001; Sears y Angilletta 2015), se encontrarán limitados para desarrollar fiebre o hipotermia conductual, y en consecuencia podrían ser más vulnerables ante una infección por patógenos (Todd et al. 2016).

Los cambios en el comportamiento termorregulatorio también se relacionan con las respuestas fisiológicas a nivel bioquímico celular (Rakus et al. 2017). Las moléculas señales generadoras de fiebre pueden inducir a distintos tipos de células fagocíticas a producir una proteína termo-lábil, que actúa como un pirógeno endógeno responsable del aumento del punto-crítico hipotalámico de termorregulación (Rakus et al. 2017). La composición molecular del pirógeno endógeno responsable del aumento de la temperatura, así como la interleucina-1 o el lipopolisacárido componente de la pared celular de las bacterias gram negativas (LPS), son ampliamente compartidas en el reino animal. Por ejemplo, uno de los primeros estudios realizados en reptiles fue llevado a cabo por Bernheim y Kluger (1976) que, simulando las condiciones ambientales del desierto, monitorearon en el laboratorio las temperaturas corporales de *Dipsosaurus dorsalis* antes y después de la inyección de bacterias pirógenas. Estos investigadores observaron que los lagartos elegían las zonas de mayor radiación térmica aumentando considerablemente su T_c y que la respuesta de fiebre en reptiles es similar a la de aves y mamíferos, por lo cual sugieren un origen y probablemente un mecanismo bioquímico común (Bernheim y Kluger 1976).

En la presente Tesis se estudian el estado inmunológico, el índice de condición corporal y las respuestas termofisiológicas conductuales (fiebre o hipotermia) frente a una potencial infección de origen bacteriano en dos especies vivíparas que comparten el mismo clado y que habitan ambientes a diferentes latitudes con diferente rigurosidad climática, *Liolaemus kingii* y *Liolaemus sarmientoii*. Los estudios que evalúan el estado de salud de poblaciones de vida silvestre son escasos para la mayoría de las especies del género *Liolaemus* y no hay estudios acerca de las posibles respuestas que podrían desarrollar frente a un desafío inmune. Existen estudios previos sobre especies de este género que se enfocan únicamente en la descripción de parámetros hematológicos (Ceballos de Bruno 1995), presencia de diferentes especies de ectoparásitos (Castillo et al. 2015; Espinoza-Carniglia et al. 2016; Muñoz-Leal et al. 2016; Juárez Heredia et al. 2020), parásitos nematodos (Castillo et al. 2019) y hemoparásitos (Megía-Palma et al. 2017). Los resultados de esta Tesis aportarán al conocimiento de parámetros basales del estado de salud de poblaciones silvestres de reptiles del género *Liolaemus* y de sus estrategias frente a un desafío inmune, representando una oportunidad para avanzar en el conocimiento de la ecofisiología térmica y ecoinmunología en reptiles de Argentina.

OBJETIVO GENERAL

- Avanzar en el conocimiento de parámetros basales del estado de salud de poblaciones silvestres de liolaémidos y su efecto sobre las temperaturas preferidas de termorregulación y la locomoción. Además, conocer si las lagartijas responden a una infección inducida con un lipopolisacárido bacteriano desarrollando respuestas conductuales de fiebre o hipotermia, según las características térmicas predominantes en su ambiente natural. Para ello, se seleccionaron como modelo de estudio dos especies hermanas de liolaémidos vivíparos, que habitan ambientes a diferentes latitudes y condiciones ambientales en la Patagonia, Argentina: *Liolaemus kingii* y *Liolaemus sarmientoi*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar y caracterizar:

1. El perfil leucocitario como parámetro basal del estado inmunológico de individuos de una población silvestre de *Liolaemus sarmientoi* y su relación con variables ecofisiológicas tales como el índice de condición corporal, la temperatura corporal en el ambiente natural (T_c), la temperatura preferida en el laboratorio (T_p), el rendimiento locomotor y la resistencia. Para este objetivo se analizaron frotis de sangre y variables ecofisiológicas obtenidos en estudios previos a esta tesis.
2. El estado de salud de individuos de *Liolaemus kingii* y *Liolaemus sarmientoi* de poblaciones silvestres a partir de: la presencia de ectoparásitos (ácaros o garrapatas), el índice de condición corporal, valores hematológicos (perfil leucocitario, relación heterófilo/linfocito y conteo de eritrocitos) y la respuesta inmune individual mediante la prueba de la fitohemaglutinina (PHA).

3. La disponibilidad de microambientes térmicos para la termorregulación conductual en el ambiente natural de cada especie (temperaturas operativas; T_e).
4. Las T_p de los ejemplares en el laboratorio y el índice de eficiencia para la termorregulación (E) de ambas especies (*sensu* Hertz et al. 1993).
5. Las T_{ps} después de la administración de un lipopolisacárido (LPS; grupo tratamiento) o solución fisiológica (PBS; grupo control), y relacionar los resultados con una respuesta conductual de fiebre o de hipotermia.
6. El estado de salud a partir del índice de condición corporal y los valores hematológicos de los individuos del grupo tratamiento (LPS) y control (PBS) antes y después del estudio experimental.

HIPÓTESIS Y PREDICCIONES:

Hipótesis 1: El estado inmunológico y el índice de condición corporal de individuos de *L. sarmientoi* afectan el desempeño de diferentes variables ecofisiológicas relevantes vinculadas con la adecuación biológica.

Predicción 1: Los individuos con un perfil leucocitario característico de una respuesta inmune y con menor índice de condición corporal presentarán una T_p diferente a la media para la especie, menor rendimiento y resistencia para la locomoción.

Hipótesis 2: *Liolaemus kingii* y *Liolaemus sarmientoi* frente a un desafío inmune modifican sus T_p de acuerdo a su estado de salud, y su respuesta estará condicionada también por la disponibilidad de microambientes para la termorregulación en su ambiente natural. Esta hipótesis se basa en la gran versatilidad de las especies del género *Liolaemus* para habitar ambientes con diferente rigurosidad climática y su capacidad para utilizar diferentes fuentes de calor para alcanzar T_p en su ambiente natural (termorregulación eficiente, moderada o termoconformidad).

Predicción 2: En un gradiente térmico en laboratorio y ante una infección bacteriana simulada, los lagartos de la especie *L. kingii*, que habitan el ambiente más

templado, responderán termorregulando a mayores temperaturas y desarrollando así fiebre conductual. En cambio, los lagartos de la especie *L. sarmiento* que habitan el ambiente más frío, responderán a una infección simulada termorregulando a menores temperaturas, desarrollando hipotermia conductual. La respuesta termorregulatoria mostrará interacción con el estado de salud de cada individuo.

Hipótesis 3: Las bacterias o productos bacterianos producen una inflamación sistémica caracterizada por una activación masiva de macrófagos y de leucocitos polimorfonucleados en circulación sanguínea. Los individuos del grupo tratamiento (LPS) de *L. kingii* y *L. sarmiento* presentarán un perfil leucocitario diferente al presentado antes de la infección bacteriana experimental.

Predicción 3. El perfil leucocitario de los individuos infectados de ambas especies presentará un mayor porcentaje de granulocitos polimorfonucleados, así como un menor porcentaje de monocitos, comparado con el perfil leucocitario de los individuos antes de la infección, mientras que los individuos del grupo control no presentarán diferencias en el perfil leucocitario antes y después del experimento.

ANTECEDENTES SOBRE LAS ESPECIES

Especies elegidas para el estudio:

La familia Liolaemidae, integrada por los géneros *Ctenoblepharys*, *Phymaturus* y *Liolaemus*, incluye especies que se distribuyen en ambientes áridos y semiáridos de América del Sur Austral (Abdala y Quinteros 2014). El género *Liolaemus* es el más diverso de esta familia y su número de taxa aumenta considerablemente cada año. *Liolaemus* comprende alrededor de 283 especies descritas (Abdala et al. 2021), con una alta diversidad en los rasgos de historia de vida y una amplia distribución latitudinal y altitudinal, que se extiende desde los Andes de Perú y Bolivia hasta la Provincia de Tierra del Fuego en Argentina y Chile (desde los 10° S a los 54° 17' S), y desde el nivel del mar hasta más de 5000 m snm (Schulte et al. 2000; Aparicio y Ocampo 2010; Aguilar et al. 2013). Las especies del género *Liolaemus* muestran una gran plasticidad en sus respuestas fisiológicas para adaptarse a una gran diversidad de climas y ambientes (Ibargüengoytía et al. 2008; Cruz et al. 2009; Labra et al. 2009; Ibargüengoytía et al. 2010; Medina et al. 2011; Moreno-Azócar et al. 2013; Ibargüengoytía et al. 2021). En esta Tesis se tomaron como modelo de estudio dos especies de lagartos del género *Liolaemus* que habitan en la Patagonia Argentina, *Liolaemus kingii* y *Liolaemus sarmientoi* (Fig. 1 y Fig. 2). Estas especies son de tamaños corporales similares, ambas vivíparas, y están relacionadas filogenéticamente. Ambas especies están categorizadas como de Preocupación Menor (LC) en la lista roja (IUCN) y como No Amenazadas (NA) en la última Categorización del estado de conservación de las lagartijas y anfibenas de la República Argentina (Abdala et al. 2012).

Liolaemus kingii (BELL, 1843)

La especie *Liolaemus kingii* está restringida a la Patagonia Argentina donde tiene una amplia distribución en el oeste y sur de la provincia de Chubut y en toda la provincia de Santa Cruz (Breitman et al. 2014; Fig. 3). Su bioecología es poco conocida, se ha descrito como una especie generalista que habita muy diferentes biotopos desde la precordillera hasta la costa, en mesetas, bajos endorreicos y

terrazas de variada estructura de terrenos (Scolaro 2005). Es una lagartija robusta, con un tamaño aproximado de 100 mm de longitud hocico-cloaca (LHC; Scolaro 2005), insectívora, vivípara y el tamaño de camada es de 2 a 5 crías (Ibargüengoytía et al. 2002; Scolaro 2005).



Figura 1. Ejemplar de *Liolaemus kingii*. Foto tomada por: F. Duran.

***Liolaemus sarmientoi* DONOSO-BARROS, 1973**

La distribución de *L. sarmientoi* está restringida al sur de la Patagonia Argentina, en las regiones central y sur de la provincia de Santa Cruz, llegando al estrecho de Magallanes (Breitman et al. 2014; Fig. 3). *Liolaemus sarmientoi* es una especie considerada frecuente en su área de distribución, que vive en pequeñas poblaciones a lo largo de afloramientos rocosos de depósitos glaciofluviales o derrames de lava de antiguos cráteres volcánicos, en la seca estepa magallánica patagónica (Breitman et al. 2014). También es una lagartija de tamaño mediano (LHC hembras: 76.90 ± 1.21 mm; LHC machos: 76.82 ± 2.02 mm, Ibargüengoytía et al. 2010), vivípara (Donoso-Barros 1966; Cei 1986; Scolaro 2005), con dieta omnívora y saxícola (Cei 1986; Scolaro y Cei 1997). Las hembras presentan un ciclo reproductivo anual-bianual y un tamaño de camada de 2 a 7 crías (Fernández et al. 2015). Estudios previos muestran que *L.*

sarmientoi es un termorregulador moderado (*sensu* Hertz et al. 1993; $E = 0.30$; Ibargüengoytía et al. 2010), que es capaz de alcanzar su máximo rendimiento locomotor en un rango amplio de temperaturas (Fernández et al. 2011).



Figura 2. Ejemplar de *Liolaemus sarmientoi*. Foto tomada por: F. Mendez de La Cruz.

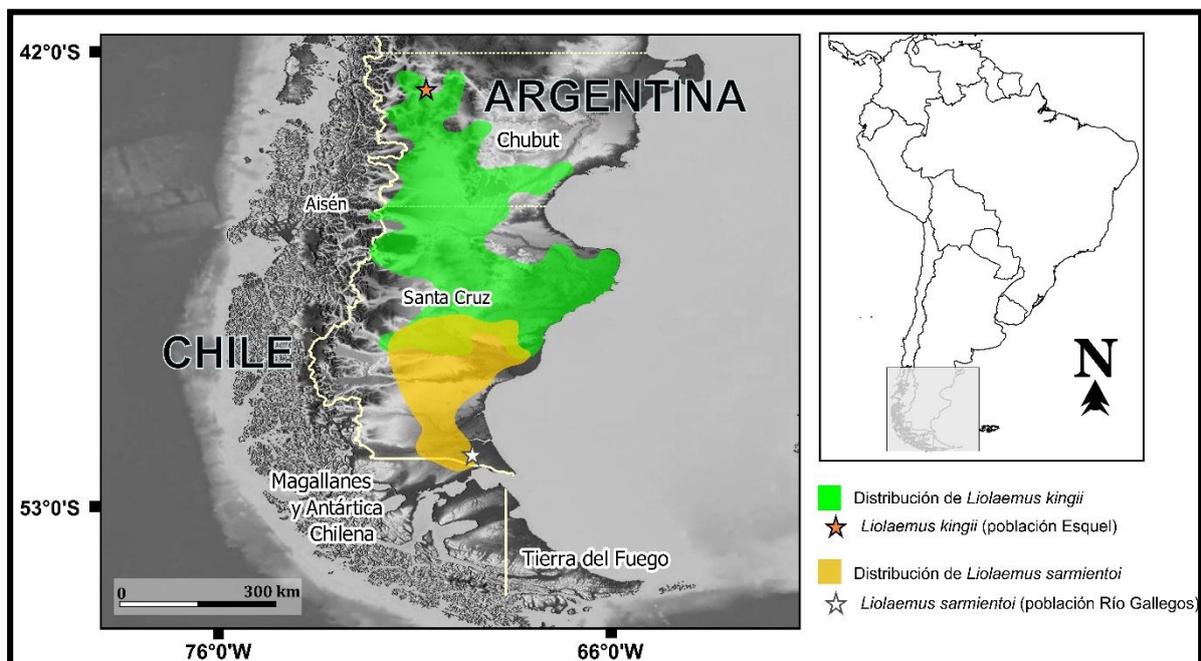


Figura 3. Mapa del extremo sur de América del Sur (Argentina y Chile) en el cual se presenta la distribución de *Liolaemus kingii* (zona marcada en verde) y *Liolaemus sarmientoi* (zona

marcada en amarillo) según Donoso-Barros (1966) y Breitman et al. (2014). Las estrellas indican los lugares de muestreo de cada una de las especies.

Área de estudio:

El trabajo de campo para la captura de los individuos de *Liolaemus kingii* se llevó a cabo en cercanías de la ciudad de Esquel, al oeste de la provincia de Chubut, Argentina (43° S, 70° O; 630 m snm), siendo esta población, una de las que se encuentra en el extremo norte de la distribución de la especie. Esta región presenta un clima con bajas temperaturas medias anuales, una gran amplitud térmica diaria y estacional, variaciones en la intensidad de las precipitaciones que se acrecientan en otoño e invierno, y vientos predominantes del sector oeste durante todo el año en toda la región, aunque más intensos en el verano (Paruelo et al. 1998). Este sitio presenta una vegetación subarborescente escasa dominado por los géneros *Verbena*, *Nassauvia*, y *Chuquiraga spp.*, y pastos escasos dominado por los géneros *Stipa* y *Poa* (Scolaro 2005; Fig. 4A).

Los individuos de *Liolaemus sarmientoi* se capturaron en cercanías de la ciudad de Río Gallegos, al sur de la provincia de Santa Cruz, Argentina (51° S, 69° O; 109 m snm), siendo esta población, una de las que se encuentra en el extremo sur de la distribución de la especie. El clima que predomina en esta región es templado frío, semiárido (Soto y Vázquez 2001), dominado por masas de aire frías y húmedas subpolares con vientos que se incrementan hacia el sur, lo que contribuye con la aridez, característica distintiva del clima Patagónico (Camilloni 2007). La vegetación que se puede encontrar en esta región se compone de arbustos de medio porte y matorrales de mata negra (*Junellia tridens*), mata negra fueguina (*Chiliodendron diffusum*), calafate (*Berberis buxifolia*), parrilla (*Ribes magellanicum*) y matorrales de subarborescentes, entre los que sobresalen la mata torcida enana (*Nardophyllum bryoides*), manca perro (*Nassauvia ulicina*), murtilla (*Empetrum rubrum*) y otros pastos y arbustos enanos (*Festuca*, *Ephedra*, *Lepidophyllum*, *Senecio*; Oliva et al. 2001; Scolaro 2005; Fig. 4B).

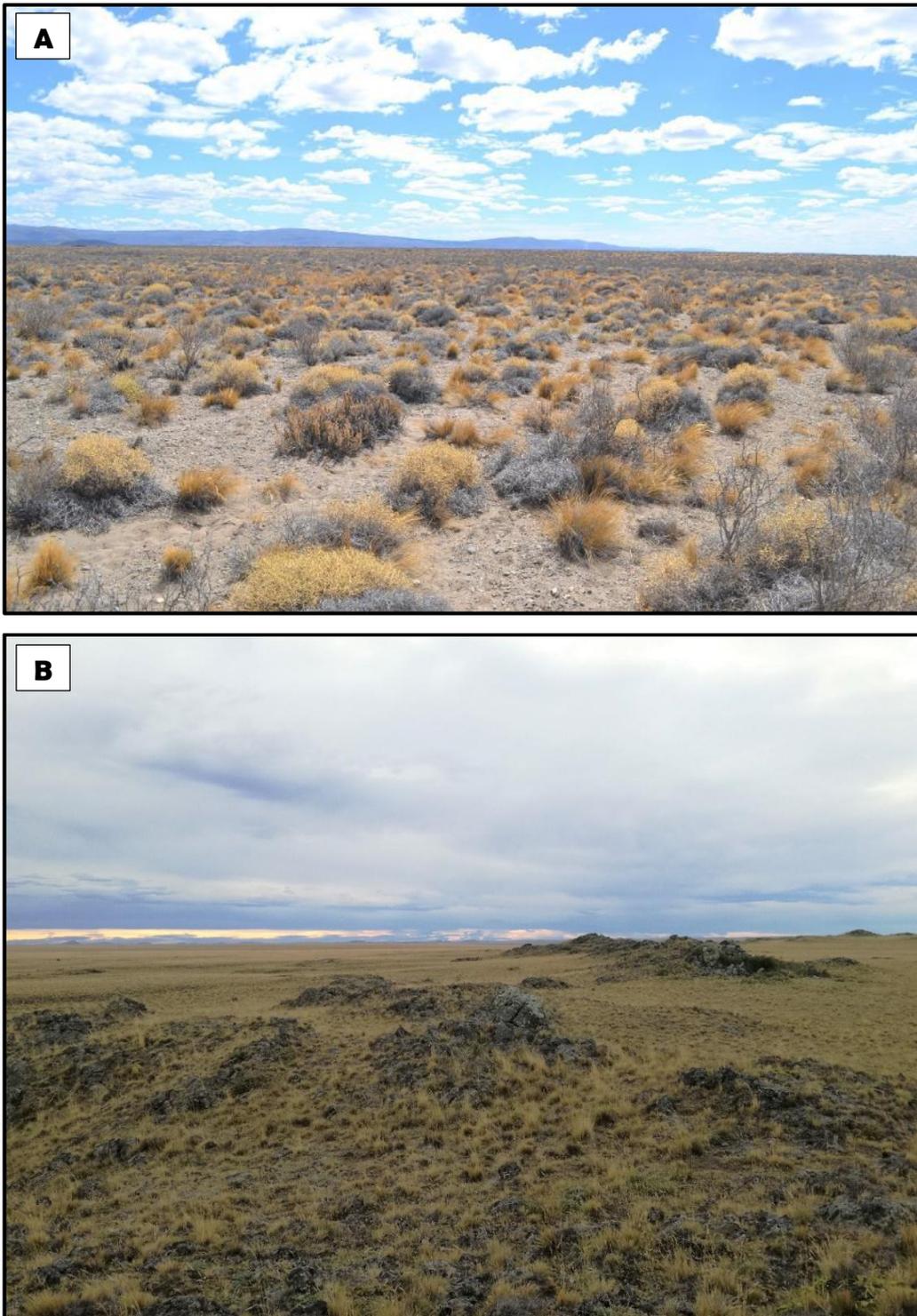
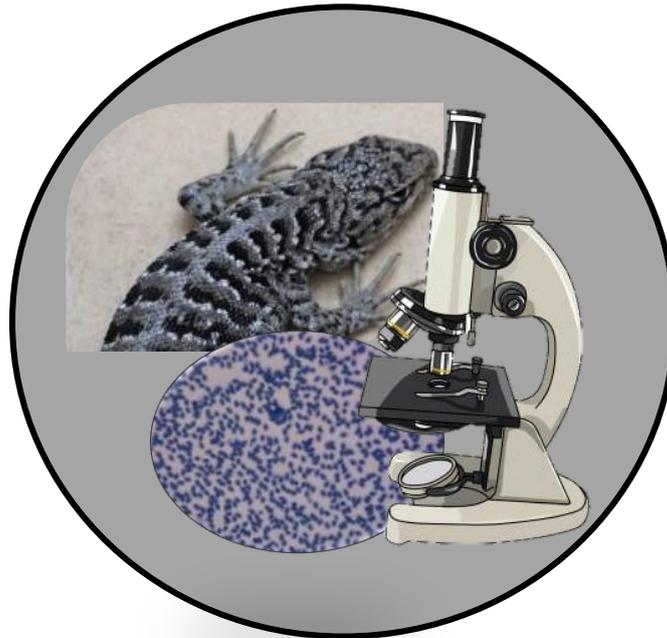


Figura 4. Fotografías de los sitios en los que fueron capturados los individuos de cada especie: estepa en donde habita *Liolaemus kingii* (A) y promontorio rocoso en donde habita *Liolaemus sarmiento* (B).

CAPÍTULO 1: ESTUDIO DEL PERFIL LEUCOCITARIO Y SU RELACIÓN CON LA BIOLOGÍA TÉRMICA Y EL RENDIMIENTO FISIOLÓGICO EN INDIVIDUOS DE *Liolaemus sarmientoi*



1.1 Introducción

La interacción entre las respuestas del sistema inmune y la plasticidad fenotípica del rendimiento fisiológico, relacionado con la aptitud física, define la resistencia de las poblaciones (Graham et al. 2011). El desarrollo de una respuesta inmune y su magnitud depende de varios factores, como por ejemplo el tipo de patógeno que genera la enfermedad, y la condición corporal y la temperatura corporal del huésped (Zimmerman et al. 2010). Tal como se explicó anteriormente, la mayoría de los vertebrados mejoran la capacidad de respuesta del sistema inmunitario mediante cambios en la T_c (Rakus et al. 2017). En particular, los ectotermos que dependen de fuentes de calor externas, modifican su T_c mediante conductas termoregulatorias (Bernheim y Kluger 1976; Kluger 1977, 1979) para mitigar o neutralizar una infección

(Hallman et al. 1990; Deen y Hutchison 2001; do Amaral et al. 2002; Merchant et al. 2008).

Aunque la función inmune puede beneficiarse con un cambio de la T_c , en lagartos esto representa un costo energético que se suma a los costos energéticos que conlleva un desafío inmune, así como también a los costos de mantener una aptitud física óptima. En conjunto estos costos energéticos resultan en un equilibrio entre los beneficios acumulados del control de la T_c y los costos de la termorregulación (Hallman et al. 1990; Ortega et al. 1991; Merchant et al. 2008). En muchos casos, cuando los individuos asignan recursos energéticos a los procesos inmunes, pueden sufrir una disminución general del índice de condición corporal que refleja la cantidad de reservas energéticas almacenadas como grasa (Peig y Green 2009, 2010), afectando el rendimiento general y las interacciones del individuo con el medio ambiente. Una de las variables ecofisiológicas más relevantes que puede verse afectada por la condición corporal del individuo es el rendimiento locomotor, ya que afecta la capacidad de dispersarse, alimentarse, socializar y evadir a los depredadores (Greenwald 1974; Bennett 1980; Christian y Tracy 1981). Por ejemplo, una disminución en la velocidad de pique (carrera corta), en la velocidad durante distancias largas (carrera larga) y en la resistencia locomotora, podrían afectar negativamente la adecuación biológica y, por lo tanto, también la supervivencia (Schall et al. 1982; Oppliger et al. 1996; Garrido y Pérez-Mellado 2013; Zamora-Camacho et al. 2015).

Durante una infección, la actividad del sistema inmune es costosa en términos de la reasignación de reservas energéticas, así como de recursos específicos, como proteínas y aminoácidos (Schmid-Hempel 2011). La asignación de reservas energéticas al desarrollo de una respuesta inmune reduce la disponibilidad de energía para otras funciones, como la reproducción y particularmente, para el desarrollo embrionario en hembras preñadas (Wang et al. 2014). No obstante, en *Urosaurus ornatus* el efecto de los costos energéticos de una respuesta inmune se observó sobre el proceso de vitelogénesis. En esta especie la curación de heridas en las hembras fue aproximadamente un 30% más lenta durante el período de vitelogénesis en comparación con otras etapas reproductivas, sugiriendo que este proceso es energéticamente más exigente (French y Moore 2008). Por lo tanto, el desarrollo de respuestas del sistema inmunitario, así como los costos asociados a la eficiencia termorreguladora necesaria durante una infección, conllevan una serie de

consecuencias costosas que afectan el comportamiento y el rendimiento ecofisiológico en ectotermos (Deen y Hutchison 2001; Zamora-Camacho et al. 2016).

Durante una respuesta inmune se activan y participan los leucocitos (serie de glóbulos blancos) que reconocen agentes extraños o patógenos y responden por fagocitosis (respuesta celular), anticuerpos (respuesta humoral) y agentes oxidantes o lisozimas (Wakelin y Apanius 1997; Zimmerman et al. 2010). En este sentido, se pueden analizar los valores sanguíneos y obtener información diagnóstica valiosa sobre el estado de salud general de los animales mediante el perfil leucocitario y los valores hematológicos como el hematocrito, recuentos totales de eritrocitos y hemoglobina, así como signos claros de patología, como la presencia de parásitos sanguíneos (Sykes y Klaphake 2008; Stacy et al. 2011). Algunos de los leucocitos presentes en circulación sanguínea son componentes importantes del sistema inmune innato o no específico y son la primera línea de defensa contra un agente extraño (Zimmerman et al. 2010, 2020).

La función inmunológica de los leucocitos, aunque varía entre los taxones, es similar en los vertebrados (Davis et al. 2008). En la mayoría de los organismos una alta concentración de hormonas del estrés (glucocorticoides, como la corticosterona) altera la cantidad de leucocitos en circulación, aumentando la cantidad de heterófilos y disminuyendo los linfocitos (Davis et al. 2008; Silvestre 2014). En consecuencia, la relación heterófilo/linfocito (H/L) se usa con frecuencia como una medida indirecta del estrés. Además, una infección provoca un aumento en el número de heterófilos circulantes, que son las primeras células fagocíticas en atacar y absorber partículas y organismos extraños (Davis et al. 2004, 2010).

En los diferentes grupos de reptiles, como también en aves, los heterófilos se consideran equivalentes a los neutrófilos de mamíferos porque exhiben la misma función inmune (Stacy et al. 2011). Los eosinófilos están asociados a infecciones parasitarias y modulan la respuesta inmune mediante la secreción de productos químicos que promueven la fagocitosis, siendo típicamente bajo su número en circulación sanguínea (Rothenberg y Hogan 2006). Los basófilos están involucrados en la inflamación y, cuando son activados por un antígeno, se desgranulan y liberan histamina (Campbell 1995). En cambio, los linfocitos están relacionados con una variedad de funciones inmunológicas, como la producción de inmunoglobulina y la modulación de la defensa inmune (Campbell 1996). Los monocitos también son fagocíticos y pueden aumentar en número en la circulación sanguínea durante las

infecciones (Davis et al. 2004; Bonadiman et al. 2010). Finalmente, los azurófilos son un tipo de leucocitos que se encuentran principalmente en reptiles del Orden Squamata, y que aumentan su número en la circulación sanguínea durante las infecciones y debido al parasitismo en sangre por protozoos (Salakij et al. 2002; Stacy et al. 2011). Por otro lado, es importante mencionar que los eritrocitos de los reptiles son similares en morfología microscópica y ultraestructural a los de otros vertebrados no mamíferos. Aunque, los eritrocitos de reptiles, aves, anfibios y peces presentan núcleo y, por lo tanto, son más grandes que sus homólogos de mamíferos. Lo mismo ocurre con las plaquetas (trombocitos) de reptiles, aves, anfibios y peces que presentan núcleo, a diferencia de las plaquetas de mamíferos (Stacy et al. 2011).

En este Capítulo estudio el perfil leucocitario como parámetro basal del estado inmunológico de individuos de *Liolaemus sarmientoi* y su relación con diferentes variables ecofisiológicas. En particular, caractericé el perfil leucocitario de cada individuo mediante la estimación de los porcentajes de linfocitos, heterófilos, basófilos, eosinófilos y monocitos en frotis de sangre, y analicé su relación con variables ecofisiológicas tales como el índice de condición corporal, la temperatura corporal en el ambiente natural (T_c), la temperatura preferida en el laboratorio (T_p), el rendimiento locomotor y la resistencia locomotora. Todas estas variables ecofisiológicas se relacionan directamente con la adecuación biológica de las especies. Se predice que el estado inmunológico de las lagartijas induce cambios en la termorregulación y en las preferencias térmicas, y afecta el rendimiento y la resistencia locomotora. En particular, espero que los individuos con un alto porcentaje de ciertos tipos de leucocitos en su perfil leucocitario (característico de una respuesta inmune) presenten T_c más altas a la captura y mayores T_p y un rendimiento fisiológico general disminuido. Finalmente, analizo las limitaciones sobre la termorregulación impuestas por la condición corporal y las restricciones ambientales, y discuto los resultados en el marco de la vulnerabilidad a los patógenos de una población de lagartos residentes.

1.2 Materiales y Métodos

1.2.1 Área de estudio y especímenes capturados

El trabajo de campo fue llevado a cabo en el sur de la provincia de Santa Cruz, Argentina (51° S, 69° O; 109 m snm) en noviembre de 2011 por las Dras. Nora Iburgüengoytía, Jimena Fernández y Marlin Medina, integrantes del grupo de Investigación del laboratorio donde desarrollé esta tesis. El clima de esa región, como mencioné anteriormente, se caracteriza por ser templado frío y semiárido (Soto y Vázquez 2001). Los vientos son muy fuertes, con una velocidad media de 37 km/h durante la primavera y el verano, y una velocidad máxima durante el verano que alcanza los 120 km/h, lo que resulta en condiciones climáticas siempre cambiantes. La temperatura media anual del aire es de 8.04 ± 1.37 °C (de 1.2 a 14.1 °C), pero la temperatura media del aire durante el período de actividad de las lagartijas, que comprende de octubre a marzo, es de 12.1 ± 0.81 °C (Estación Meteorológica en Río Gallegos, Santa Cruz, datos del año 2011 cuando se realizó el trabajo de campo).

En el muestreo se capturaron 8 machos juveniles, 14 machos adultos y 15 hembras preñadas de *L. sarmiento* ($N_{total} = 37$) a mano o con lazo, cuando estuvieron activos entre las 10:00 y las 19:00 horas. Inmediatamente después de la captura, se midió la T_c (TES 1303, termómetro digital ± 0.03 °C) utilizando una termocupla (TES TP-K01, 1.62 mm de diámetro) colocada aproximadamente 1 cm dentro de la cloaca. Las mediciones de la T_c se realizaron dentro de los 10 seg luego de la captura para evitar la transferencia de calor desde las manos del operador hacia el ejemplar. Cada sitio de captura fue georreferenciado (datos GPS con resolución de 3 m, GARMIN), lo que permitió devolver a los individuos en el sitio exacto en el cual fueron encontrados luego de finalizar con los experimentos. El permiso de captura (No. 09/09) se obtuvo de la Delegación de Vida Silvestre de la Provincia de Santa Cruz, Argentina. El cuidado de las lagartijas siguió las pautas ASIH/HL/SSAR para el uso de anfibios y reptiles vivos, así como las regulaciones detalladas en la Ley Nacional Argentina No. 14346.

1.2.2 Experimentos de laboratorio

Luego de las capturas las lagartijas fueron trasladados al laboratorio alojadas en bolsas de tela individuales limpias. Los ejemplares se mantuvieron en un lugar tranquilo, y los experimentos se realizaron individualmente para evitar interferencias conductuales entre las lagartijas y minimizar el estrés. Los experimentos se realizaron durante su horario de actividad diaria natural (10:00 a 19:00 hs) y dentro de las 48 hs

posteriores a la captura. Primero, cada individuo realizó la prueba de termorregulación (T_p ; 2 hs de duración) seguido de al menos 2 hs de descanso antes de la prueba de velocidad de carrera que duró aproximadamente 15 min. Luego, cada lagartija descansó al menos 2 hs antes de la prueba de resistencia locomotora. Inmediatamente después de la prueba de resistencia, se tomó una muestra de sangre para la realización de los frotis y se tomaron medidas de la longitud hocico-cloaca (LHC) y la masa corporal (MC). Después de los experimentos, cada lagartija fue liberada en su sitio de captura registrado mediante GPS.

-Temperatura corporal preferida (T_p)

Las lagartijas se colocaron individualmente en terrarios abiertos (100 × 25 × 15 cm) contruidos de madera de fibra de densidad media (MDF; en paredes y sustrato). En cada terrario se estableció un gradiente térmico utilizando una lámpara que genere calor (75 W) colocada en uno de los extremos del terrario. Se colocó papel aluminio para cubrir el extremo caliente de cada terrario y minimizar la pérdida de calor hacia las paredes del mismo durante el experimento. Con esto, logramos un gradiente térmico de 17 - 40 °C a lo largo de cada terrario. Los gradientes de temperatura se monitorearon continuamente durante el experimento usando un termómetro (TES 1303; termómetro digital ± 0.03 °C). En los terrarios no se colocó ningún sustrato especial, refugio, agua o comida durante los experimentos a fin de ofrecer a los individuos la posibilidad de elegir conductualmente su T_p sin distracciones. La T_c de cada individuo se midió utilizando una termocupla ultrafina (0.08 mm) colocada aproximadamente 1 cm dentro de la cloaca y sujeta a la base de la cola con cinta adhesiva hipoalérgica, lo que permitió el movimiento normal y el comportamiento habitual de las lagartijas. El otro extremo de cada termocupla ultrafina estaba conectado a un Módulo de adquisición de datos (USB-TC08, OMEGA) que registraba automáticamente la temperatura corporal a intervalos de 1 min simultáneamente en todos los ejemplares. Las lagartijas, con las termocuplas conectadas, se colocaron en el gradiente térmico y se les permitió aclimatarse y recuperarse de la manipulación durante 20 min, luego de lo cual se registró su T_p continuamente durante 2 hs (de acuerdo con las metodologías de Iburgüengoytía et al. 2010). Así, para cada ejemplar se obtuvo la temperatura corporal preferida media (T_p), el valor mínimo (T_{p-min}) y el

valor máximo (T_{p-max}) seleccionados, que fueron utilizados para analizar su relación con el perfil leucocitario.

-Rendimiento Locomotor

Antes de llevar a cabo los experimentos de velocidad de carrera corta y larga (CC y CL respectivamente) y los experimentos de resistencia locomotora, las lagartijas se mantuvieron 30 min a temperaturas cercanas a la T_p media obtenida para la especie (34.43 ± 0.28 °C; Ibarquengoytía et al. 2010) en un terrario (35 x 20 x 20 cm) acondicionado con una lámpara incandescente de 75 W. La temperatura se registró usando una termocupla colocada aproximadamente 1 cm dentro de la cloaca del individuo y conectada a un termómetro digital (TES 1303; ± 0.03 °C). En todos los experimentos (CC, CL y resistencia) si era necesario, se alentó a los individuos a correr tocándolos suavemente en las patas traseras o en la cola de manera de evitar interferir con el rendimiento locomotor.

- *Velocidad de Carrera Corta y Larga*

Las pruebas se realizaron en un dispositivo de carreras de 0.07 m de ancho y 1.20 m de longitud, con una plancha de corcho como sustrato y un refugio en un extremo (Fig. 5). El movimiento del individuo fue detectado por ocho fotocélulas colocadas a intervalos de 0.15 m a lo largo de la pista y conectadas a un ordenador y, de esta manera, se registró la velocidad en cada sección de 0.15 m y en la longitud total de 1.05 m. Para el análisis de los datos obtenidos, el recorrido se dividió en un componente de carrera corta (CC, primera sección de 0.15 m), y un componente de carrera larga (CL; 0.15 - 1.20 m), ambas carreras indicativas de la capacidad locomotora de la lagartija, aunque con diferentes implicancias ecofisiológicas. Las carreras cortas de 0.15 m representan la primera respuesta de estallido o escape de un depredador, ya que la velocidad máxima suele alcanzarse en los primeros milisegundos de la respuesta y en el campo, representan la distancia entre dos grietas cercanas o dos arbustos contiguos. Mientras tanto, los recorridos de 1.05 m representan las distancias más largas que las lagartijas suelen utilizar para actividades como la búsqueda de alimento, la defensa territorial y el cortejo (Miles 2004; Cabezas-Cartes et al. 2014).

Cada lagartija corrió tres veces consecutivas a una $T_c = 32.81 \pm 0.33$ °C, que corresponde a una temperatura cercana a la media de su T_p (Ibargüengoytía et al. 2010). Sólo se usó en los análisis la velocidad de carrera máxima de las tres carreras realizadas tanto para CC o CL por cada lagartija. Seguimos las metodologías utilizadas anteriormente para *L. sarmientoi* (Fernández et al. 2011) y otros *Liolaemus* (Kubisch et al. 2011).

- *Resistencia Locomotora*

Se midió la resistencia física para la locomoción en una cinta de correr ajustada a una velocidad de 0.5 km/h siguiendo la metodología de Sinervo et al. (2000; Fig. 5). La resistencia locomotora se definió como el tiempo en que los individuos corrieron en la cinta hasta que mostraron signos visibles de agotamiento corporal, indicado por la incapacidad de los individuos de enderezarse cuando se colocan boca arriba (Sinervo y Huey 1990; Sinervo et al. 2000). Las lagartijas corrieron a una $T_c = 34.36 \pm 0.08$, que corresponde a una temperatura cercana a la media de su T_p (Ibargüengoytía et al. 2010). La temperatura se mantuvo mientras corrían gracias a una lámpara incandescente de 75 W colocada arriba de la cinta de correr.

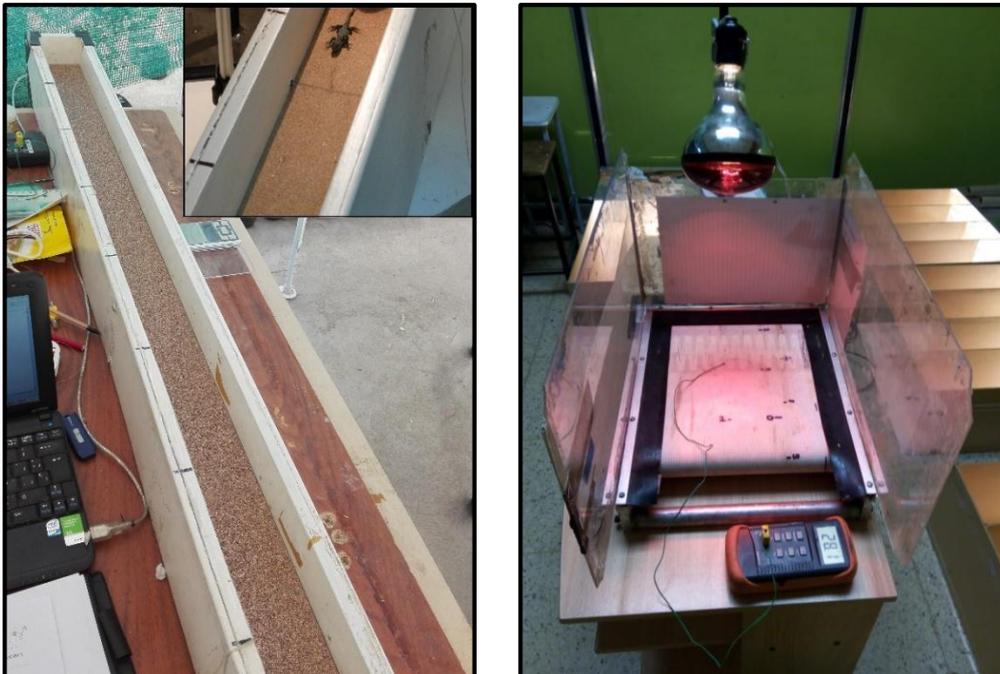


Figura 5. Experimentos de Rendimiento Locomotor. Fotos de los dispositivos utilizados para determinar las velocidades de carrera corta y carrera larga (**Izquierda**) y la resistencia locomotora de cada individuo (**Derecha**).

1.2.3 Determinación del índice de condición corporal (ICC)

Analicé la condición de los ejemplares usando el índice de condición corporal (ICC), calculado como:

$$ICC = M_i \times [LHC_0/LHC_i]^{bSMA}$$

donde M_i y LHC_i son la masa y LHC del individuo, LHC_0 es la media aritmética del LHC de la población, y el exponente de $bSMA$ es la pendiente del eje mayor estandarizada de la regresión de \ln (MC) en \ln (LHC) para la población (Peig y Green 2009, 2010). Calculé el exponente de $bSMA$ usando el paquete "lmodel2" (Legendre 2015) en R versión 3.5.3 (R Core Team 2015). Determiné el ICC de cada juvenil y macho adulto, mientras que excluí a las hembras de los análisis ya que todas estaban preñadas.

1.2.4 Frotis de sangre

Al finalizar los experimentos y con los ejemplares mantenidos a temperatura ambiente (20 a 25 °C), se extrajo una muestra de sangre a partir de un corte de la punta de la cola de cada individuo, con la que se realizó un frotis de sangre en un portaobjetos de vidrio. El frotis de sangre se fijó con calor y se guardó para su posterior tinción y análisis. En el marco del desarrollo de ésta tesis realicé la tinción de los frotis con May-Grünwald Giemsa (Biopack®), una tinción que resalta las granulaciones y mejora la coloración de los eritrocitos, los trombocitos y los diferentes tipos de leucocitos (Martínez-Silvestre et al. 2011; Fig. 6). Luego analicé los frotis de sangre en microscopio para determinar los perfiles leucocitarios (expresados como un porcentaje de cada tipo de glóbulo blanco), siguiendo un método de conteo manual conocido como "guarda griega" o zig-zag de Shilling. El método consiste en seleccionar aleatoriamente un campo y mover el portaobjetos de arriba hacia abajo y de izquierda a derecha a través de diferentes campos hasta contar 100 leucocitos (Fig. 7). Clasifiqué los leucocitos como linfocitos, heterófilos, basófilos, eosinófilos,

monocitos y azurófilos, utilizando la caracterización desarrollada para reptiles descrita en Stacy et al. (2011). También calculé la relación heterófilo/linfocito (H/L). Los azurófilos no se incluyeron en el análisis posterior porque se encontraron sólo en un frotis (un macho adulto). Para analizar los frotis de sangre utilicé un microscopio óptico (Olympus® BX51, America Inc., Melville, NY, EUA; 1000X con aceite de inmersión) equipado con una cámara (TUCSEN® DigiRetina16; sensor CMOS de 16mp) y un software de análisis de imágenes ImageJ 1.51n/Fiji (Wayne Rasband, Institutos Nacionales de Salud, EE UU). Elegí al azar una sub-muestra de un total de 21 frotis de juveniles ($N = 6$), machos adultos ($N = 7$) y hembras preñadas ($N = 8$) para fotografiar y medir el diámetro de los diferentes tipos de leucocitos (μm) y obtener una media del diámetro para cada uno. Para determinar los tamaños celulares utilicé la media de las mediciones de cada tipo de leucocitos obtenida de cada frotis (o individuo) con el fin de evitar la pseudoreplica.

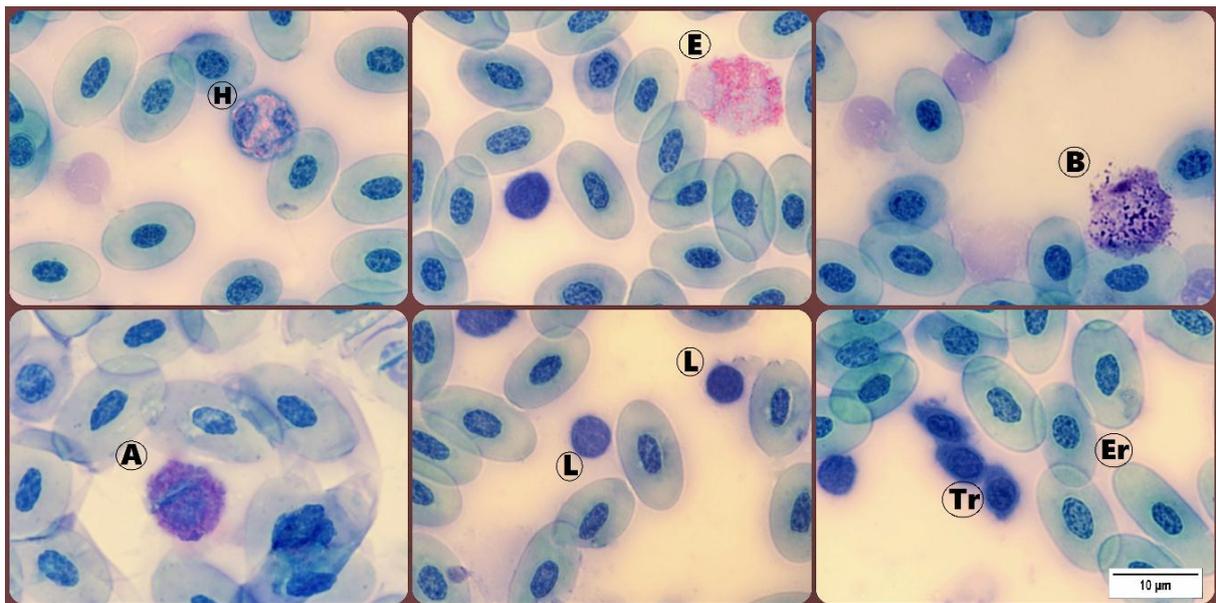


Figura 6. Imagen que ilustra los diferentes tipos de células sanguíneas presentes en una muestra de sangre tomada de una lagartija de la especie *L. sarmientoi*. Heterófilo (H), eosinófilo (E), basófilo (B), azurófilo (A), linfocitos (L), trombocitos (Tr) y eritrocitos (Er).

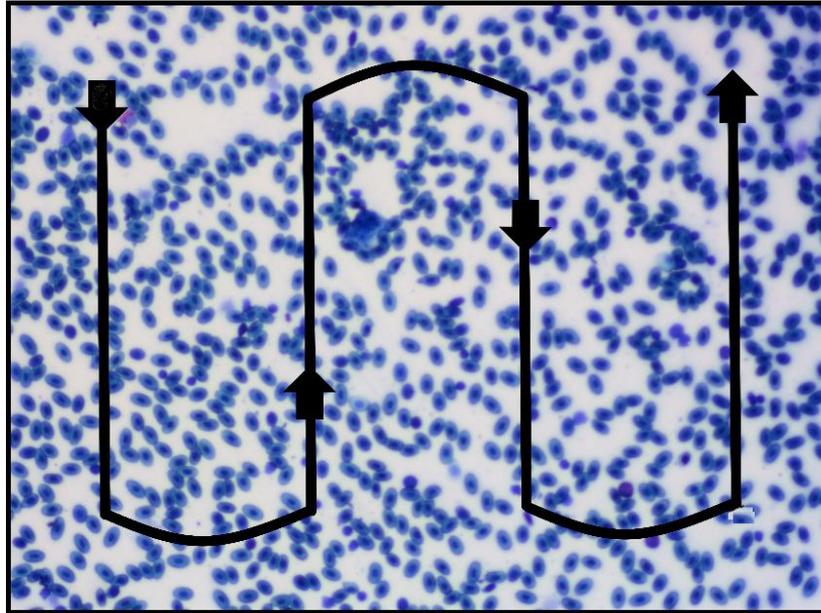


Figura 7. Imagen que ilustra el método de conteo “guarda griega” o zig-zag de Shilling con el cual se recorren diferentes campos del frotis sanguíneo bajo microscopio, para determinar el perfil leucocitario.

1.2.5. Análisis estadístico

Analicé las diferencias en los porcentajes de linfocitos, heterófilos, basófilos, eosinófilos, monocitos y relación H/L entre juveniles, machos adultos y hembras preñadas mediante el Análisis de varianza de una vía (ANOVA) o pruebas equivalentes no paramétricas como Kruskal-Wallis y método de Dunn’s, como prueba *a posteriori* (SPSS 17.0® o software Sigma Stat 3.5®). El efecto del LHC en todas las variables las analicé mediante Regresión Simple. Para aquellas variables que mostraron una dependencia significativa del LHC, obtuve los residuos usando SPSS 17.0® y reemplacé las variables originales (residuos de la variable T_{p-min} en machos adultos y residuos de la variable de resistencia en hembras preñadas).

Los efectos del perfil leucocitario en la T_c , la T_p , la T_{p-min} , la T_{p-max} , la velocidad de carrera corta y larga, y la resistencia locomotora de juveniles, machos adultos y hembras preñadas los analicé mediante Regresión Múltiple por pasos (SPSS 17.0®). Utilicé el programa R (R Core Team 2015) para obtener el índice de condición corporal. Analicé las relaciones del índice de condición corporal de los juveniles y los machos adultos con el perfil leucocitario mediante Regresión Múltiple por pasos. Las relaciones entre las variables fisiológicas (T_c , T_p , T_{p-min} , T_{p-max} , velocidad de carrera

corta y larga, y resistencia locomotora), ya sea con el índice de condición corporal o con la relación H/L las analicé mediante Regresiones Lineales Simples (SPSS 17.0®). Comparé el índice de condición corporal medio de juveniles y machos adultos mediante la prueba-*t* de Student. Los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza para los procedimientos paramétricos fueron verificados mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente (Sokal y Rohlf 1969) con SPSS 17.0® y Sigma Stat 3.5®. Las figuras que presento fueron realizadas usando el programa Sigma Plot 10.0®. Los valores medios se presentan con sus errores estándar (± 1 SE).

1.3 Resultados

1.3.1 Descripción de los glóbulos blancos y el perfil leucocitario de *L. sarmiento*

Las células encontradas con mayor frecuencia fueron los linfocitos, seguidas por los heterófilos. Las abundancias de los otros tipos de leucocitos como basófilos, eosinófilos y monocitos fueron mucho más bajas. Los heterófilos exhibieron un tamaño mediano (media = 11.59 ± 0.22 μm , rango = 8 - 17 μm , $N_{\text{total de células}} = 70$, $N_{\text{individuos}} = 15$, 4 - 5 células por individuo), núcleo bilobulado redondo y excéntrico y citoplasma claro con gránulos ovalados o alargados de coloración rosa-anaranjado brillante (Fig. 8a). El tamaño de los eosinófilos fue mayor y más variable que el de los heterófilos (media = 16.71 ± 0.41 μm , rango = 12 - 22 μm , $N_{\text{total de células}} = 30$, $N_{\text{individuos}} = 17$, 1 - 2 células por individuo), y exhibieron un núcleo excéntrico y citoplasma claro con gránulos rosados esféricos (Fig. 8b). Los basófilos generalmente exhibieron un tamaño mediano (media = 10.57 ± 0.49 μm , rango = 7 - 17 μm , $N_{\text{total de células}} = 30$, $N_{\text{individuos}} = 14$, 1 - 3 células por individuo) y se caracterizaron por la presencia de un citoplasma de color púrpura pálido con abundantes gránulos basófilos oscuros que cubren el núcleo en su totalidad y lo hacen indistinguible (Fig. 8c). Los linfocitos se presentaron como células agranulíticas pequeñas (media = 7.23 ± 0.18 μm , rango = 5 - 11 μm , $N_{\text{total de células}} = 70$, $N_{\text{individuos}} = 15$, 4 - 5 células por individuo) caracterizadas por la presencia de una alta relación núcleo-citoplasma con citoplasma basófilo (Fig. 8d). Sólo un monocito fue fotografiado y medido; presentó un tamaño mediano (11.68 μm), núcleo oval bilobulado, y abundante citoplasma azul pálido grisáceo (Fig. 8e).

Finalmente, los azurófilos se presentaron similares a los monocitos y exhibieron un tamaño mediano (media = $11.98 \pm 0.38 \mu\text{m}$, $N_{\text{total de células}} = 3$, $N_{\text{individuos}} = 1$), un núcleo central generalmente redondeado u ovalado, con una alta relación núcleo-citoplasma y con pequeños gránulos azurófilos dispersos en el citoplasma (Fig. 8f).

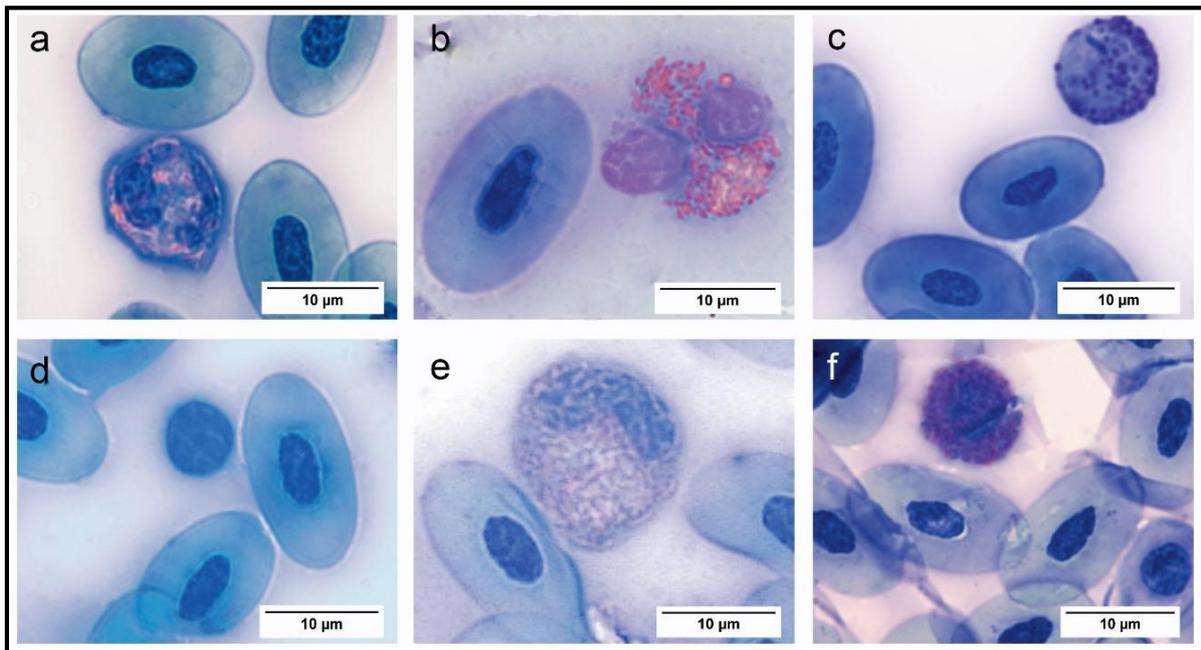


Figura 8. Imagen que ilustra los tipos de leucocitos de un individuo de la especie *L. sarmiento* y sus tamaños relativos: **a** – heterófilo (mediano); **b** – eosinófilo (mediano a grande); **c** – basófilo (mediano); **d** – linfocito (pequeño); **e** – monocito (grande); **f** – azurófilo (mediano).

1.3.2 Comparación del perfil leucocitario en machos juveniles, machos adultos y hembras preñadas

Los machos juveniles exhibieron más basófilos que las hembras preñadas, pero no mostraron diferencias con respecto a los machos adultos, y no hubo diferencia entre machos adultos y hembras preñadas (Kruskal–Wallis, $H_2 = 8.146$, $P = 0.017$; Dunn's Method, $Q_{\text{juveniles vs hembras}} = 2.755$, $P < 0.05$; $Q_{\text{machos vs juveniles}} = 2.146$, $P > 0.05$; $Q_{\text{machos vs hembras}} = 0.686$, $P > 0.05$; Tabla 1). Por otro lado, los machos juveniles, los machos adultos y las hembras preñadas no mostraron diferencias en el porcentaje de linfocitos, heterófilos, eosinófilos y monocitos ($P > 0.05$; Tabla 1). La relación H/L no difirió entre los machos juveniles, los machos adultos y las hembras preñadas

(Kruskal-Wallis, $H_2 = 1.497$, $P = 0.473$; Tabla 1) y, en consecuencia, se juntaron sus datos para analizar su relación con las variables termofisiológicas y de rendimiento locomotor (ver más abajo).

Tabla 1. Perfil leucocitario (porcentaje de linfocitos, heterófilos, basófilos, eosinófilos y monocitos), relación heterófilo/linfocito (H/L), y comparación entre machos juveniles, machos adultos y hembras preñadas de *L. sarmientoi*. Se presenta la media (\pm SE) o mediana (cuando la distribución de los datos no es normal), valores mínimos y máximos, el tamaño de muestra (N) y la comparación entre grupos, Análisis de varianza (ANOVA) o prueba de Kruskal-Wallis. Los valores P significativos se resaltan en negrita.

Perfil	Juveniles			Machos adultos			Hembras preñadas			Total			ANOVA o Kruskal-Wallis P	
	Media (\pm SE) o Mediana	min-max	N	Media (\pm SE) o Mediana	min-max	N	Media (\pm SE) o Mediana	min-max	N	Media (\pm SE) o Mediana	min-max	N		
Linfocitos (%)	68.50 (4.16)	49-82	8	71.42 (3.77)	39-90	14	76.60 (3.68)	40-93	15	72.89 (2.26)	39-93	37	$F_{2, 36} = 1.036$	0.366
Heterófilos (%)	24.87 (4.04)	12-43	8	24.64 (3.58)	6-55	14	21.40 (3.49)	6-53	15	19	6-55	37	$H_2 = 1.154$	0.561
Basófilos (%)	5.62 (1.80)	1-17	8	2.00 (0.57)	0-7	14	1.26 (0.30)	0-3	15	2	0-17	37	$H_2 = 8.146$	0.017
Eosinófilos (%)	0.87 (0.39)	0-3	8	1.42 (0.27)	0-3	14	0	0-3	15	1	0-3	37	$H_2 = 5.203$	0.074
Monocitos (%)	0	0-1	8	0	0-3	14	0	0-1	15	0	0-3	37	$H_2 = 2.767$	0.251
H/L	0.40 (0.09)	0.14-0.87	8	0.40 (0.09)	0.06-1.41	14	0.23	0.06-1.32	15	0.28	0.06-1.41	37	$H_2 = 1.497$	0.473

1.3.3 Relación del índice de condición corporal, la termofisiología y el rendimiento locomotor con el perfil leucocitario

En la Tabla 2 se muestran los valores de las medias (\pm error estándar) de las variables termofisiológicas, de rendimiento locomotor y del índice de condición corporal con un propósito descriptivo para machos juveniles, machos adultos y hembras preñadas. El índice de condición corporal de los machos juveniles y adultos no mostró diferencias (prueba- t , $t_{20} = -0.140$, $P = 0.890$), en consecuencia, se agruparon en los análisis posteriores. El índice de condición corporal no mostró una

relación significativa con el perfil leucocitario (Regresión Múltiple por pasos, $F_{4,21} = 0.77$, $r^2 = 0.154$, $P = 0.558$; los linfocitos fueron excluidos del modelo debido a que presentaron colinealidad).

Tabla 2. Valores de la media (\pm error estándar; SE) y tamaño de la muestra (N) de las variables fisiológicas medidas para *L. sarmientoi*: longitud hocico-cloaca (LHC, mm), masa corporal (MC, gr), temperatura corporal (T_c , °C), temperatura corporal preferida (T_p , °C), temperatura corporal mínima preferida (T_{p-min} , °C), temperatura corporal máxima preferida (T_{p-max} , °C), carrera corta (CC, m/seg), carrera larga (CL, m/seg) y resistencia locomotora (seg) de machos juveniles, machos adultos y hembras preñadas, e índice de condición corporal de machos juveniles y adultos.

Variables fisiológicas	Machos Juveniles		Machos adultos		Hembras preñadas	
	Media (\pm SE)	N	Media (\pm SE)	N	Media (\pm SE)	N
LHC	54.97 (1.47)	8	80.12 (1.69)	14	77.32 (1.64)	15
MC	4.61 (0.37)	8	14.64 (0.81)	14	12.33 (0.99)	15
T_c	26.40 (2.49)	6	27.44 (1.56)	13	27.99 (1.03)	15
T_p	34.09 (0.29)	7	34.29 (0.34)	13	33.54 (0.19)	15
T_{p-min}	29.89 (0.85)	7	28.98 (0.65)	13	29.47 (0.70)	15
T_{p-max}	38.11 (0.31)	7	37.94 (0.49)	13	36.69 (0.40)	15
CC	0.98 (0.18)	8	0.85 (0.16)	14	0.99 (0.10)	15
CL	1.17 (0.19)	8	1.25 (0.10)	14	1.10 (0.07)	15
Resistencia física	240.89 (31.62)	8	440.41 (76.20)	14	254.17 (30.35)	15
ICC	9.97 (0.45)	8	10.04 (0.27)	14		

En los machos juveniles, las únicas dos variables fisiológicas que mostraron una relación significativa con el perfil leucocitario fueron la T_{p-max} , que aumentó con el número de basófilos (Regresión Múltiple por pasos, $F_{1,7} = 7.208$, $r^2 = 0.546$, $P = 0.036$; Tabla 3), y la resistencia locomotora, que disminuyó con la relación lineal de los heterófilos y eosinófilos ($F_{2,7} = 5.859$, $r^2 = 0.701$, $P = 0.049$; Tabla 3). La T_c , T_p , T_{p-min} , y la velocidad de carrera corta y larga no exhibieron una relación con el perfil leucocitario (Regresión Múltiple por pasos, $P > 0.05$; Tabla 3).

En los machos adultos, la T_{p-max} también mostró un aumento con el número de basófilos en sangre ($F_{1,12} = 33.859$, $r^2 = 0.755$, $P = 0.001$; Tabla 3), y la T_p presentó una relación positiva con el número de eosinófilos y basófilos, y una relación negativa con los monocitos (Regresión Múltiple por pasos, $F_{3,12} = 17.86$, $r^2 = 0.859$, $P = 0.001$;

Tabla 3). La T_c , T_{p-min} , la velocidad de carrera corta y larga, y la resistencia locomotora de los machos adultos no exhibieron una relación significativa con el perfil leucocitario (Regresión Múltiple por pasos, $P > 0.05$; Tabla 3).

Las hembras preñadas no mostraron una relación entre las variables fisiológicas medidas (T_c , T_p , T_{p-min} , T_{p-max} , velocidad de carrera corta y larga, y resistencia locomotora) y el perfil leucocitario (Regresión Múltiple por pasos, $P > 0.05$; Tabla 3).

Tabla 3. Análisis de regresión múltiple por pasos de las variables temperatura corporal (T_c , °C), temperatura corporal preferida (T_p , °C), temperatura corporal mínima preferida (T_{p-min} , °C), temperatura corporal máxima preferida (T_{p-max} , °C), carrera corta (CC, m/seg), carrera larga (CL, m/seg) y resistencia locomotora (seg) versus el perfil leucocitario, en machos juveniles, machos adultos y hembras preñadas. Se presentan los coeficientes de regresión, el coeficiente de correlación (r^2) y los valores P . El asterisco (*) indica cuándo se utilizaron los residuos entre la longitud hocico-cloaca (LHC) y la T_{p-min} o resistencia locomotora. Los valores de P significativos se resaltan en negrita.

		Perfil leucocitario					
		Machos Juveniles		Machos adultos		Hembras preñadas	
			P		P		P
T_c	<i>coefficients</i>	$F_{3,5} = 3.48$	0.231	$F_{4,12} = 0.19$	0.933	$F_{4,14} = 0.60$	0.666
	r^2	0.839		0.090		0.196	
T_p	<i>coefficients</i>	$F_{3,7} = 0.71$	0.594	$F_{3,12} = 17.86$	<0.001	$F_{4,14} = 1.34$	0.319
				$t_{basófilos} = 6.84$	<0.001		
				$t_{eosinófilos} = 4.63$	0.001		
				$t_{monocitos} = 3.88$	0.004		
	r^2	0.348		0.856		0.350	
T_{p-min}	<i>coefficients</i>	$F_{3,7} = 0.57$	0.660	$F_{4,12} = 2.03^*$	0.183	$F_{4,14} = 1.34$	0.320
	r^2	0.302		0.504		0.349	
T_{p-max}	<i>coefficients</i>	$F_{1,7} = 7.20$	0.036	$F_{1,12} = 33.85$	<0.001	$F_{4,14} = 1.96$	0.176
		$t_{basófilos} = 2.68$	0.036	$t_{basófilos} = 5.81$	<0.001		
	r^2	0.545		0.755		0.440	
CC	<i>coefficients</i>	$F_{3,7} = 1.55$	0.332	$F_{4,13} = 1.83$	0.206	$F_{1,14} = 2.18$	0.144
	r^2	0.538		0.449		0.418	
CL	<i>coefficients</i>	$F_{3,7} = 0.69$	0.604	$F_{4,13} = 0.50$	0.733	$F_{4,14} = 0.68$	0.621

	r^2	0.341		0.183		0.214	
Resistencia	<i>coefficients</i>	$F_{2,7} = 5.85$	0.049	$F_{4,13} = 0.37$	0.822	$F_{4,13} = 1.83^*$	0.206
		$t_{\text{heterófilos}} = -2.88$	0.034				
		$t_{\text{eosinófilos}} = -2.18$	0.080				
	r^2	0.701		0.142		0.450	

1.3.4 Efectos del índice de condición corporal y la relación H/L sobre la termofisiología y el rendimiento locomotor

Las variables fisiológicas analizadas (T_c , T_p , $T_{p\text{-min}}$, $T_{p\text{-max}}$, velocidad de carrera corta y larga, y resistencia locomotora) no mostraron una relación significativa con el índice de condición corporal (Regresión Lineal, $P > 0.05$; Tabla 4). La T_c , T_p , $T_{p\text{-min}}$, $T_{p\text{-max}}$, velocidad de carrera corta y larga, y resistencia locomotora tampoco mostraron relaciones significativas con la relación H/L (Regresión Lineal, $P > 0.05$; Tabla 4).

Tabla 4. Análisis de regresión lineal de las variables medidas y el índice de condición corporal (ICC; en datos combinados de machos juveniles y adultos) y la relación heterófilos/linfocitos (H/L; en datos combinados de machos juveniles y adultos y hembras preñadas). Se indican los coeficientes de regresión, de correlación (r^2) y los valores P .

	ICC			H/L		
	<i>(machos juveniles y adultos)</i>			<i>(machos juveniles, adultos y hembras preñadas)</i>		
	<i>coeficientes</i>	r^2	P	<i>coeficientes</i>	r^2	P
T_c	$F_{1,18} = 0.25$	0.015	0.622	$F_{1,33} = 0.84$	0.026	0.365
T_p	$F_{1,20} = 0.38$	0.019	0.542	$F_{1,35} = 1.59$	0.045	0.216
$T_{p\text{-min}}$	$F_{1,20} = 4.24$	0.183	0.053	$F_{1,35} = 1.46$	0.041	0.234
$T_{p\text{-max}}$	$F_{1,20} = 0.08$	0.004	0.779	$F_{1,35} = 1.29$	0.037	0.263
CC	$F_{1,21} = 1.09$	0.052	0.309	$F_{1,36} = 2.69$	0.071	0.110
CL	$F_{1,21} = 1.66$	0.077	0.212	$F_{1,36} = 0.95$	0.027	0.334
Resistencia	$F_{1,21} = 0.77$	0.037	0.389	$F_{1,36} = 0.38$	0.011	0.541

1.4 Discusión

Las diferencias entre géneros, especies o incluso entre individuos en el porcentaje de ciertos leucocitos hallados en frotis sanguíneos, pueden estar relacionadas con variables extrínsecas e intrínsecas. Por ejemplo, se han hallado diferencias en la abundancia de ciertos leucocitos en diferentes estaciones del año (Sandmeier et al. 2016), antes y después de la hibernación (Sykes y Klaphake 2008; Stacy et al. 2011) y también entre neonatos y adultos (Brown y Shine 2016, 2018). Los porcentajes leucocitarios varían ampliamente entre los diferentes grupos de vertebrados, y dentro de Squamata se describen diferencias en la abundancia y la morfología de los gránulos, en los patrones de tinción citoquímica y en el porcentaje relativo de los distintos tipos celulares en la sangre periférica (Stacy et al. 2011). La mayoría de los estudios solo informan la variación en la proporción de los diferentes tipos de leucocitos, pero en general no discuten las posibles causas o los costos ecofisiológicos de dichas variaciones. Por ejemplo, en tortugas sanas de agua dulce de la especie *Graptemys gibbonsi* mantenidas en cautiverio se encontró un alto porcentaje de basófilos (hasta el 50%) del total de leucocitos en comparación con otros reptiles (Perpiñán et al. 2008). Por el contrario, se informó un predominio de heterófilos en el perfil leucocitario en cocodrilos, como *Crocodylus palustris* (Stacy y Whitaker 2000) y *Caiman crocodilus* (Rossini et al. 2011), en la tortuga marina *Caretta caretta* (Casal et al. 2009), y en algunos lagartos como *Uromastix spp.* (Naldo et al. 2009). En el género *Liolaemus*, un estudio realizado en *L. wiegmannii* proporcionó una descripción de los valores hematológicos, evidenciando también una alta proporción de heterófilos en relación con los otros leucocitos (Ceballos de Bruno 1995). Sin embargo, en los lagartos *Pogona vitticeps* (Eliman 1997), *Leiolepis belliana rubritaeniata* (Ponsen et al. 2008), *Ctenosaura melanosterna* (Davis et al. 2011) y en algunas especies del género *Podarcis* y *Algyroides* (Sacchi et al. 2011), los linfocitos fueron las células más abundantes en el perfil leucocitario. En la población de *Liolaemus sarmiento* estudiada en la presente Tesis, el porcentaje de linfocitos y heterófilos encontrado fue similar al registrado para otras especies de lagartos y también en serpientes (70-80% de linfocitos y 15-40% de heterófilos; Martínez-Silvestre et al. 2011; Stacy et al. 2011; Sykes y Klaphake 2015; Heatley y Russel 2019), mientras que los porcentajes de eosinófilos, basófilos y especialmente monocitos y azurófilos fueron comparativamente escasos. En particular, los

porcentajes de basófilos variaron entre machos juveniles y hembras preñadas de *L. sarmientoi* (Duran et al. 2019).

En ambientes templados fríos, alcanzar temperaturas óptimas tanto para un desempeño fisiológico adecuado, como para combatir una infección, plantea un desafío para las especies que lo habitan, como *L. sarmientoi*, dada la baja disponibilidad de microambientes en los cuales es posible elevar la T_c a valores cercanos a su T_p (Ibargüengoytía et al. 2010; Fernández et al. 2011). La termorregulación y el rendimiento locomotor de los individuos de *L. sarmientoi* mostró relación con el perfil leucocitario, sugiriendo así, un ajuste fisiológico para mejorar la respuesta inmune a una posible infección o enfermedad. Los individuos de *L. sarmientoi* seleccionaron mayores temperaturas (T_p y T_{p-max}) al presentar altos recuentos de algunos leucocitos en particular, como eosinófilos o basófilos, que están relacionados con la respuesta inmune innata. Este resultado sugiere que las lagartijas podrían mejorar la actividad fagocítica mediante un incremento de la T_c lograda por termorregulación conductual. En particular, los machos juveniles respondieron seleccionando en el laboratorio temperaturas más altas mientras mostraban un alto porcentaje de basófilos, al igual que los machos adultos que exhibieron un alto porcentaje de eosinófilos y basófilos, y un bajo porcentaje de monocitos. En contraste, las hembras preñadas de *L. sarmientoi* no mostraron una relación entre el perfil leucocitario y las temperaturas preferidas en el laboratorio (T_p , T_{p-min} o T_{p-max}).

Existe un equilibrio entre mejorar la respuesta inmune y las ventajas de mantener temperaturas estables adecuadas para los procesos fisiológicos durante el desarrollo embrionario (French y Moore 2008). En general, se espera que las hembras durante las temporadas de reproducción inviertan menos en respuestas inmunitarias inflamatorias inespecíficas en comparación con los machos debido a las diferencias en la asignación energética a la reproducción (Lee 2006). En la naturaleza, las lagartijas de *L. sarmientoi* están expuestas a una temperatura media del aire de 12 °C durante la mayor parte de la temporada de actividad (primavera y verano), pero pueden alcanzar una T_c media de 27.9 ± 1.03 °C mediante termorregulación activa en el campo. Sin embargo, esta T_c está muy por debajo de la T_p seleccionada en el laboratorio (33.5 ± 0.19 °C, resultado obtenido en este Capítulo de la presente Tesis). Esta diferencia entre la T_c medida en el campo y la T_p seleccionada en el laboratorio es una característica de la familia Liolaemidae (Ibargüengoytía et al. 2021) y está además corroborada por trabajos previos realizados en otra población de la misma

especie ($T_c = 26.2 \pm 0.55$ °C; $T_p = 34.4 \pm 0.28$ °C; Ibargüengoytía et al. 2010) y en otros liolaémidos de ambientes fríos (Medina et al. 2011; Moreno Azócar et al. 2013). Las T_c registradas en lagartos que habitan en ambientes templados fríos si bien son consideradas subóptimas, facilitaría a las hembras preñadas el mantenimiento de T_c estables que evitarían el desarrollo de anomalías embrionarias, beneficiando así la aptitud de la descendencia de acuerdo a la hipótesis de la manipulación materna que explica la evolución de la viviparidad en ambientes de climas fríos (Shine 1995, 2004). Estudios realizados en poblaciones patagónicas de *Liolaemus pictus* (Ibargüengoytía y Cussac 2002) y *L. sarmientoi* (Fernández et al. 2017a) dan sustento a esta hipótesis. En particular, las hembras preñadas de *L. sarmientoi* podrían verse limitadas de desarrollar una respuesta termorreguladora de fiebre conductual ante una infección porque las T_c más altas y más variables han demostrado ser perjudiciales para el desarrollo embrionario y la supervivencia de los recién nacidos (Fernández et al. 2017a). Se demostró en *L. sarmientoi* que las hembras preñadas mantienen un rango de T_p más estrecho que el resto de la población, proporcionando un ambiente térmico estable para su descendencia durante la gestación y asegurando una alta aptitud de las crías después del nacimiento (Fernández et al. 2017a). Aunque nuestro estudio es preliminar, la preferencia por temperaturas más altas observada sólo en machos juveniles y machos adultos con mayor porcentaje de eosinófilos o basófilos sugiere que podrían desarrollar fiebre conductual ante un desafío inmune, a diferencia de las hembras grávidas.

Además, existe una compensación fisiológica entre los beneficios de elevar el rendimiento del sistema inmune mediante el incremento de la T_c y el consumo de energía almacenada implicado en el proceso, que de otro modo podría ser utilizado para el crecimiento, la reproducción o el mantenimiento de la condición corporal del individuo (Smith y French 2017). La inmunidad, como todos los demás procesos fisiológicos, requiere un gasto adecuado de energía para mantener un funcionamiento óptimo (Demas 2004). Los individuos con un estado de salud y energético general empobrecido (bajo índice de condición corporal) son más susceptibles a desarrollar infecciones o ser afectados por parásitos (Merchant et al. 2008). Además, los lagartos con baja condición corporal podrían verse limitados en su capacidad de aumentar su T_c para contrarrestar los patógenos debido a los costos energéticos implicados también en el mantenimiento de una alta T_c (Romanovsky y Szekely 1998). En estos casos, se ha observado que los individuos desarrollaron hipotermia conductual como

estrategia de defensa a fin de conservar las reservas energéticas individuales. Este es el caso de las iguanas verdes juveniles (*Iguana iguana*) que presentan bajas reservas de energía (condición corporal deficiente) al ser experimentalmente infectadas con una endotoxina bacterial (lipopolysaccharide, LPS; Deen y Hutchison 2001). El mismo resultado se describió en los anolis verdes (*Anolis carolinensis*; Merchant et al. 2008). En este estudio con individuos de *L. sarmiento*, el índice de condición corporal de los machos juveniles y adultos fue similar, y no mostraron relación con la biología térmica, el rendimiento locomotor o el perfil leucocitario. Esto sugiere que el índice de condición corporal que presentaban las lagartijas, no limitó la capacidad de aumentar sus temperaturas corporales elevando su T_p a fin de desarrollar fiebre conductual para mejorar el rendimiento del sistema inmune si fuera necesario, aún cuando ello implicara un costo energético.

Los estados infecciosos o insalubres no solo conducen a un cambio en la proporción de las células presentes en la sangre (Schall et al. 1982; Zamora-Camacho et al. 2015), sino que también pueden afectar gran parte de la homeostasis fisiológica general del individuo (*sensu* Balon 1990), como lo demuestra la disminución de la eficiencia en variables ecofisiológicas como el rendimiento locomotor. Por ejemplo, los lagartos *Podarcis lilfordi* exhibieron mejores condiciones corporales y velocidades de carrera más rápidas cuando no estaban infectados o tenían poca carga parasitaria sanguínea (Garrido y Pérez-Mellado 2013). Además, los lagartos machos de la especie *Algirus Psammotromus* inoculados con LPS disminuyeron la velocidad de carrera, mientras que las hembras infectadas no modificaron su desempeño locomotor (Zamora-Camacho et al. 2015). En esta Tesis se encontró que el rendimiento locomotor (velocidades de carreras cortas y largas, y resistencia locomotora), tanto de machos adultos como de las hembras preñadas de *L. sarmiento* no se relacionó con el perfil leucocitario. Sin embargo, en los machos juveniles, la capacidad de correr durante largos períodos (resistencia) fue menor en los individuos que presentaron un alto porcentaje de heterófilos. La reducción de la resistencia locomotora de los juveniles podría afectar actividades vitales, como la posibilidad de evitar depredadores, señalando su vulnerabilidad en la población (Stacy et al. 2011) y podría estar relacionada tanto con infecciones como con episodios de estrés, que también se ha comprobado que pueden disminuir las proporciones de los linfocitos circulantes (Davis et al. 2008).

La gran variedad de patógenos que se pueden encontrar en la naturaleza ejercen fuertes presiones de selección en sus huéspedes, y afectan variables íntimamente relacionadas con la adaptación biológica y la aptitud física, como la termorregulación y el rendimiento fisiológico (Graham et al. 2011; Zamora-Camacho et al. 2015). Por lo tanto, los lagartos pueden exhibir una gran variabilidad en la magnitud y eficiencia de la respuesta inmune, encontrando un equilibrio entre la activación de la defensa inmune y los costos asociados con la termorregulación conductual debido al gasto energético que conlleva alcanzar una mayor T_c . El resultado de este equilibrio genera diferencias en la magnitud de la defensa inmune desplegada frente a un patógeno y está bajo una fuerte presión adaptativa (Schmid-Hempel 2011). Bajo un escenario de calentamiento global, los ambientes templados fríos de la Patagonia representan un posible refugio térmico para poblaciones de lagartijas que habitan ambientes más cálidos (Piantoni et al. 2016), pero esto representa una potencial amenaza para las poblaciones de lagartijas residentes debido a las introducciones de nuevas bacterias colonizadoras, parásitos y/o virus (Cahill et al. 2012). Ante éste escenario, los juveniles son probablemente los individuos más vulnerables en las poblaciones, ya que una disminución en la resistencia locomotora en consecuencia de desarrollar una respuesta frente a un posible desafío inmune, podría afectar su capacidad de dispersión y de evasión frente a los depredadores (Main y Bull 2000; Civantos et al. 2010).

Estudios realizados en especies de lagartijas de la familia Liolaemidae endémicas de ambientes fríos de la Patagonia Argentina, evaluaron la eficiencia en el comportamiento termorregulador en relación con la disponibilidad de microambientes térmicos (Medina et al. 2011; Duran et al. 2018) y de refugios (Duran et al. 2018), así como en relación a la condición reproductiva (Fernández et al. 2017a) y a los hábitos alimenticios (Ibargüengoytía et al. 2008). No obstante, no se habían realizado hasta el presente, estudios que evaluaran la eficiencia en el comportamiento termorregulador y en variables ecofisiológicas relevantes como aquellas relacionadas con el desempeño locomotor, en relación con el estado inmunológico de los individuos (Duran et al 2019). En la presente Tesis, el estudio realizado y presentado en este Capítulo proporciona información de base sobre el perfil leucocitario y el índice de condición corporal de una población de lagartijas silvestres de *L. sarmiento*, y representa un punto de partida en relación al aporte de evidencias acerca de cómo el

estado inmune influye en el comportamiento termorregulador y en el rendimiento locomotor en el género *Liolaemus*.

INTRODUCCIÓN DE LOS CAPÍTULOS 2, 3 Y 4

La resiliencia de las poblaciones animales a nuevas interacciones huésped-patógeno se rige por sus posibilidades fisiológicas para adaptarse a los nuevos desafíos (Graham et al. 2011). Entre las estrategias que los animales en general utilizan para sobrevivir a una infección, se describen el desarrollo de fiebre o de hipotermia (Romanovsky y Székely 1998; Almeida et al. 2006; Rakus et al. 2017). La respuesta termorreguladora, denominada fiebre o respuesta febril (*sensu* Romanovsky et al. 2005), se ha descrito en animales endotermos desde la época hipocrática (Atkins 1982). Por el contrario, la fiebre en los animales ectotermos se conoció hace cuatro décadas (Kluger 1979). Los lagartos fueron los primeros vertebrados ectotermos que mostraron capacidad para desarrollar fiebre conductual (Vaughn et al. 1974; Kluger et al. 1975; Bernheim y Kluger 1976). Posteriormente, la fiebre conductual también se confirmó en otros vertebrados (Covert y Reynolds 1977; Kluger 1977; Monagas y Gatten 1983; Burns et al. 1996). En los invertebrados el desarrollo de fiebre fue reportado por primera vez en cangrejos de río (Casterlin y Reynolds 1977a), y luego en algunas especies de insectos (Bronstein y Conner 1984; Stahlschmidt y Adamo 2013).

La fiebre conductual amplifica la respuesta inmune innata aumentando la supervivencia del huésped (Kluger et al. 1986; Elliot et al. 2005; Boltaña et al. 2013). Sin embargo, sus demandas fisiológicas compiten por los recursos energéticos con otras actividades como la reproducción (French y Moore 2008) y el crecimiento (Uller et al. 2006). Aunque la resistencia a las enfermedades acompañada de fiebre ocurrirá principalmente cuando no haya amenazas inmediatas de un déficit energético sustancial (Romanovsky y Székely 1998), puede que no siempre sea beneficioso para el individuo, ya que puede causar inmunopatologías en los tejidos del huésped (Graham et al. 2005). En cambio, la hipotermia e hipometabolismo conlleva una respuesta inmune más atenuada que incurre en un costo fisiológico más bajo que la fiebre, mientras se mantiene la aptitud general del hospedador (Smith y French 2017; Romanovsky y Székely 1998; Ganeshan et al. 2019). La hipotermia se ha descrito en varias especies (Romanovsky et al. 2005), y se han encontrado evidencias que apoyan que podría ser un mecanismo de defensa más ventajoso que la fiebre (Liu et al. 2012). Algunos estudios proponen que la hipotermia es una importante respuesta

adaptativa que protege órganos vitales durante episodios de trauma metabólico causado por infecciones y, al mismo tiempo, disminuye el desempeño fisiológico del patógeno por disminución de la T_c del hospedador (Romanovsky y Székely 1998; Deen y Hutchison 2001; Peterson et al. 2003; Almeida et al. 2006). En los lagartos, la hipotermia conductual se ha establecido como una respuesta generalizada a los desafíos inmunes en ciertas especies, como en los juveniles de iguanas verdes criadas en cautiverio (*Iguana iguana*; Deen y Hutchison 2001), en *Anolis carolinensis* (Merchant et al. 2008), *Sceloporus occidentalis bocourtii* (Megía-Palma et al. 2020), y en *Liolaemus sarmientoi*, una de las lagartijas más australes del mundo que habita en ambientes templados fríos de la Patagonia, Argentina (Duran et al. 2020; resultados obtenidos de esta tesis).

Por lo tanto, la fiebre y la hipotermia pueden definirse como dos respuestas termometabólicas a un proceso de inflamación sistémica, que impactan de manera diferente en los costos de la termorregulación conductual (Hallman et al. 1990; Ortega et al. 1991; Merchant et al. 2008) y varían también en sus beneficios (Zamora-Camacho et al. 2015). Mientras que desarrollar fiebre conductual asegura un ataque activo contra el agente infeccioso, la hipotermia regulada asegura la defensa de los sistemas vitales del huésped (Romanovsky et al. 2005; Bicego et al. 2007). Las diferentes estrategias animales para combatir enfermedades generalmente son también específicas del contexto (Viney et al. 2005; Smith y French 2017), dependiendo no solo del tipo de agente infeccioso (Merchant et al. 2007) o de la gravedad de la infección (Ramos et al. 1993; Ryan et al. 2018), sino también de la condición corporal del huésped (Muchlinski 1985; Deen y Hutchison 2001), de sus capacidades fisiológicas para responder a dicha infección (Zimmerman et al. 2010; Rakus et al. 2017), y de la etapa ontogenética en que se encuentre al momento de la infección (Fedson 2018).

En ectotermos, por otro lado, es relevante el rol de la selección de microhábitats adecuados para termorregular y alcanzar temperaturas corporales óptimas para atender a las demandas fisiológicas, ya que la T_c afecta directamente el crecimiento (Angilletta et al. 2004), la reproducción (Fernández et al. 2015, 2017a), la digestión (Plasman et al. 2019) y la activación efectiva del sistema inmunológico (Kluger 1986; Evans et al. 2015; Duran et al. 2020, 2021 en prensa), entre otras funciones. Los vertebrados ectotermos modifican la T_c principalmente mediante la termorregulación conductual cuando se exponen a variaciones espaciales y temporales de las fuentes

de calor ambiental (Belliure y Carrascal 1998). En ciertos casos, los reptiles tienden a mantener su T_c dentro de un rango cercano a su preferencia térmica (T_p) que representa la temperatura corporal a la cual el desempeño fisiológico de muchas reacciones enzimáticas es óptimo (Sinervo 1990; Hertz et al. 1993; Seebacher y Franklin 2005). Sin embargo, alcanzar la T_p en el ambiente natural depende principalmente de la disponibilidad de una variedad de microambientes térmicos adecuados para la termorregulación, y ésta se suele encontrarse reducida a mayores latitudes y elevaciones (Graae et al. 2012; Zamora-Camacho et al. 2015).

El mantenimiento de T_c elevadas conlleva un mayor tiempo de asoleamiento en detrimento de otras funciones sociales, como la defensa territorial o el cortejo (Vicenzi et al. 2019), y se traduce en un mayor gasto energético a medida que aumentan las tasas metabólicas con el incremento de la T_c (Angilletta 2001; Gillooly et al. 2001). Por lo tanto, los costos de elevar y mantener la T_c pueden superar los beneficios inmunes de la fiebre, lo que puede conducir a las lagartijas a optar por una estrategia de menor costo energético desarrollando una respuesta hipotérmica para combatir el patógeno (Paranjpe et al. 2014; Megía-Palma et al. 2020). Sin embargo, la respuesta hipotérmica también es dependiente de la disponibilidad de microhábitats térmicos apropiados, así como de la historia evolutiva de las especies (Zamora-Camacho et al. 2016).

Como mencioné anteriormente, la etapa ontogenética en la que se encuentre el huésped en el momento de una infección también desempeña un papel importante en la determinación de la estrategia seleccionada por los animales enfermos. El sistema inmunológico de los recién nacidos difiere en muchos aspectos del de los adultos, y aún son escasos los estudios acerca del impacto de las infecciones en las crías (Fedson 2018). Una investigación pionera de Glenny et al. (1925) en cobayos, seguido del trabajo de Barr et al. (1953), Howie et al. (1953) y Kerr y Robertson (1954) en corderos y terneros, demostraron la falta de respuesta inmune a la inyección intramuscular de antígenos en recién nacidos. En estas investigaciones pioneras se utilizó el lipopolisacárido (LPS), componente de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, que es una potente endotoxina capaz de activar el sistema inmunológico de los vertebrados. Ratones prepúberes desafiados inmunológicamente también con LPS exhibieron, junto con un mayor porcentaje de pérdida de peso, una mejor supervivencia en comparación con los ratones pospúberes (Joachim et al.

2017), evidenciando diferencias según la etapa ontogenética del huésped en el momento de la infección.

Por último, el estado de salud de las poblaciones de animales silvestres, como se ha mencionado, es otro factor importante que influirá directamente en el tipo de estrategia (fiebre o hipotermia) que desarrollará un individuo frente a un desafío inmune (Romanovsky y Szekely 1998; Deen y Hutchison 2001). Este aspecto individual, se puede evaluar rápidamente analizando ciertos parámetros como el índice de condición corporal (Peig et al. 2010), la carga de ectoparásitos (por ejemplo, ácaros en la piel; McCallum y Dobson 1995; Hamstra y Badyaev 2009) e incluso a partir de valores hematológicos como el perfil leucocitario (conteo de glóbulos blancos) y el recuento de eritrocitos, el cual es considerado un buen indicador del estado inmune. Los glóbulos blancos, como se mencionó anteriormente, son las células efectoras del sistema inmune y desempeñan numerosas funciones en la detección y respuesta a patógenos (Grasman 2002; Zimmerman et al. 2010). Por lo tanto, la cantidad y los tipos de leucocitos en circulación pueden proporcionar información de las defensas inmunes constitutivas y pueden predecir la magnitud de la respuesta a la exposición a patógenos (Nunn et al. 2003; Vinkler et al. 2010). En reptiles, los linfocitos y heterófilos constituyen la mayoría (casi el 80% combinado) de leucocitos en la circulación sanguínea (Davis et al. 2008). El número de eritrocitos en sangre periférica en los reptiles es inferior al de mamíferos y aves, y dentro del grupo de los reptiles es habitual que el recuento total de eritrocitos en los lagartos sea superior al de las serpientes y tortugas (Raskin 2000). Estos hallazgos indican una mayor capacidad en el transporte del oxígeno por parte de los eritrocitos de aves y mamíferos, comparado con los animales ectotermos como los reptiles (Martínez-Silvestre et al. 2011). Como es habitual en otros parámetros fisiológicos de los reptiles, el recuento total de eritrocitos varía con las condiciones del ambiente que habitan los individuos, así como con el estado nutricional, el sexo (los machos tienen mayor número que las hembras en ciertas especies) y la estación del año en que se realicen los análisis (Frye 1998).

Complementaria a estas mediciones y observaciones, una herramienta de evaluación estándar más elaborada es la prueba de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) de fitohemaglutinina (PHA) que provoca una respuesta inmune mediada por células. Esta prueba se usa ampliamente en aves (Smits et al. 1999), anfibios (Clulow et al. 2015) y lagartos (Svensson et al. 2001). La inyección

subcutánea de PHA desencadena una serie de reacciones fisiológicas que producen inflamación local en el área de inyección, relacionadas con una mayor actividad celular (Chandra y Newberne 1977; Roitt et al. 1996; Clulow et al. 2015). Esta reacción activa los componentes innatos y adaptativos del sistema inmune y la inflamación se utiliza como índice de inmunocompetencia estándar (Zimmerman et al. 2010).

En estos Capítulos presento el estudio del estado de salud de individuos de poblaciones silvestres de *Liolaemus kingii* y *Liolaemus sarmientoi*, a partir de la presencia de ectoparásitos (ácaros o garrapatas), del índice de condición corporal, de valores hematológicos (perfil leucocitario, relación heterófilo/linfocito y conteo de eritrocitos) y de la respuesta inmune individual mediante la prueba de la fitohemaglutinina (PHA). Además, presento el estudio de la disponibilidad de microambientes térmicos para la termorregulación conductual en el ambiente natural de cada especie (temperaturas operativas; T_e); de las temperaturas preferidas (T_p) de los ejemplares en el laboratorio y el índice de eficiencia para la termorregulación (E ; *sensu* Hertz et al. 1993), y por último, el estudio de las T_p después de la administración de un lipopolisacárido (LPS; grupo tratamiento) o solución fisiológica (PBS; grupo control), a fin de determinar si desarrollan una respuesta conductual de fiebre o de hipotermia al comparar las T_p obtenidas en los mismos individuos antes y después del tratamiento y entre individuos del grupo tratamiento y del grupo control.

Los resultados obtenidos se discuten en relación a la disponibilidad de temperaturas en el ambiente necesarias para desarrollar una respuesta inmune efectiva para combatir las infecciones por patógenos. Se predice que las lagartijas desarrollan diferentes estrategias termorreguladoras para responder a los posibles desafíos inmunes en diferentes etapas ontogenéticas, y que en respuesta a un desafío con LPS, los individuos adultos seleccionarían una T_p más alta o más baja que los individuos control inyectados con PBS, dependiendo de los ambientes que habitan y del índice de condición corporal que presentan. Se predice que las crías serían las más vulnerables, comprometiendo su índice de condición corporal (ICC) a expensas de mantener altas temperaturas corporales para mejorar la respuesta inmune innata. Por último, las hembras postparto infectadas seleccionarían temperaturas corporales más bajas que los individuos no infectados, siendo mayor la magnitud de este efecto debido a que presentan una disminución en su índice de condición corporal inicial por su condición de postparto.

Para una mayor comprensión de los experimentos y ensayos realizados en el laboratorio que describo en estos Capítulos, presento la Fig. 9, en la cual se representa una línea del tiempo ilustrativa y se detalla lo realizado en el laboratorio en forma cronológica. Se presentan las actividades desarrolladas tanto en el Capítulo 2 (determinación del estado de salud), como en el Capítulo 3 (estudios de termofisiología) y el Capítulo 4 (experimentación con una endotoxina bacteriana, LPS).

Línea de tiempo demostrativa de los experimentos de Laboratorio

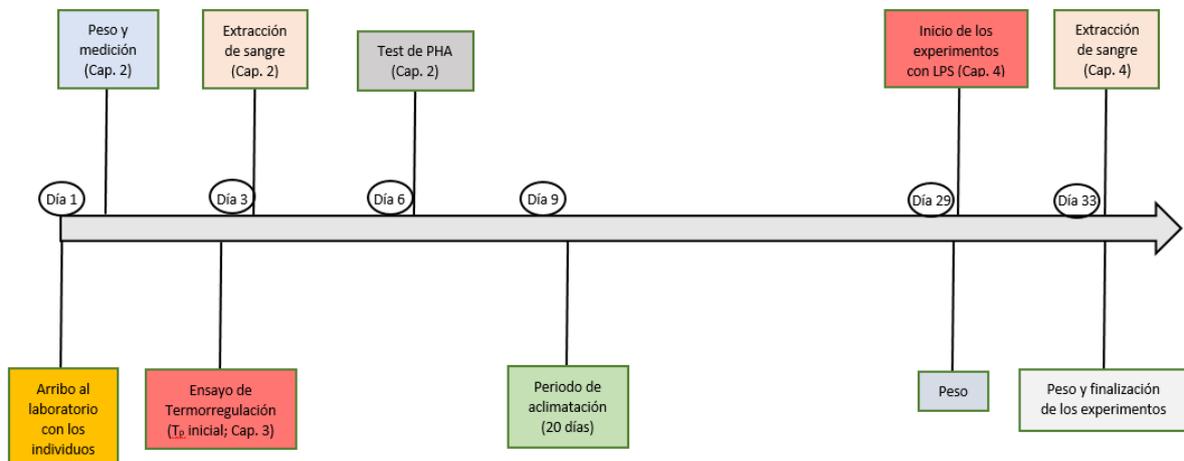


Figura 9. Línea de tiempo que muestra la planificación de las diferentes metodologías que se realizaron en el laboratorio.



CAPÍTULO 2: EVALUACIÓN DEL ESTADO DE SALUD DE POBLACIONES SILVESTRES DE *Liolaemus kingii* Y *Liolaemus sarmientoi*

2.1 Materiales y Métodos

2.1.1 Especímenes capturados

Para la especie *Liolaemus kingii* los muestreos los realicé los días 4 y 5 del mes de Febrero del 2017 y se capturaron 21 machos adultos y 7 hembras adultas preñadas ($N_{total} = 28$). Las capturas las realicé a mano o con lazo durante los horarios de actividad de los individuos, entre las 10:00 y las 19:00 hs. Inmediatamente después de la captura, medí la temperatura corporal (T_c ; TES 1303, termómetro digital de ± 0.03 °C) utilizando una termocupla (TES TP-K01, 1.62 mm de diámetro) colocada aproximadamente 1 cm dentro de la cloaca. La T_c se registró dentro de los 10 seg

posteriores a la captura, sujetando cuidadosamente el cuerpo del ejemplar para evitar la transferencia de calor.

Contrariamente a la descripción previa de la especie *L. kingii* como generalista (Scolaro 2005), algunos aspectos observados durante esta Tesis indican cierta especificidad en la elección de los microambientes que habita esta población. Durante los trabajos en el campo, encontré a los individuos siempre asociados a un mismo tipo de vegetación, particularmente a la especie de arbusto *Nassauvia glomerulosa*, utilizándolo como refugio en apariencia efectivo como protección frente a predadores, dada la abundancia de espinas en sus ramas y su abundancia en el sitio de estudio (Fig. 10).

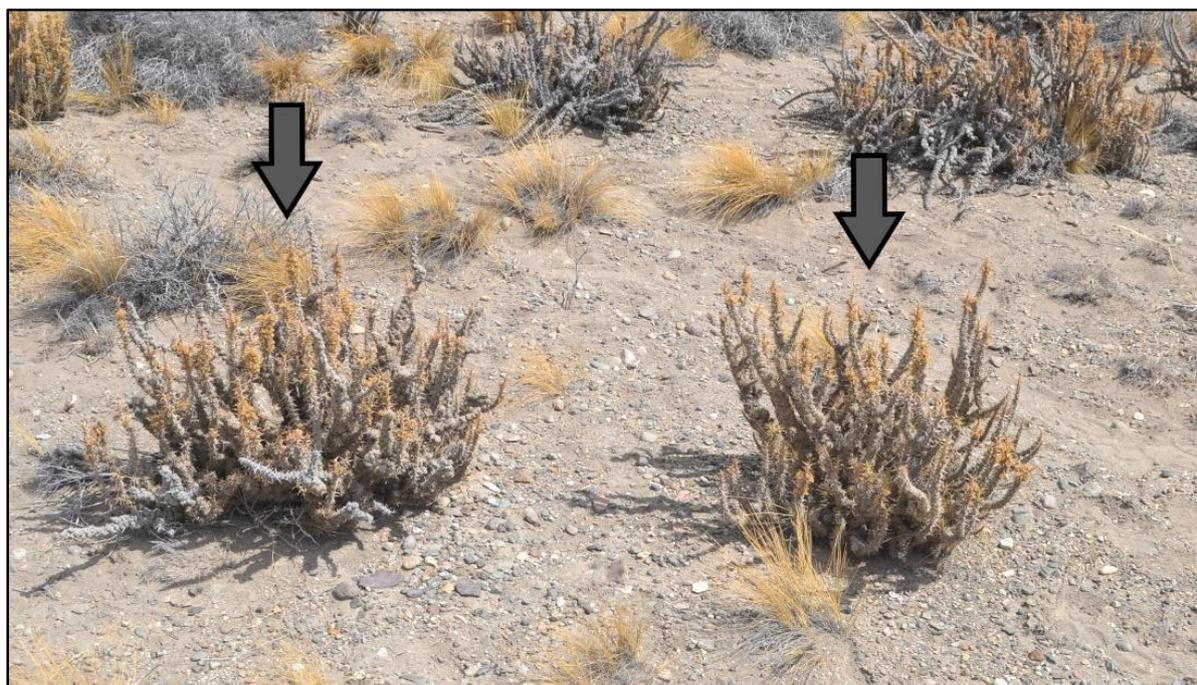


Figura 10. Foto del ambiente en el cual se capturaron los individuos de la especie *L. kingii*. Las flechas indican los arbustos de la especie *Nassauvia glomerulosa*. Los ejemplares de *L. kingii* se encontraron siempre asociados a estas plantas.

Para la especie *Liolaemus sarmiento* los muestreos los realicé entre los días 10 y 14 del mes de Enero del 2018. Se capturaron 32 individuos adultos (20 machos adultos, 4 hembras adultas no preñadas y 8 hembras adultas preñadas) a mano o con lazo. Inmediatamente después de la captura, medí la T_c (TES 1303, termómetro digital

de ± 0.03 °C) utilizando una termocupla (TES TP-K01, 1.62 mm de diámetro) colocada aproximadamente 1 cm dentro de la cloaca (misma metodología que la utilizada para los individuos de *L. kingii*). En ambos sitios de muestreos luego de la captura de cada individuo, registré variables microambientales como la temperatura del sustrato (T_s) y la temperatura del aire 1 cm por encima del suelo (T_a). Tanto las T_c obtenidas en los individuos en el momento de la captura, como las temperaturas microambientales T_s y T_a son utilizadas en los estudios y análisis del Capítulo 3.

Luego de los muestreos, los ejemplares de ambas especies fueron llevados al laboratorio. Los individuos de la especie *L. kingii*, después de 2-3 días de su captura, se ubicaron en una de las instalaciones del Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medioambiente (INIBIOMA), un invernadero de 180 m² con luz natural y control automático de la temperatura ambiente y ventilación, dentro del cual contamos con un espacio de 16 m² para el desarrollo del estudio. Mientras que los individuos de la especie *L. sarmientoi*, después de 7-8 días de su captura, se ubicaron en un aula ambientada de 16 m² dentro la Universidad Nacional del Comahue (aula de Física) con acceso restringido solo a mí y mis Directoras de la Tesis. En ambos espacios, las lagartijas se alojaron individualmente bajo las mismas condiciones, en terrarios abiertos (100 × 20 × 17 cm) fabricados con paneles de fibra de madera (MDF). En cada terrario se proporcionó una fuente de calor mediante una bombilla incandescente de 75 W colocada sobre un extremo, activada diariamente de 10:00 a 17:00 hs. Las lagartijas se mantuvieron en estos terrarios durante todos los experimentos, hasta el final del estudio. A cada ejemplar le proporcioné un refugio, agua ad libitum, y los alimenté una vez al día con larvas de gusano de la harina (*Tenebrio molitor*) recubiertas con vitaminas y calcio, durante todo el tiempo que los individuos estuvieron en el laboratorio. Luego de finalizar los estudios y experimentos propuestos en los Capítulos 2 y 3, mantuve a las lagartijas en un periodo de aclimatación durante 20 días, para luego comenzar los experimentos de desafío inmune con el lipopolisacárido (LPS) descriptos en el Capítulo 4.

Durante este período de aclimatación, se produjeron los partos en todas las hembras preñadas de ambas especies. En la especie *L. kingii* nacieron un total de 20 crías (seis hembras parieron tres crías cada una y una hembra parió a dos crías). La MC y la LHC de las crías se midieron inmediatamente después del nacimiento. Las crías se mantuvieron en terrarios individuales de plástico (15 × 20 × 20 cm) provistos con una lámpara de 75 W cada uno, también con acceso a un refugio y agua ad libitum,

y alimentadas diariamente con larvas de gusano de la harina (*Tenebrio molitor*). Una sub-muestra de estas crías realizaron los experimentos con el LPS descritos en el Capítulo 4. En la especie *L. sarmiento* también nacieron un total de 20 crías en las cuales se midieron variables morfológicas. Las hembras postparto fueron las incluidas en los experimentos con LPS descritos en el Capítulo 4.

Las capturas para los individuos de la especie *L. kingii* fueron autorizadas por el Servicio de Vida Silvestre de la Provincia de Chubut, Argentina (Permiso # 03588/16 MP; Disposición # 48/08) y para la especie *L. sarmiento* fueron autorizadas por la Delegación de Vida Silvestre de la Provincia de Santa Cruz, Argentina (Permiso # 0460/16 MP; Disposición # 11/2016). Durante el desarrollo de los trabajos experimentales, se siguieron las pautas para el uso de anfibios y reptiles vivos en investigaciones de campo y de laboratorio de la Sociedad Estadounidense de Ictiólogos y Herpetólogos (ASIH), la Liga de Herpetólogos (HL) y la Sociedad para el Estudio de Anfibios y Reptiles (SSAR), así como las regulaciones detalladas en la Ley Nacional Argentina # 14346. Todos los individuos capturados mencionados en esta sección, fueron empleados para los estudios tanto de este Capítulo, como los estudios realizados en los Capítulos 3 y 4.

Los individuos de ambas especies, al finalizar todos los estudios de esta Tesis, fueron sacrificados con el fin de obtener diferentes muestras de tejidos y mayores volúmenes de sangre para los frotis analizados en el Capítulo 4, y para estudios de transcriptómica y de biología reproductiva (estudios gonadosomáticos, histológicos y de hormonas esteroideas⁽¹⁾), que están siendo desarrollados por fuera del marco de esta Tesis. La sangre se extrajo por punción de la vena caudal ventral (Amey y Whittier 2000; Beaupre et al. 2004; Troiano 2013; Eymann et al. 2010) con jeringa de tuberculina (o de insulina; Jeringa 1 cc., c/a 29Gx1/2", 13x0,33 mm, Terumo) previa desinfección del lugar de extracción con gasa y alcohol 70%.

El método de eutanasia que se empleó para los individuos de la especie *L. kingii* fue la decapitación, metodología que permite una rápida y correcta extracción de los órganos dentro de un periodo no mayor a 3-5 minutos para los estudios de transcriptómica. De los ejemplares de *L. kingii*, se obtuvieron muestras de tejidos de hígado, bazo y cerebro (de ambos grupos, tratamiento (LPS) y control (PBS), de los

¹ Parte del volumen de las muestras de sangre se destinó para la realización de estudios hormonales llevados a cabo por la Dra. Jorgelina Boretto.

trabajos experimentales descritos en el Capítulo 4) para evaluar el perfil transcriptómico⁽²⁾. Luego de la extracción de las muestras de tejidos, los ejemplares fueron fijados en solución de Bouin durante 24 hs, y luego conservados en alcohol⁽³⁾.

Por otro lado, el método de eutanasia que se empleó en los individuos de la especie *L. sarmiento* fue la aplicación intraperitoneal de tiopental sódico (Sodium pentobarbital, 60-100 mg/kg de peso corporal; Underwood y Anthony “2020 edition”. AVMA guidelines for the euthanasia of animals). Estos individuos sacrificados también fueron fijados en solución de Bouin durante 24 hs, y luego conservados en alcohol. Ambos métodos de eutanasia utilizados en esta Tesis se encuentran dentro de los métodos descritos en las guías para la eutanasia de animales de pequeño tamaño, como la “Guía para cuidado y uso de animales de experimentación” emitida por INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Versión 1) y las guías de la AVMA (Leary et al. “2016 edition”. AVMA guidelines for the humane slaughter of animals; Underwood y Anthony “2020 edition”. AVMA guidelines for the euthanasia of animals).

Todos los ejemplares de ambas especies son conservados en la Colección de Herpetología del Laboratorio Ecofisiología e Historia de Vida de Reptiles, del Departamento de Zoología, Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue-INIBIOMA-CONICET.

2.1.2 Estimación del estado de salud

Antes de ubicar a cada lagartija en su terrario como mencioné anteriormente, todos los individuos de ambas especies, fueron examinados para determinar el sexo, a partir de la presencia de poros precloacales (presentes sólo en machos, tanto en la especie *L. kingii* como en *L. sarmiento*). El estado reproductivo femenino lo determinó mediante palpación, clasificando a las hembras según su condición de preñadas y no preñadas. En *L. sarmiento* se conoce que la talla mínima a la madurez sexual es de 49.1 mm LHC en machos (Fernández et al. 2017b) y 57.22 mm LHC en hembras (Fernández et al. 2015). Para la especie *L. kingii*, estos datos aun no son conocidos.

² Las muestras obtenidas de esta especie fueron procesadas para la extracción de ARN y enviadas al Instituto Nacional de Agrobiotecnología de Rosario (INDEAR, Rosario, Santa Fé) para su secuenciación de próxima generación en el marco de un estudio RNA-Seq. Las secuencias obtenidas están siendo analizadas para la obtención del perfil transcriptómico con la colaboración del Dr. Leandro Becker, quien posee experiencia en el campo de la inmunología de vertebrados.

³ Las gónadas serán procesadas próximamente y estudiadas mediante técnicas de histología convencional a fin de describir la biología reproductiva, desconocida en esta especie.

Luego observé detalladamente cada individuo para detectar la presencia de lesiones o ectoparásitos en la piel como ácaros o garrapatas, y para determinar el estado de la cola (intacta, cortada, regenerada). También registré para cada lagartija la masa corporal (MC; balanza de resorte de 100 g \pm 0.5 g; Pesola AG, Baar, Suiza) y la longitud hocico-cloaca (LHC; calibre digital \pm 0.02 mm, CA-01, Lee Tools, Guangzhou, Guangdong, China). En la especie *L. sarmientoi*, a fin de detectar una posible disminución de la MC durante los 7-8 días transcurridos entre la captura y la llegada al laboratorio, realicé un análisis de Regresión Lineal entre la masa corporal y la LHC de los individuos ($N = 32$). Los resultados obtenidos se corroboraron con una muestra más grande de individuos de *L. sarmientoi* medidos en el momento de la captura ($N = 84$, muestra previa a esta tesis para los estudios Iburgüengoytía et al. 2010; Fernández et al. 2011) con la cual realicé una ANCOVA para comparar la MC y la LHC de machos adultos, hembras no preñadas y hembras preñadas entre los dos muestreos.

Con los datos obtenidos de la MC y la LHC de cada individuo estimé el índice de condición corporal (ICC, *sensu* Peig y Green 2009, 2010) a partir de la misma metodología utilizada y descrita en el Capítulo 1, utilizando la fórmula:

$$ICC = M_i \times [LHC_0/LHC_i]^{bSMA}$$

Este índice ha sido seleccionado para los análisis de esta Tesis, dada la estabilidad demostrada por el mismo ante distintas escalas de masa corporal de los individuos (Peig y Green 2009), especialmente considerando que los individuos adultos de ambas especies analizadas son relativamente pequeños y no superan los 13 grs, y las crías recién nacidas no superaron los 2 grs. Este índice se obtuvo en todos los individuos (con excepción de las hembras preñadas por su condición).

En la especie *L. kingii* el ICC lo calculé en tres momentos: en el grupo de machos adultos se calculó el primer día en el laboratorio ($ICC_{1 \text{ machos}}$), al finalizar el período de aclimatación que corresponde también al primer día experimental con el lipopolisacárido ($ICC_{2 \text{ machos}}$), y el día de finalización del experimento con el lipopolisacárido ($ICC_{3 \text{ machos}}$). El ICC en las crías se calculó al nacer ($ICC_{1 \text{ crías}}$), el primer día experimental con el lipopolisacárido ($ICC_{2 \text{ crías}}$) y el día de finalización del experimento con el lipopolisacárido ($ICC_{3 \text{ crías}}$).

En la especie *L. sarmientoi* el ICC de machos y hembras no preñadas también lo calculé en tres momentos: el primer día en el laboratorio (ICC_{1 adultos}), al finalizar el período de aclimatación que corresponde también al primer día experimental con el lipopolisacárido (ICC_{2 adultos}), y el último día al finalizar el experimento con el lipopolisacárido (ICC_{3 adultos}). Por último, el ICC de las hembras postparto, lo calculé en dos momentos: el primer día del experimento con el lipopolisacárido antes de la inyección (ICC_{inc postparto}) y al finalizar los experimentos con el lipopolisacárido (ICC_{fin postparto}).

Los ICC de cada individuo se utilizaron en los análisis de este Capítulo 2, así como en el Capítulo 4, en el cual se utilizó el ICC de cada lagartija al inicio y al final del experimento con LPS o PBS a fin de responder a los objetivos planteados.

2.1.3 Extracción de sangre

Cada muestra de sangre se extrajo por punción de la vena caudal ventral aproximadamente 15-20 mm por debajo de la cloaca (Eymann et al. 2010; Troiano 2013) con una jeringa heparinizada de tuberculina o de insulina por individuo (Jeringa 1 cc., c/a 29Gx1/2", 13x0,33 mm, Terumo), previa desinfección del lugar de extracción con gasa y alcohol 70%. Una fracción del volumen extraído la usé para realizar el conteo de eritrocitos utilizando una cámara de Neubauer modificada en microscopio. La otra fracción del volumen de sangre extraída la utilicé para realizar un extendido (frotis) para el conteo de leucocitos (perfil leucocitario) en microscopio. La misma metodología se utilizó para la extracción y procesamiento de todas las muestras de sangre en ambas especies.

Las muestras de sangre para realizar los conteos de las células sanguíneas de cada individuo las obtuve en dos momentos diferentes. La primera extracción se realizó en todos los individuos al finalizar el primer experimento de termorregulación (temperatura corporal preferida; $T_{p-inicial}$, descrita posteriormente en el Capítulo 3), para evitar interferir con el desempeño de los ejemplares. Esta primera muestra la utilicé como uno de los parámetros de estado de salud inicial de cada individuo. La segunda extracción de sangre, la realicé sólo en los individuos que fueron incluidos en el experimento con el lipopolisacárido, tanto los del grupo tratamiento LPS como los del grupo control PBS, y la llevé a cabo al finalizar el experimento que se describe en el Capítulo 4. Estas muestras de sangre se utilizaron para comparar los perfiles

leucocitarios, relación H/L y conteo de eritrocitos entre los individuos tratamiento y control, así como también para comparar estas variables antes y después del desafío inmune experimental en cada individuo de cada grupo.

El conteo de los eritrocitos lo realicé en una cámara de Neubauer modificada de $0,0025 \text{ mm}^2$, que consta de una placa de cristal con una depresión central de $0,1 \text{ mm}$ de profundidad limitada por dos surcos perpendiculares al eje mayor de la misma y dividida en dos plataformas por un tercer surco central. Sobre la superficie de cada plataforma se encuentra un área rayada denominada retículo (Fig. 11). Previamente a colocar la solución con la muestra de sangre, se coloca un cubreobjeto por encima, como se muestra en la Fig. 11. Para el conteo, en primera instancia, preparé una solución de colorante de azul de toluidina (preparación $0,5 \text{ gr} / 100 \text{ ml}$ de solución fisiológica). Luego, en un tubo Eppendorf mezcle 4 ml de la solución de azul de toluidina ya preparada con una muestra de $20 \mu\text{l}$ de sangre por individuo ya extraída (tomada con una micropipeta BioPette^{Plus} BPP200 / $20\text{-}200 \mu\text{l}$) para que se tiñera (dilución $1/200$). Después de realizar esto, coloqué un volumen de la solución teñida en la cámara de Neubauer hasta que se llenara, y realicé el conteo de los eritrocitos en las diferentes cuadrículas de la cámara en un microscopio Olympus (Modelo BX40) con un aumento de $400\times$. Las cuadrículas utilizadas para el conteo fueron las 4 esquinas y la central, siendo un total de 5 cuadrículas ($\text{GR}/\mu\text{l} = \text{eritrocitos contados} * 10.000$; Fig. 11). Los valores de referencia para los recuentos eritrocitarios en reptiles oscilan desde 300.000 hasta $2.500.000$ eritrocitos/ μl , dependiendo de la especie y del lugar de punción para la obtención de la sangre (Saint Girons 1970; Raskin 2000; Jacobson 2007; Martínez-Silvestre et al. 2011).

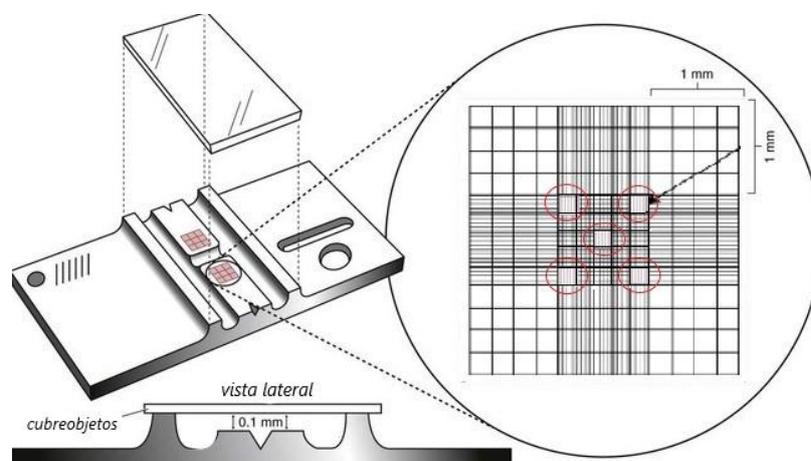


Figura 11. Representación de la Cámara de Neubauer modificada en la cual se muestran los cuadrantes utilizados para realizar el conteo de los eritrocitos.

El frotis lo llevé a cabo colocando una gota de sangre en un extremo de un portaobjetos de vidrio y extendiendo desde allí la gota con la ayuda de otro portaobjetos (Maceda-Vega et al. 2015). Luego, fijé el extendido con calor para su posterior tinción y análisis. La tinción elegida fue May-Grünwald Giemsa (Biopack®), una tinción muy utilizada para identificación y conteo de leucocitos en muestras de sangre, descrita en el Capítulo 1. El perfil leucocitario expresado como un porcentaje de cada tipo de leucocito, se determinó siguiendo el mismo método de “guarda griega” o zig-zag de Shilling descrito en los materiales y métodos del Capítulo 1, utilizando un microscopio óptico (Olympus® BX51, America Inc., Melville, NY, EUA; 1000X con aceite de inmersión) equipado con una cámara (TUCSEN® DigiRetina16; sensor CMOS de 16mp). Los leucocitos se clasificaron como linfocitos, heterófilos, basófilos, eosinófilos, monocitos y azurófilos, siguiendo la caracterización disponible para reptiles (Stacy et al. 2011) descrita en el Capítulo 1. Luego calculé también la relación heterófilo/linfocito (H/L).

2.1.4 Evaluación de la respuesta inflamatoria local: ensayo de inflamación de la piel con fitohemaglutinina (PHA)

La prueba de fitohemaglutinina (PHA) la realicé dos días después de la primera extracción de sangre (descrita anteriormente) para evitar el estrés y permitir una recuperación adecuada de los individuos. Esta prueba la llevé a cabo en los machos adultos de *L. kingii* y en los machos y hembras no preñadas adultas de *L. sarmientoi*, y la realicé siempre con la misma metodología. Las hembras preñadas de ambas especies fueron excluidas de esta prueba.

En este ensayo medí los espesores del pie (espesor en la zona de los metatarsos) de los miembros posteriores de cada individuo antes de la inyección con PHA (pie posterior derecho; tratamiento) o con PBS (pie posterior izquierdo; control) con un medidor de espesor digital (presión constante Mitutoyo 700-118-20 CAL, +/- 0.01 mm; Fig. 12). Siguiendo la metodología de Huyghe et al. (2010), inmediatamente después de obtener estas medidas iniciales, inyecté por vía subcutánea 20 µl de solución de PHA en la suela del pie del miembro posterior derecho (4 mg de PHA 0.1

mg L-8754 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU. por ml de PBS) y en la suela del pie posterior izquierdo inyecté el mismo volumen, pero de solución salina tamponada con fosfato (PBS). El espesor de los pies posteriores derecho e izquierdo lo medí a las 2 hs, 20 o 24 hs (dependiendo de la especie) y 48 hs después de la inyección. La inflamación en respuesta al PHA (tratamiento) o PBS (control) se estimó a partir del aumento proporcional en el espesor de los pies posteriores a la altura de los metatarsos antes y después de la inyección. La prueba de PHA no causa efectos negativos conocidos en la salud de los individuos. En las especies estudiadas en esta Tesis, la reacción estimulada por la PHA desapareció dentro de las 48 hs posteriores a la inyección, como se ha observado anteriormente en otros estudios con lagartijas de tamaños similares a las especies en estudio (Cabido 2009; Iglesias-Carrasco et al. 2016).



Figura 12. Medición del espesor del pie con el espécímetro en un individuo de la especie *L. kingii*.

2.1.5 Análisis estadístico

Para comparar si hubo diferencias en el índice de condición corporal (ICC) en los individuos a lo largo del tiempo utilicé la prueba-*t* de Student apareada, y para comparar el ICC entre diferentes individuos utilicé la prueba-*t* de Student simple para muestras independientes.

Realicé Regresiones Lineales Simples para analizar la relación entre la respuesta a la fitohemaglutinina (PHA) en diferentes momentos y el ICC. Para determinar la respuesta a la PHA utilicé un modelo lineal mixto generalizado (GLMM) con los datos obtenidos en ambas especies. Evalué los efectos del tratamiento sobre el espesor del pie derecho e izquierdo de los miembros posteriores medidos a lo largo del tiempo utilizando el paquete *lme4* (Bates et al. 2015) y para las pruebas *post hoc*, el paquete *emmeans* (Russell 2019) en R software (R Core Team 2019). En este ensayo de inflamación de la piel con PHA, el grosor del pie fue la variable respuesta, el tratamiento (PHA o PBS), el tiempo al cual se tomaron las mediciones y su interacción fueron los efectos fijos, y la identidad individual fue la variable aleatoria. La significancia estadística de la identidad individual de los análisis se evaluó mediante una prueba de razón de verosimilitud basada en la probabilidad máxima restringida (análisis PHA: $\chi^2_{[1]} = 46.99$, $P < 0.001$ para la especie *L. kingii*; análisis PHA: $\chi^2_{[1]} = 82.95$, $P < 0.001$ para la especie *L. sarmiento*) utilizando la función *rand* del paquete *lmerTest* (Kuznetsova et al. 2017). En los análisis, los valores *P* para efectos fijos se obtuvieron utilizando sumas de cuadrados de Tipo III basadas en la aproximación de Satterthwaite para los grados de libertad del denominador (Kuznetsova et al. 2017). En ambas especies, comencé los análisis con un modelo global que incluía todas las variables y sus interacciones. Para evitar el sobreajuste, debido al tamaño de muestra reducido, las comparaciones de modelos se basaron en el Criterio de Información de Akaike (AICc) corregido y se realizaron con la función *dredge* del paquete *MuMIn* en R (Legendre y Legendre 1998; Burnham y Anderson 2002). De acuerdo con esta función, los modelos se clasifican de acuerdo con sus valores de AICc, y el modelo con el AICc más bajo se consideró el mejor, mientras que aquellos con una diferencia de valor de AICc menor que 2 con respecto del valor de AICc del mejor modelo, se consideran modelos con soporte sustancial (Burnham y Anderson 2002).

2.2 Resultados

2.2.1 Evaluación del estado de salud de los individuos de la especie *L. kingii*

-Indicadores externos de salud e Índice de Condición Corporal

No observé lesiones ni ectoparásitos como ácaros en la piel o garrapatas en las lagartijas capturadas (21 machos y 7 hembras preñadas) y solo 3 machos tenían la cola regenerada. En la Tabla 5 se presentan los datos de los valores medios de las variables morfológicas medidas (MC y LHC) en machos adultos, hembras preñadas y crías, así como los valores medios del índice de condición corporal (ICC) en los machos adultos y las crías nacidas en el laboratorio utilizados en los trabajos experimentales con LPS.

Tabla 5. Valores de la media \pm error estándar (SE), rango y tamaño de muestra (N) de la masa corporal (MC, gr), la longitud hocico-cloaca (LHC, mm) y el índice de condición corporal (ICC) de los individuos de *L. kingii*, calculados al llegar al laboratorio y después del periodo de aclimatación.

<i>L. kingii</i>	N	MC \pm SE (rango)	LHC \pm SE (rango)	N	ICC ₁ \pm SE (rango)	ICC ₂ \pm SE (rango)
Machos adultos	21	7.77 \pm 0.39 (4.90 - 11.60)	67.37 \pm 1.25 (58.24 - 81.38)	18	7.77 \pm 0.23 (6.28 - 9.91)	7.69 \pm 0.17 (6.20 - 9.24)
Hembras preñadas	7	8.32 \pm 0.35 (7.20 - 9.70)	66.45 \pm 1.41 (62.26 - 72.47)			
Crías	20	1.01 \pm 0.02 (0.81 - 1.25)	31.94 \pm 0.23 (30.10 - 34.50)	14	1.02 \pm 0.02 (0.82 - 1.18)	0.97 \pm 0.02 (0.83 - 1.16)

Los machos no mostraron cambios significativos en el ICC durante el tiempo que transcurrió el período de aclimatación (ICC_{1 machos} vs ICC_{2 machos}; prueba- t apareada, $t_{17} = 0.495$, $P = 0.627$, $N = 18$). Las crías tampoco mostraron cambios en su ICC cuando comparé entre el estado luego del nacimiento y antes de comenzar el experimento con el LPS, descrito en el Capítulo 4 (ICC_{1 crías} vs ICC_{2 crías}; prueba- t apareada, $t_{13} = 1.916$, $P = 0.078$, $N = 14$).

- Conteo celular de las muestras sanguíneas

En *L. kingii* determiné el perfil leucocitario y el recuento de eritrocitos de un primer grupo conformado por los 21 machos adultos y un segundo grupo de las 7 hembras preñadas. En el primer grupo el estudio del perfil leucocitario indicó que las células encontradas con mayor frecuencia fueron los linfocitos (alrededor de un 60%), seguidas por los heterófilos (alrededor de 30%; Tabla 6). La abundancia de basófilos y eosinófilos fue mucho más baja, y con respecto a los monocitos y azurófilos, se encontraron únicamente en dos individuos, siendo la abundancia aún más baja (Tabla 6). La relación H/L fue de 0.48. El conteo de eritrocitos expresado en valores medios de los 21 machos adultos estudiados fue de 1.140.000 eritrocitos/ μ l. En el segundo grupo compuesto por las 7 hembras preñadas, si bien se pudo obtener una muestra de sangre de cada individuo, sólo se pudo realizar el conteo de eritrocitos en el microscopio. Debido a problemas metodológicos que desconocemos, los frotis realizados no presentaron una buena imagen en microscopio, lo cual imposibilitó el conteo celular para determinar el perfil leucocitario. El valor medio del conteo de eritrocitos para las 7 hembras preñadas fue de 820.000 eritrocitos/ μ l.

Tabla 6. Valores porcentuales de cada tipo de leucocito (linfocitos, heterófilos, basófilos, eosinófilos, monocitos y azurófilos) y la relación heterófilo/linfocito (H/L) del perfil leucocitario como parámetro basal inicial de la especie *L. kingii*. Se indican la media (\pm error estándar, SE), valores mínimos y máximos, y tamaño de muestra (*N*).

Perfil leucocitario	<i>L. kingii</i>		
	Machos adultos		
	Media (\pm SE)	min-max	<i>N</i>
Linfocitos (%)	62.52 (3.73)	32-92	21
Heterófilos (%)	30.04 (3.09)	7-60	21
Basófilos (%)	5.62 (0.91)	1-18	21
Eosinófilos (%)	0.75 (0.14)	0-2	21
Monocitos (%)	0.29 (0.21)	0-4	21
Azurófilos (%)	0.10 (0.07)	0-1	21
H/L	0.48		21

- Respuesta a la inyección con fitohemaglutinina (PHA)

En los machos adultos de *L. kingii* el espesor del pie posterior derecho previo a la inyección con PHA no mostró una relación significativa con el índice de condición corporal ($ICC_{1\text{ machos}}$; Regresión Lineal Simple: $F_{1,20} = 0.001$, $P = 0.989$). Tampoco se encontró una relación entre el espesor del pie derecho y el ICC luego de 2 hs (Regresión Lineal Simple: $F_{1,20} = 0.071$, $P = 0.794$), 20 hs (Regresión Lineal Simple: $F_{1,20} = 0.254$, $P = 0.620$) o 48 hs después de la inyección con PHA (Regresión Lineal simple: $F_{1,20} = 1.315$, $P = 0.266$).

En estos individuos la comparación del espesor del pie posterior derecho versus el pie posterior izquierdo a lo largo del tiempo mostró un efecto significativo del factor tratamiento (PHA frente a PBS), el factor tiempo (antes de la inyección frente a 2 hs, 20 hs y 48 hs después de la inyección) y la interacción del tratamiento x tiempo (Tabla 7). Los machos no presentaron diferencias significativas en la comparación entre el espesor del pie derecho (PHA) e izquierdo (PBS) antes de las inyecciones (test de Tukey, $t_{\text{PHA vs PBS}} = -1.225$, $P = 0.923$, $N = 21$), 2 hs después ($t_{\text{PHA vs PBS}} = 0.895$, $P = 0.986$) o 48 hs después de las inyecciones ($t_{\text{PHA vs PBS}} = 2.835$, $P = 0.094$; Fig. 13). Sin embargo, en el pie derecho, la PHA provocó un engrosamiento detectable de 0.14 mm en promedio a las 20 hs significativamente mayor que en el pie izquierdo inyectado con PBS (test de Tukey, $t_{\text{PHA vs PBS}} = 3.936$, $P < 0.005$; Fig. 13).

Al comparar el espesor del pie posterior derecho tratado con PHA a lo largo del tiempo se encontró que se volvieron 0.10 mm en promedio más inflamado a las 2 hs y 0.13 mm en promedio más inflamado a las 20 hs después de la inyección (test de Tukey, $t_{\text{pre vs 2h}} = 3.110$, $P < 0.045$, $t_{\text{pre vs 20h}} = 3.702$, $P < 0.005$, $N = 21$). A las 48 hs después de la inyección el espesor del pie derecho tratado con PHA no mostró diferencias respecto del espesor previo a la inyección ($t_{\text{pre vs 48h}} = 0.578$, $P = 0.999$, $N = 21$; Fig. 13). En la Tabla 8 se muestran los datos resultantes de cada tratamiento a lo largo del tiempo.

Tabla 7. Significancia de los efectos fijos del modelo lineal mixto generalizado seleccionado del ensayo de inflamación de la piel con fitohemaglutinina a lo largo del tiempo (preinyección y 2 hs, 20 hs y 48 hs después de la inyección) entre tratamientos (PHA y PBS) para machos adultos de *Liolaemus kingii*.

	SS	MS	Num	DenDF	F value	Pr(>F)
Horas	0.3435	0.1144	3	140	9.108	≤ 0.001
Tratamiento	0.1303	0.1303	1	140	10.371	≤ 0.005
Tratamiento x horas	0.1943	0.0647	3	140	5.153	≤ 0.005

Nota: Se indican, SS = suma de cuadrados, MS = media de cuadrados, DenDF = grados de libertad del denominador.

Tabla 8. Datos obtenidos del modelo lineal mixto generalizado en la especie *L. kingii* en **a-** valores medios obtenidos del pie posterior derecho tratado con PHA y del pie posterior izquierdo tratado con PBS a lo largo del tiempo (hs), y **b-** sus comparaciones a lo largo del tiempo y entre tratamientos.

a-

tiempo	tratamiento	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL
ant	PHA	1.31	0.0365	51.3	1.23	1.38
2 hs	PHA	1.41	0.0365	51.3	1.34	1.49
20 hs	PHA	1.44	0.0365	51.3	1.36	1.51
48 hs	PHA	1.33	0.0365	51.3	1.25	1.40
ant	PBS	1.35	0.0365	51.3	1.28	1.42
2 hs	PBS	1.38	0.0365	51.3	1.31	1.46
20 hs	PBS	1.30	0.0365	51.3	1.23	1.37
48 hs	PBS	1.23	0.0365	51.3	1.16	1.30

b-

	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
ant, PHA – 2 hs, PHA	0.1076	0.0346	140	3.110	0.0456*
ant, PHA – 20 hs, PHA	0.1281	0.0346	140	3.702	0.0072*
ant, PHA – 48 hs, PHA	0.0200	0.0346	140	0.578	0.9991
ant, PBS – 2 hs, PBS	0.0343	0.0346	140	0.991	0.9751
ant, PBS – 20 hs, PBS	-0.0505	0.0346	140	-1.459	0.8276
ant, PBS – 48 hs, PBS	-0.1205	0.0346	140	-3.482	0.0149
ant, PHA - ant, PBS	-0.0424	0.0346	140	-1.225	0.9232
2 hs, PHA – 2 hs, PBS	0.0310	0.0346	140	0.895	0.9861
20 hs, PHA – 20 hs, PBS	0.1362	0.0346	140	3.936	0.0032*
48 hs, PHA – 48 hs, PBS	0.0981	0.0346	140	2.835	0.0947

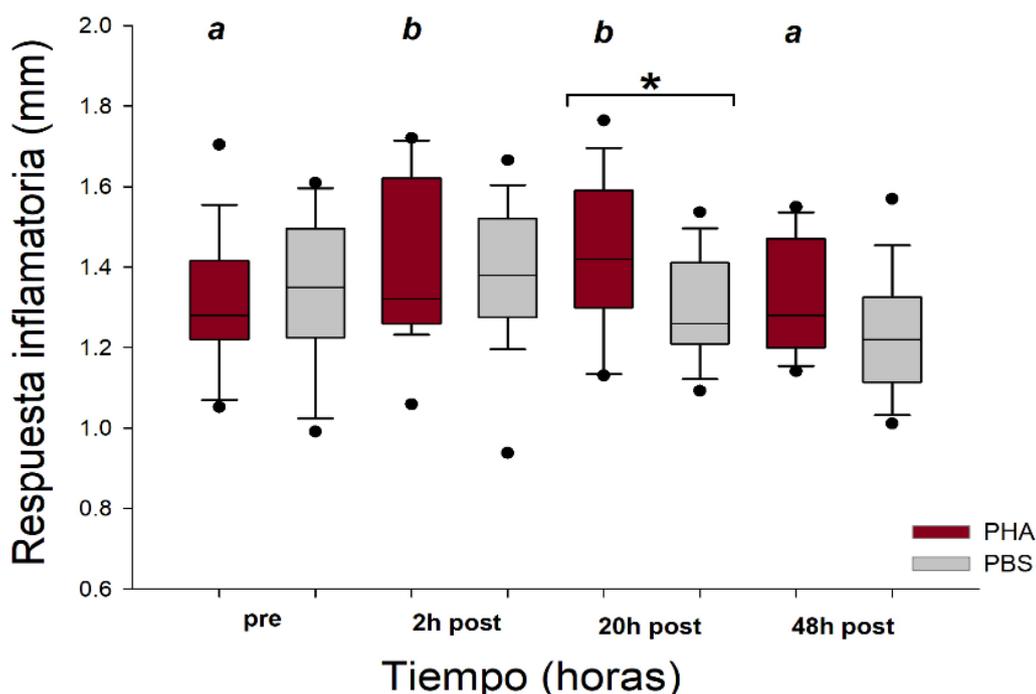


Figura 13. Respuestas inflamatorias de las inyecciones del pie posterior derecho (PHA, tratamiento; caja bordó) y del pie posterior izquierdo (PBS, control; caja gris) en machos adultos de *L. kingii*. Se indican las medianas y percentiles del 5%, 25%, 75% y 95% de las frecuencias. El asterisco sobre la caja indica diferencias significativas entre los tratados con PHA y los controles con PBS ($P < 0.05$) y las letras sobre las cajas indican las diferencias entre los cuatro tiempos de tratamiento: preinyección y 2 hs, 20 hs y 48 hs después de la inyección de PHA ($P < 0.05$).

2.2.2 Evaluación del estado de salud de los individuos de la especie *L. sarmientoi*

-Indicadores externos de salud e Índice de Condición Corporal

Ninguno de los individuos capturados (20 machos, 4 hembras no preñadas y 8 hembras preñadas) presentó heridas, lesiones o ectoparásitos en la piel como ácaros o garrapatas, y todos los individuos presentaron la cola intacta, excepto una hembra preñada que tenía la cola regenerada. Los datos de los valores medios de las variables morfológicas medidas (MC y LHC) para machos, hembras no preñadas y hembras

preñadas, así como los valores medios del índice de condición corporal (ICC) en machos y hembras no preñadas se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9. Valores de la media \pm error estándar (SE), rango y tamaño de muestra (N) de la masa corporal (MC, gr), la longitud hocico-cloaca (LHC, mm) y el índice de condición corporal (ICC) de los individuos de *L. sarmientoi*, calculados al llegar al laboratorio y después del periodo de aclimatación.

<i>L. sarmientoi</i>	N	MC \pm SE (rango)	LHC \pm SE (rango)	N	ICC ₁ \pm SE (rango)	ICC ₂ \pm SE (rango)
Machos adultos	20	10.90 \pm 0.73 (5.52 - 16.38)	74.41 \pm 1.61 (60.02 - 85.34)	20	10.05 \pm 0.23 (7.93 - 11.58)	9.81 \pm 0.22 (8.33 - 11.65)
Hembras no preñadas adultas	4	8.08 \pm 1.77 (5.04 - 12.95)	67.52 \pm 4.33 (59.60 - 79.44)	4	10.12 \pm 0.21 (9.82 - 10.74)	8.68 \pm 0.44 (7.50 - 9.38)
Hembras preñadas	8	12.02 \pm 0.70 (9.19 - 14.90)	75.63 \pm 1.67 (67.41 - 82.18)			
Crías	20	0.90 \pm 0.02 (0.76 - 1.14)	31.27 \pm 0.17 (29.28 - 32.22)			

La MC de los individuos al llegar al laboratorio (7-8 días después de la captura) no fue significativamente diferente de la MC medida en el momento de la captura de ejemplares utilizados en estudios previos (ver sección 2.1.2). La comparación de los resultados de la regresión entre la MC y la LHC de la presente muestra [$y = -20.11 (\pm 2.0) + 0.42 (\pm 0.02)x$; $F_{1,31} = 213.75$, $r^2 = 0.88$, $P < 0.001$] respecto a la comparación de la muestra anterior a esta tesis [$y = -19.14 (\pm 1.9) + 0.41 (\pm 0.02)x$; $F_{1,83} = 263.34$, $r^2 = 0.76$, $P < 0.001$] reveló que la intersección y la pendiente del presente estudio estaban dentro de los intervalos de confianza del 95% de los estudios anteriores (Fig. 14). Esto fue corroborado por el ANCOVA que no mostró diferencias significativas en la masa corporal entre las dos muestras ($F_{1,116} = 0.382$, $P = 0.538$).

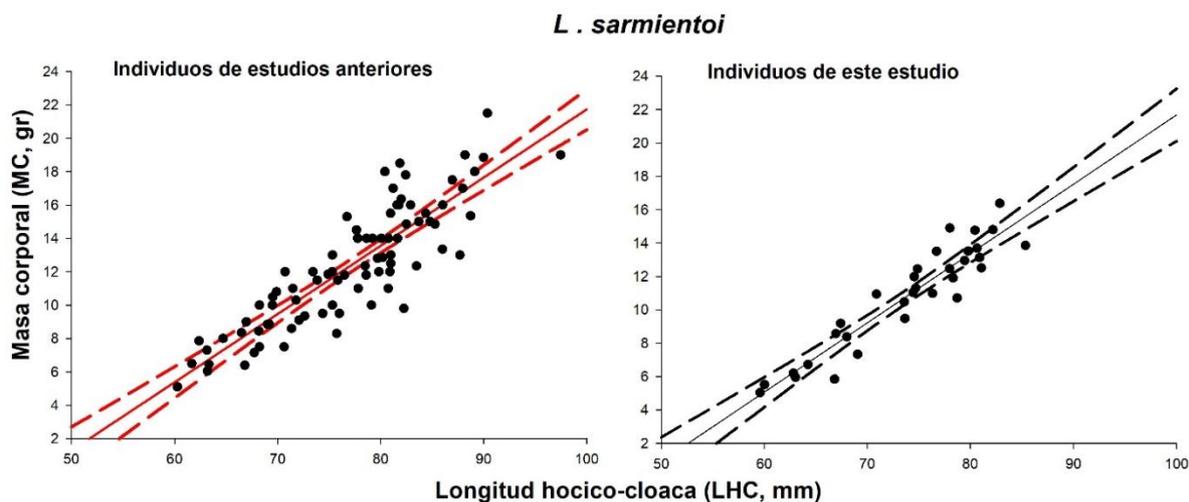


Figura 14. Regresiones Lineales que muestran la relación entre la variable masa corporal (MC, gr) versus la longitud hocico-cloaca (LHC, mm) de los individuos de la especie *L. sarmientoi* capturados para estudios anteriores a esta Tesis (**Izquierda**) y de los individuos capturados para el desarrollo de esta Tesis (**Derecha**). Las líneas discontinuas representan los intervalos de confianza del 95%.

En los machos adultos, los valores medios del ICC no registraron cambios durante el periodo de aclimatación (ICC_1 vs ICC_2 ; prueba- t apareada, $t_{19} = 1.35$, $P = 0.191$; $ICC_{1 \text{ machos}} = 10.05 \pm 1.01$; $ICC_{2 \text{ machos}} = 9.83 \pm 1.00$; $N = 20$), pero si disminuyó en las hembras no preñadas durante ese periodo (ICC_1 vs ICC_2 ; prueba- t apareada, $t_3 = 4.16$, $P = 0.025$; $ICC_{1 \text{ hembras no preñadas}} = 10.12 \pm 0.42$, $ICC_{2 \text{ hembras no preñadas}} = 8.68 \pm 0.87$; $N = 4$). Dada la similitud de los datos del ICC de estos dos grupos de ejemplares adultos, se utilizaron sus datos en conjunto para los siguientes análisis (machos y hembras no preñadas, $N = 24$). El ICC de los machos y hembras no preñadas, fue más alto que el de las hembras postparto antes de comenzar los experimentos (prueba- t , $t_{30} = 4.75$, $P < 0.001$, $N_{\text{machos y hembras no preñadas}} = 24$; $N_{\text{hembras postparto}} = 8$).

- Conteo celular de las muestras sanguíneas

En *L. sarmientoi* determiné el perfil leucocitario y el recuento de eritrocitos de adultos de un primer grupo conformado por los 20 machos y 4 hembras adultas no preñadas y un segundo grupo de las 8 hembras preñadas. En el primer grupo, las células más frecuentes encontradas en los machos y hembras no preñadas fueron los

linfocitos (alrededor de un 82%), seguidas en segundo lugar por los heterófilos (alrededor de 16%; Tabla 10). La abundancia de los basófilos fue mucho más baja respecto de los linfocitos y heterófilos, y con respecto a los eosinófilos, monocitos y azurófilos, la abundancia fue aún más baja, encontrándose estos tipos celulares en muy pocos individuos o en ninguno (Tabla 10). Por su parte la relación H/L fue 0.19. En el segundo grupo, las hembras preñadas también mostraron como leucocito más frecuente a los linfocitos (alrededor de 84%) seguido por los heterófilos (alrededor de 15%; Tabla 10). La abundancia de los basófilos fue muy baja (menos del 1%) y no se encontraron de eosinófilos, monocitos ni azurófilos (Tabla 10). La relación H/L fue 0.18. En cuanto al conteo de eritrocitos en machos y hembras no preñadas, encontré que la media fue de 439.000 eritrocitos/ μ l y en hembras preñadas la media fue 561.000 eritrocitos/ μ l. Los valores obtenidos en el perfil leucocitario, son similares a los hallados para la misma especie en los individuos de la población utilizados para el objetivo del Capítulo 1 (datos de base para la especie, Tabla 1), siendo únicamente un poco mayor el porcentaje de linfocitos en los individuos utilizados en este Capítulo. Esto último generó una diferencia en la relación H/L siendo más baja en los individuos estudiados en éste Capítulo.

Tabla 10. Valores porcentuales de cada tipo de leucocito (linfocitos, heterófilos, basófilos, eosinófilos, monocitos y azurófilos) y la relación heterófilo/linfocito (H/L) del perfil leucocitario de la especie *L. sarmiento*. Se indican la media (\pm error estandar, SE), valores mínimos y máximos, y tamaño de muestra (*N*).

<i>L. sarmiento</i>						
Perfil leucocitario	Machos y hembras adultas			Hembras preñadas		
	Media (\pm SE)	min-max	<i>N</i>	Media (\pm SE)	min-max	<i>N</i>
Linfocitos (%)	82.25 (1.48)	64-95	24	84.00 (1.47)	79-90	8
Heterófilos (%)	15.99 (1.40)	5-36	24	15.25 (1.31)	19-10	8
Basófilos (%)	1.75 (0.40)	8-0	24	0.75 (0.25)	2-0	8
Eosinófilos (%)	0.04 (0.04)	1-0	24	0	0	8
Monocitos (%)	0	0	24	0	0	8
Azurófilos (%)	0	0	24	0	0	8
H/L	0.19		24	0.18		8

- Respuesta a la inyección con fitohemaglutinina (PHA)

En los adultos de *L. sarmientoii* (machos y hembras no preñadas) el espesor del pie posterior derecho previo a la inyección con PHA no mostró una relación significativa con el índice de condición corporal ($ICC_{1 \text{ adultos}}$; Regresión Lineal Simple: $F_{1,23} = 0.034$, $P = 0.855$). Tampoco se encontró una relación entre el espesor del pie derecho y el ICC luego de 2 hs (Regresión Lineal: $F_{1,23} = 0.443$, $P = 0.512$), 24 hs (Regresión Lineal: $F_{1,23} = 0.149$, $P = 0.703$) o 48 hs después de la inyección de PHA (Regresión Lineal: $F_{1,23} = 0.053$, $P = 0.819$).

En estos individuos la comparación del espesor del pie posterior derecho (PHA) versus el pie posterior izquierdo (PBS) a lo largo del tiempo también mostró, como en *L. kingii*, un efecto significativo del factor tratamiento (PHA frente a PBS), el factor tiempo (antes de la inyección frente a 2 hs, 24 hs y 48 hs después de la inyección) y la interacción del tratamiento x tiempo (Tabla 11). El espesor del pie posterior derecho (PHA) e izquierdo (PBS) no presentó diferencias significativas antes de las inyecciones (test de Tukey, $t_{\text{PHA vs PBS}} = -0.539$, $P = 0.999$, $N = 24$), ni a las 48 hs después de la inyección ($t_{\text{PHA vs PBS}} = 0.579$, $P = 0.999$; Fig. 15). Sin embargo, el tratamiento con PHA generó una inflamación detectable en el pie derecho de 0.8 mm en promedio a las 2 hs en comparación con el pie izquierdo al mismo tiempo (test de Tukey, $t_{\text{PHA vs PBS}} = 3.830$, $P < 0.005$), así como también provocó una inflamación detectable en el pie derecho de 0.14 mm en promedio a las 24 hs en comparación con el pie izquierdo ($t_{\text{PHA vs PBS}} = 6.484$, $P < 0.001$; Fig. 15).

La comparación del espesor del pie posterior derecho tratado con PHA a lo largo del tiempo mostró una inflamación de 0.10 mm en promedio a las 2 hs, y de 0.17 mm en promedio a las 24 hs después de la inyección respecto del espesor antes de la inyección (test de Tukey, $t_{\text{pre vs 2h}} = 5.127$, $P < 0.001$, $t_{\text{pre vs 24h}} = 8.060$, $P < 0.001$, $N = 24$). En cambio, no presentaron diferencias de espesor a las 48 hs después de la inyección respecto del estado inicial ($t_{\text{pre vs 48h}} = 2.075$, $P = 0.435$; Fig. 15). En la Tabla 12 se muestran los datos de cada tratamiento a lo largo del tiempo.

Tabla 11. Significancia de los efectos fijos del modelo lineal mixto generalizado seleccionado del ensayo de inflamación de la piel con fitohemaglutinina a lo largo del tiempo (preinyección y 2 hs, 24 hs y 48 hs después de la inyección) entre tratamientos (PHA y PBS) para adultos de *Liolaemus sarmientoi*.

	SS	MS	Num	DenDF	F value	Pr(>F)
Horas	0.2379	0.0793	3	161	15.152	≤ 0.001
Tratamiento	0.1402	0.1402	1	161	26.801	≤ 0.001
Tratamiento x horas	0.1598	0.0532	3	161	10.178	≤ 0.001

Nota: Se indican, SS = suma de cuadrados, MS = media de cuadrados, DenDF = grados de libertad del denominador.

Tabla 12. Datos obtenidos del modelo lineal mixto generalizado en la especie *L. sarmientoi* en **a-** valores medios obtenidos del pie posterior derecho tratado con PHA y del pie posterior izquierdo tratado con PBS a lo largo del tiempo (hs), y **b-** sus comparaciones a lo largo del tiempo y entre tratamientos.

a-

tiempo	tratamiento	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL
ant	PHA	1.23	0.0395	29.8	1.15	1.31
2 hs	PHA	1.33	0.0395	29.8	1.25	1.42
24 hs	PHA	1.40	0.0395	29.8	1.32	1.48
48 hs	PHA	1.27	0.0395	29.8	1.19	1.35
ant	PBS	1.24	0.0395	29.8	1.16	1.32
2 hs	PBS	1.25	0.0395	29.8	1.17	1.34
24 hs	PBS	1.26	0.0395	29.8	1.18	1.34
48 hs	PBS	1.26	0.0395	29.8	1.18	1.34

b-

	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
ant, PHA – 2 hs, PHA	0.1070	0.0209	161	5.127	< .0001*
ant, PHA – 24 hs, PHA	0.1683	0.0209	161	8.060	< .0001*
ant, PHA – 48 hs, PHA	0.0433	0.0209	161	2.075	0.4357
ant, PBS – 2 hs, PBS	0.0158	0.0209	161	0.758	0.9949
ant, PBS – 24 hs, PBS	0.0216	0.0209	161	1.037	0.9680
ant, PBS – 48 hs, PBS	0.0200	0.0209	161	0.958	0.9795
ant, PHA - ant, PBS	-0.0112	0.0209	161	-0.539	0.9994
2 hs, PHA – 2 hs, PBS	0.0800	0.0209	161	3.830	0.0044*
24 hs, PHA – 24 hs, PBS	0.1354	0.0209	161	6.484	< .0001*
48 hs, PHA – 48 hs, PBS	0.0120	0.0209	161	0.579	0.9991

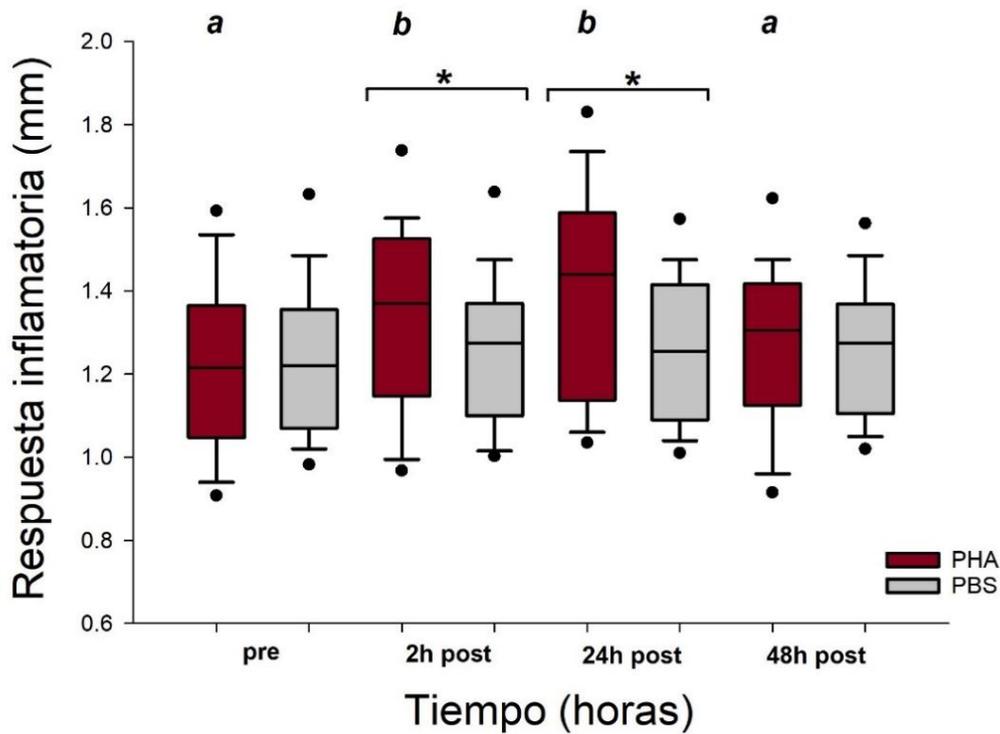
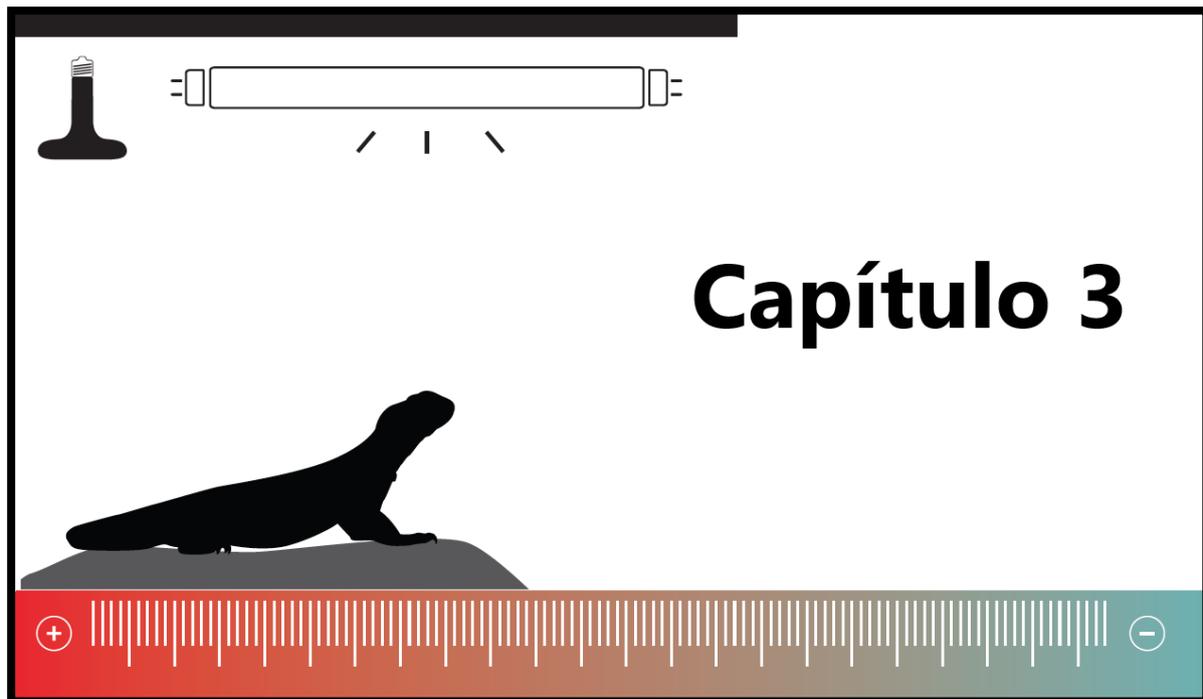


Figura 15. Respuestas inflamatorias de las inyecciones en el espesor del pie posterior derecho (PHA, tratamiento; cajas bordó) y en el espesor del pie posterior izquierdo (PBS, control; cajas grises) en machos adultos y hembras adultas no preñadas de *L. sarmientoi*. Se indican las medianas, percentiles del 5%, 25%, 75% y 95% de las frecuencias. Los asteriscos sobre las cajas indican diferencias significativas entre los tratados con PHA y los controles con PBS ($P < 0.05$) y las letras sobre las cajas indican las diferencias entre preinyección y 2 hs, 24 hs y 48 hs después de la inyección de PHA ($P < 0.05$).



CAPÍTULO 3: BIOLOGÍA TÉRMICA Y EFICIENCIA DE TERMORREGULACIÓN

3.1 Materiales y Métodos

3.1.1 Temperaturas operativas de campo (T_e)

La disponibilidad de heterogeneidad de temperaturas microambientales para la termorregulación (T_e ; *sensu* Hertz 1992; Bakken 1992; Angilletta 2009), la determiné utilizando modelos que emulan la temperatura corporal de un lagarto termoconforme. La T_e se utilizó para analizar el potencial que tiene una lagartija para alcanzar temperaturas corporales que se encuentren dentro del rango de temperatura óptima para los procesos fisiológicos (Bakken 1992; Dzialowski 2005).

En el laboratorio se testeó y calibró el tipo de modelo a utilizar con el objetivo de que el mismo imite el tamaño del cuerpo, la reflectancia y la forma de la lagartija. Para ello coloqué en un terrario (15 x 20 x 20 cm) provisto con una lámpara infrarroja de 150 W, una lagartija viva de *L. kingii*, con una termocupla ultrafina adherida al

abdomen y una segunda termocupla aproximadamente 1 cm dentro de la cloaca fijada con cinta adhesiva para evitar que se salga. Una tercera termocupla ultrafina coloqué dentro de un modelo cilíndrico de PVC y conecté todas las termocuplas a un Módulo de adquisición de datos (USB-TC08, OMEGA) para registrar las temperaturas cada 10 seg. Durante una prueba de 3 hs, moví la lámpara a diferentes alturas para generar diferentes temperaturas durante la calibración. El modelo se consideró un buen indicador de la temperatura corporal (T_c) de un lagarto no termorregulador ya que no hubo diferencias respecto de las T_c obtenidas con la termocupla adherida al abdomen de la lagartija durante la calibración (Wilcoxon, $Z = 0.339$, $P = 0.735$, $N = 639$). Las termocuplas colocadas en el abdomen y dentro de la cloaca registraron T_c similares (Wilcoxon, $Z = 0.558$, $P = 0.577$, $N = 639$; Fig. 16).

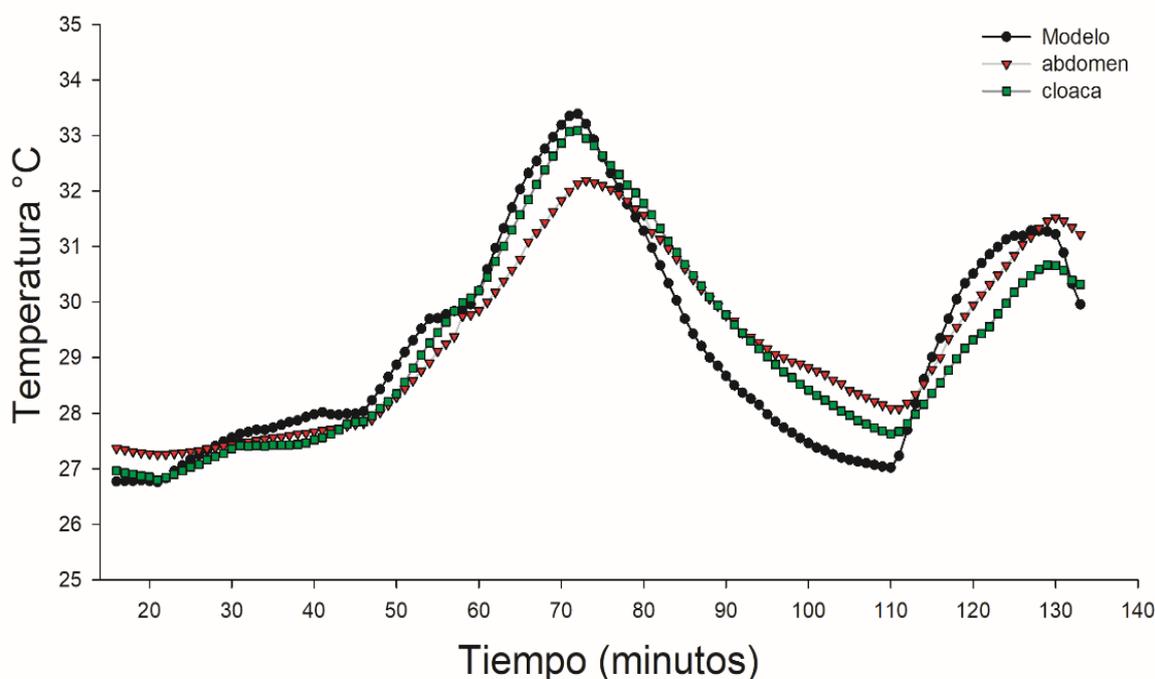


Figura 16. Temperaturas (°C) del modelo de PVC (línea con puntos negros), el abdomen (línea con triángulos invertidos rojos) y la cloaca (línea con cuadrados verdes) de un lagarto de la especie *L. kingii* durante el experimento de calibración.

En los ambientes en los cuales se encuentra *L. kingii* registré las T_e específicamente en los sitios de captura y durante los días de muestreo, utilizando 24 modelos de tubo plástico gris de PVC de 100 mm de longitud x 20 mm de diámetro.

En cada modelo se introdujo una termocupla y ambos extremos se sellaron con silicona (Fastix®). Cada termocupla estaba conectada a un único registrador de datos (3 Onset HOBO U23-003 Temperature Data Logger with 2 External Channels; 1000 Series Squirrel Meter/Logger GEN2 transmitters, 24 channel Data Loggers TM1033) el cual se programó para registrar las temperaturas cada 2 min. Distribuí los 24 modelos de manera homogénea dentro de un área de 30 m² en diferentes sitios, como por ejemplo, al sol, sombra, tierra, rocas o debajo de la vegetación (Fig. 17). Con la base de datos obtenida calculé los valores medios de las temperaturas registradas para cada modelo para cada día de captura, a fin de obtener la T_e media. Estos datos se obtuvieron en dos instancias de muestreo. La primera se llevó a cabo cuando capturé los individuos en el marco de esta Tesis ($N = 21$ machos y 7 hembras preñadas; Febrero 2017); y la segunda cuando se llevó a cabo un muestreo en el mismo sitio y en la misma época (Febrero), pero en el año 2020. En éste segundo muestreo también capturé individuos de *L. kingii* ($N = 19$ machos adultos), y obtuve las T_e y las T_p de cada individuo en el laboratorio. Estos datos fueron incluidos en esta Tesis a fin de incrementar el tamaño de muestra.

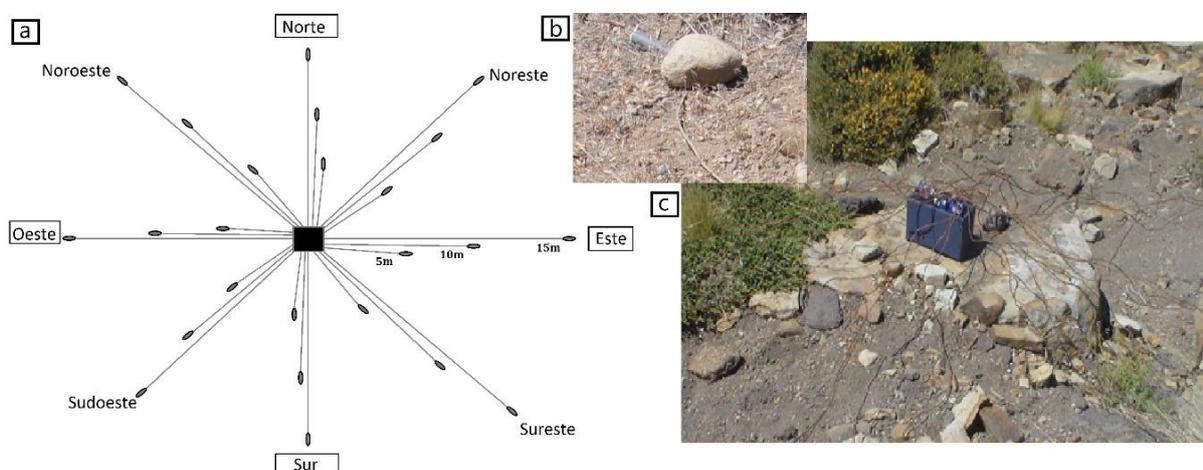


Figura 17. **a** - Esquema que representa la disposición de los hobos dispuestos en el sitio de captura. **b** - Foto de un hobo de PVC ubicado en el campo. **c** - Registrador de los datos de todos los hobos (squirrel).

Además, en el sitio de captura registré la T_e a partir de 3 modelos conectados a almacenadores de datos (HOBO Onset, USA) programados para registrar la temperatura cada 1 hora durante un año a fin de obtener las temperaturas ambientales disponibles para la termorregulación durante todas las estaciones del año (desde Diciembre 2016 hasta Noviembre 2017)⁽⁴⁾.

En el caso de la especie *L. sarmiento* registramos la T_e en los sitios de captura a partir de 5 modelos conectados a almacenadores de datos (HOBO Onset, USA) programados para registrar las temperaturas cada 1 hora⁽⁵⁾. Los modelos se distribuyeron en el promontorio rocoso donde se capturaron las lagartijas y se dejaron durante un año para obtener las temperaturas disponibles en todas las estaciones (desde Diciembre 2017 hasta Noviembre 2018). El tipo de modelo que se colocó fue el mismo que el testeado, calibrado y utilizado para la especie *L. kingii*, ya que los ejemplares de ambas especies presentan una forma y tamaño similar. En el sitio de muestreo de *L. sarmiento* no se colocaron los 24 modelos de tubo plástico de PVC para determinar las T_e los días de muestreo, dado que el índice E para la especie (descrito más abajo) ya es conocido (Ibargüengoytía et al. 2010). Igualmente utilizamos los datos obtenidos de los 5 modelos que registraron las temperaturas durante todo el año y en particular, las T_e de los días de muestreo, para calcular el índice E de nuestros individuos y también poder compararlo con los datos ya publicados.

3.1.2 Temperatura corporal preferida (T_p)

Para obtener la T_p de ambas especies en el laboratorio se llevó a cabo una metodología similar a la que se describió en el Capítulo 1. Los primeros experimentos de termorregulación denominados $T_{p-inicial}$ los realicé dentro de los primeros días al llegar al laboratorio. La T_c de cada lagartija la registré usando una termocupla ultrafina (0.08 mm) fijada al abdomen y sujeta a la base de la cola con cinta adhesiva hipoalérgica. Las termocuplas se conectaron a un módulo de adquisición de datos (USB-TC08, OMEGA) para registrar la T_c cada 10 seg durante aproximadamente 4 hs. Los terrarios en los que los individuos realizaron los experimentos de T_p son los

⁴ y ⁵ Se colocaron 6 modelos en cada sitio de muestreo durante 1 año, pero algunos de ellos fallaron y no registraron datos.

mismos en los cuales permanecieron durante todo el cautiverio y estaban provistos del gradiente térmico necesario para los estudios de termorregulación (17 - 40 °C; Fig. 18). Para cada individuo se obtuvieron las T_{p-ind} , los $T_{set-ind}$ inferior y superior (las temperaturas que limitan el rango intercuartil de las T_{p-ind}) y las T_p mínimas y máximas ($T_{p-min-ind}$ y $T_{p-max-ind}$ respectivamente). Los valores medios estimados para cada individuo de cada especie, se usaron para calcular la media $T_{p-inicial}$ y el $T_{set-inicial}$ para la especie.

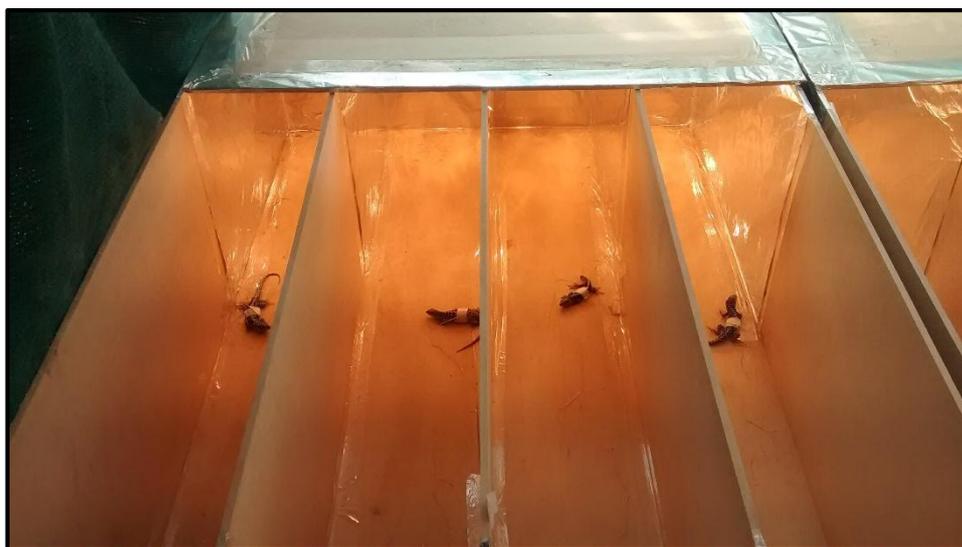


Figura 18. Terrarios utilizados para mantener a los individuos durante el tiempo de cautiverio y realizar los experimentos de fisiología térmica.

3.1.3 Efectividad de la termorregulación (E).

Para determinar el comportamiento termorregulador de cada especie estudiada se siguió la metodología de Hertz et al. (1993), basado en las T_c , T_p y T_e . Determiné el d_b para cada individuo como un índice de la desviación media de la T_c obtenida en su ambiente y su respectivo T_{set} obtenido en el laboratorio. También calculé la d_e como un índice de la calidad térmica media del hábitat desde la perspectiva de un organismo y se estimó como la desviación media de T_e respecto del T_{set} de cada individuo. Para el cálculo del d_e de cada ejemplar, utilicé el valor medio de T_e estimado a partir de todos los registros obtenidos de todos los modelos durante la hora anterior a la captura

de cada individuo, debido a que el T_e es muy variable por la gran amplitud térmica diaria característica de Patagonia. A partir de esto, se definió la efectividad para la termorregulación calculando el índice $E = 1 - (d_b/d_e)$, que integra los recursos térmicos que los individuos tienen en su ambiente natural y la T_p . El índice E permite determinar la eficiencia de la termorregulación para alcanzar la T_p (*sensu* Hertz et al. 1993). La termorregulación se considera efectiva cuando el índice E alcanza valores cercanos a 1; moderada si E está cerca de 0.50; y pobre o reducida cuando el valor de E alcanza valores cercanos a 0, en este caso es indicadora de termoconformidad (*sensu* Hertz et al. 1993). En algunos casos, los valores estimados de E pueden ser negativos, y esto puede ocurrir cuando las lagartijas evitan activamente los hábitats aún cuando el ambiente ofrece temperaturas que se encuentran dentro del T_{set} como sucede, por ejemplo, cuando en el ambiente los depredadores son abundantes o cuando la comida es escasa en los mejores sitios para la termorregulación (Huey y Slatkin 1976; Hertz et al. 1993; Gutiérrez et al. 2010). En esta Tesis se calculó la efectividad de termorregulación (E) en los individuos de *L. kingii* capturados en los dos muestreos mencionados anteriormente (Febrero 2017 y Febrero 2020). En el caso de *L. sarmientoj*, la efectividad de termorregulación (E) se calculó en los individuos capturados durante el muestreo para esta Tesis (Enero 2018).

3.1.4 Análisis estadístico

Utilicé los programas de software estadísticos, Sigma Plot 14.0® y SPSS 17.0®. Los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza se probaron con la prueba de Kolmogorov-Smirnov y con la prueba de Levene, respectivamente. Cuando no se cumplieron los supuestos de normalidad y/o homogeneidad de varianza, utilicé la prueba no paramétrica correspondiente, como el test de rango con signo de Wilcoxon (muestras apareadas) o las pruebas de suma de rangos de Mann-Whitney (muestras independientes). Presento los valores medios con ± 1 error estándar (SE). La significancia de la relación entre la temperatura registrada en el modelo y las T_c del lagarto vivo las analicé con el test de Wilcoxon. Para comparar las T_c y las T_p entre los individuos de los diferentes grupos en ambas especies utilicé una prueba- t de Student.

3.2 Resultados

3.2.1 Biología térmica: temperatura corporal en campo (T_c), temperatura corporal preferida (T_p), temperaturas microambientales y efectividad de la termorregulación (E) de *L. kingii*

Los datos de los valores medios obtenidos de cada variable medida (T_s , T_a , T_c , T_p , T_{set} , T_e , d_b , d_e y E) en machos adultos y en hembras preñadas de *L. kingii* se presentan en la Tabla 13a y b. En esta especie no se encontraron diferencias en los valores de T_c entre los machos y las hembras preñadas capturadas (prueba- t , $t_{26} = 0.622$, $P = 0.540$, $N_{machos} = 21$; $N_{hembras\ preñadas} = 7$), pero la $T_{p-inicial}$ seleccionada por los machos fue mayor que la seleccionada por las hembras preñadas (Mann–Whitney, $U = 6.000$, $P < 0.001$, $N_{machos} = 21$; $N_{hembras\ preñadas} = 7$). Además, en los machos la T_c fue significativamente menor que la $T_{p-inicial}$ seleccionada en el laboratorio (Mann–Whitney, $U = 33.000$, $P < 0.001$), y lo mismo ocurrió en las hembras preñadas (Mann–Whitney, $U = 6.000$, $P = 0.017$; Tabla 13a).

Tabla 13.

a- Datos descriptivos (media \pm SE) de la temperatura del sustrato (T_s , °C), temperatura del aire (T_a , °C), temperatura corporal (T_c , °C), temperatura corporal preferida ($T_{p-inicial}$, °C), valores superior e inferior del set-point de T_p ($T_{set-inicial}$, °C), de los individuos (N) capturados de la especie *L. kingii*.

<i>L. kingii</i>	<i>N</i>	T_s	T_a	T_c	T_p	T_{set}	
						inferior	superior
Machos (2017)	21	32.72 \pm	27.06 \pm	30.62 \pm	34.94 \pm	33.60 \pm	36.43 \pm
		1.69	0.69	0.54	0.31	0.47	0.21
Hembras preñadas (2017)	7	33.83 \pm	27.93 \pm	30.01 \pm	31.76 \pm	30.20 \pm	33.05 \pm
		2.61	1.28	0.41	0.43	0.53	0.51
Machos (2020)	19			32.51 \pm	34.93 \pm	33.44 \pm	36.69 \pm
				0.39	0.21	0.27	0.18

b- Valores obtenidos de las temperaturas operativas (T_e , °C), y valores absolutos obtenidos de las desviaciones de la T_c respecto del T_{set} de cada individuo (d_b), índice de la calidad térmica promedio de un hábitat (d_e) y la efectividad de termorregulación (E) para los machos y hembras preñadas de *L. kingii*. Se indican los tamaños de muestra entre paréntesis (N).

<i>L. kingii</i>	T_e	d_b	d_e	E
Machos	35.4 ± 0.51 (48)	2.46 ± 0.36 (40)	2.82 ± 0.46 (40)	0.12
Hembras preñadas	31.4 ± 0.75 (24)	0.43 ± 0.14 (7)	1.37 ± 0.48 (7)	0.68

Solo el 9.5% de las T_c registradas en los machos quedaron incluidas en el T_{set} ($N = 2$) mientras que el 90.5% de los valores de la T_c ($N = 19$) se encontraron por debajo del T_{set} (Fig. 19). En cambio, en las hembras preñadas el 42.9% de los valores de T_c registrados quedaron incluidos dentro del T_{set} ($N = 3$), mientras que el 57.1% de los valores de T_c ($N = 4$) se encontraron por debajo del T_{set} (Fig. 19).

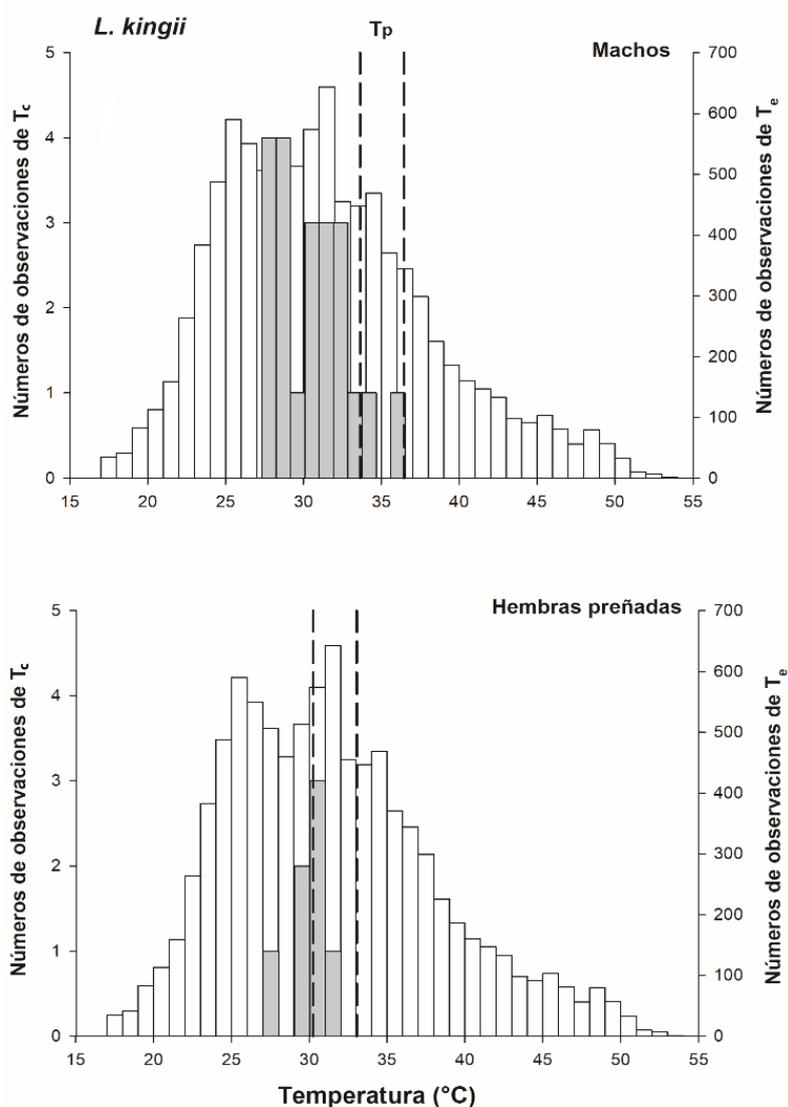


Figura 19. Distribución de las temperaturas corporales a la captura de *L. kingii* y de la disponibilidad térmica en el ambiente. **Eje izquierdo:** número de observaciones de la

temperatura corporal (T_c) en la captura vs la temperatura (barras grises). **Eje derecho:** Número de observaciones de temperaturas operativas (T_e ; barras blancas). Las líneas discontinuas indican el $T_{set-inferior}$ y $T_{set-superior}$ de la temperatura corporal preferida ($T_{p-inicial}$) para machos (gráfico superior) y hembras preñadas (gráfico inferior).

El índice E para los machos de *L. kingii* se calculó integrando los datos obtenidos de los dos muestreos realizados en 2017 ($N_{total} = 21$) y 2020 ($N_{total} = 19$). Aunque en la Tabla 13a se discriminan los valores obtenidos de las T_c , las T_p y las T_{set} para cada muestreo, en la Tabla 13b se presentan los datos de las T_e , d_b , d_e y E de todos los individuos juntos. Los machos presentaron un índice de efectividad de la termorregulación E característico de un pobre termorregulador ($E = 0.12$, $N = 40$) en comparación con las hembras preñadas ($E = 0.68$, $N = 7$) característico de un termorregulador eficiente.

3.2.2 Biología térmica: temperatura corporal en campo (T_c), temperatura corporal preferida (T_p), temperaturas microambientales y efectividad de la termorregulación (E) de *L. sarmientoi*

Para la especie *L. sarmientoi* los valores medios obtenidos de cada variable medida (T_s , T_a , T_c , T_p , T_{set} , T_e , d_b , d_e y E) en machos adultos y hembras no preñadas adultas y por separado en hembras preñadas, se presentan en la Tabla 14a y b. Se encontraron diferencias en la T_c , siendo en los machos y en las hembras no preñadas mayor que en las hembras preñadas (prueba- t , $t_{30} = 2.434$, $P = 0.021$, N_{machos} y hembras no preñadas = 24; $N_{hembras}$ preñadas = 8) sin embargo, la $T_{p-inicial}$ no mostró diferencias entre los dos grupos (prueba- t , $t_{30} = 1.845$, $P = 0.075$, N_{machos} y hembras no preñadas = 24; $N_{hembras}$ preñadas = 8). Además, en los machos y hembras no preñadas, la T_c fue significativamente menor que las $T_{p-inicial}$ (Mann–Whitney, $U = 15.000$, $P < 0.001$) y lo mismo ocurrió en las hembras preñadas, que mostraron una menor T_c que T_p (Mann–Whitney, $U = 0.000$, $P < 0.001$; Tabla 14a).

Tabla 14.

a- Datos descriptivos (media \pm SE) de la temperatura del sustrato (T_s , °C), temperatura del aire (T_a , °C), temperatura corporal (T_c , °C), temperatura corporal preferida ($T_{p\text{-inicial}}$, °C), valores superior e inferior del set-point de T_p ($T_{\text{set-inicial}}$, °C), de los individuos (N) capturados de la especie *L. sarmientoi*.

<i>L. sarmientoi</i>	<i>N</i>	T_s	T_a	T_c	T_p	T_{set}	
						inferior	superior
Adultos (machos y hembras)	24	26.00 \pm 0.83	24.63 \pm 0.62	28.35 \pm 0.61	35.16 \pm 0.20	34.11 \pm 0.23	36.29 \pm 0.19
Hembras preñadas	8	23.80 \pm 1.78	23.44 \pm 1.60	25.19 \pm 1.34	34.42 \pm 0.34	33.48 \pm 0.46	35.38 \pm 0.24

b- Valores obtenidos de las temperaturas operativas (T_e , °C), y valores absolutos obtenidos de las desviaciones de la T_c respecto del T_{set} de cada individuo (d_b), índice de la calidad térmica promedio de un hábitat (d_e) y la efectividad de termorregulación (E) para los adultos y hembras preñadas de *L. sarmientoi*. Se indican los tamaños de muestra (N).

<i>L. sarmientoi</i>	T_e	d_b	d_e	E
Adultos (machos y hembras)	25.5 \pm 0.34 (5)	5.80 \pm 0.65 (24)	8.49 \pm 0.99 (24)	0.31
Hembras preñadas	25.5 \pm 0.34 (5)	8.29 \pm 1.53 (8)	11.16 \pm 1.68 (8)	0.26

El 95.8% de los valores de la T_c de los machos y hembras no preñadas ($N = 23$) se encontraron por debajo del T_{set} , y solo el 4.2% de las T_c quedaron incluidos dentro del T_{set} ($N = 1$, Fig. 20). Por otro lado, en las hembras preñadas el 100% de los valores registrados de T_c ($N = 8$) se encontraron por debajo del T_{set} (Fig. 20).

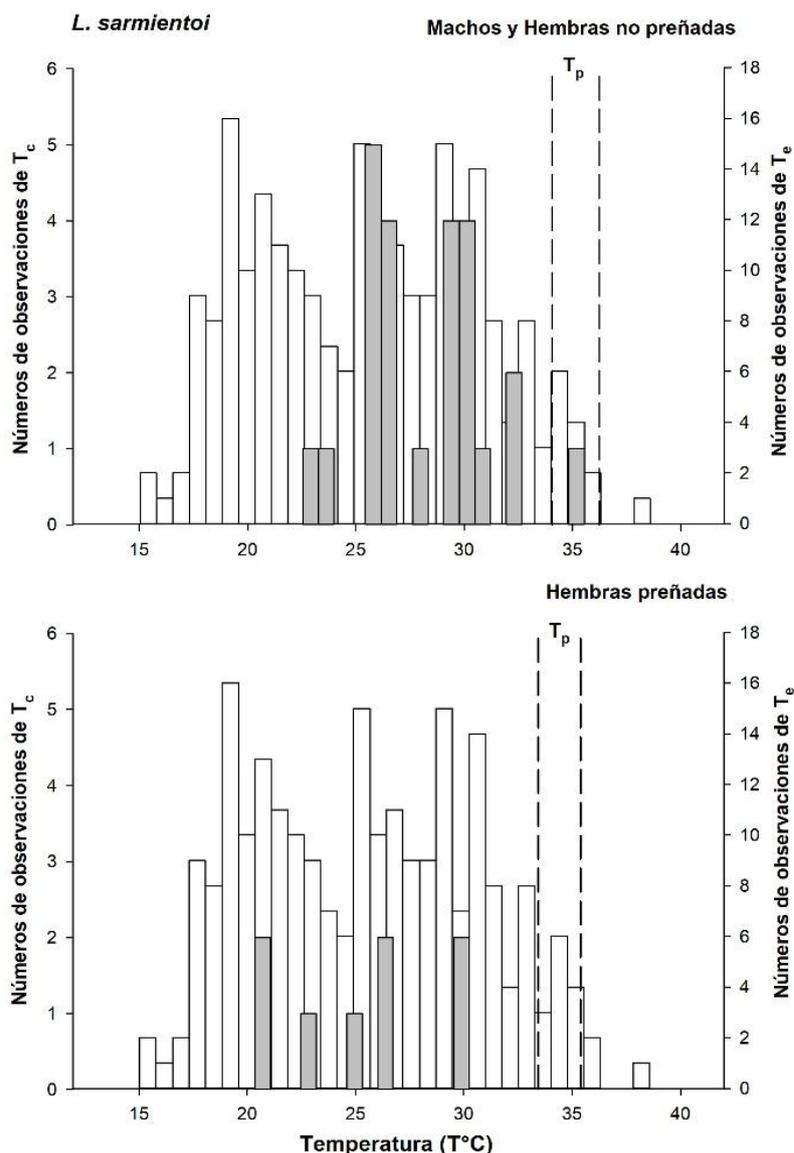


Figura 20. Distribución de las temperaturas corporales a la captura de *L. sarmientoi* y de la disponibilidad térmica en el ambiente. **Eje izquierdo:** número de observaciones de la temperatura corporal (T_c) en la captura vs la temperatura (barras grises). **Eje derecho:** Número de observaciones de temperaturas operativas (T_e ; barras blancas). Las líneas discontinuas indican el $T_{set-inferior}$ y $T_{set-superior}$ de la temperatura corporal preferida ($T_{p-inicial}$) para machos y hembras no preñadas (gráfico superior) y hembras preñadas (gráfico inferior).

La efectividad de la termorregulación (E) fue muy similar entre los dos grupos, aunque un poco mayor en el grupo que incluye a los machos adultos y hembras no preñadas ($E = 0.31$, $N = 24$) en comparación con las hembras preñadas ($E = 0.26$, $N = 7$; Tabla 14b). Por otro lado, si comparamos el E calculado para los individuos de este estudio con respecto al E calculado para esta misma especie en un trabajo

anterior, encontramos que no hay diferencias ya que el E fue 0.30 para el grupo machos y hembras no preñadas (Ibargüengoytía et al. 2010), clasificándose así a los individuos de esta especie como termorreguladores moderados.

3.2.3 Comparaciones entre especies y datos de temperaturas ambientales

Al comparar la T_c obtenida en el campo entre las dos especies estudiadas, se encontró que los individuos de *L. sarmiento* presentaron T_c más bajas (alrededor de 2 °C) que los individuos de *L. kingii* (*L. kingii* $T_c = 30.62$ °C; *L. sarmiento* $T_c = 28.35$ °C), estando esto relacionado con las T_e del ambiente que habita cada especie. Incluso las hembras preñadas de *L. sarmiento* presentaron T_c aún más bajas ($T_c = 25.19$ °C) en comparación con las hembras preñadas de *L. kingii* ($T_c = 30.01$ °C). Sin embargo, al comparar las $T_{p-inicial}$ obtenidas en el laboratorio para las dos especies encontramos que son muy similares (*L. kingii* $T_p = 34.94$ °C; *L. sarmiento* $T_p = 35.16$ °C), con excepción de las hembras preñadas de *L. kingii* que eligieron temperaturas más bajas que las hembras preñadas de *L. sarmiento* (*L. kingii* $T_p = 31.76$ °C; *L. sarmiento* $T_p = 34.42$ °C).

La media de la T_e obtenida durante los meses de actividad de las lagartijas (Octubre-Marzo) fue de 18.6 °C en *L. kingii* y de 11.7 °C en *L. sarmiento*. Si tomamos en cuenta como dato descriptivo la temperatura media anual, la media de la T_e obtenida para el ambiente donde se capturaron los individuos de la especie *L. kingii* fue de 11.19 °C (Fig. 21) y la media de la T_e obtenida para el ambiente donde se capturaron los individuos de la especie *L. sarmiento* fue de 5.62 °C (Fig. 22).

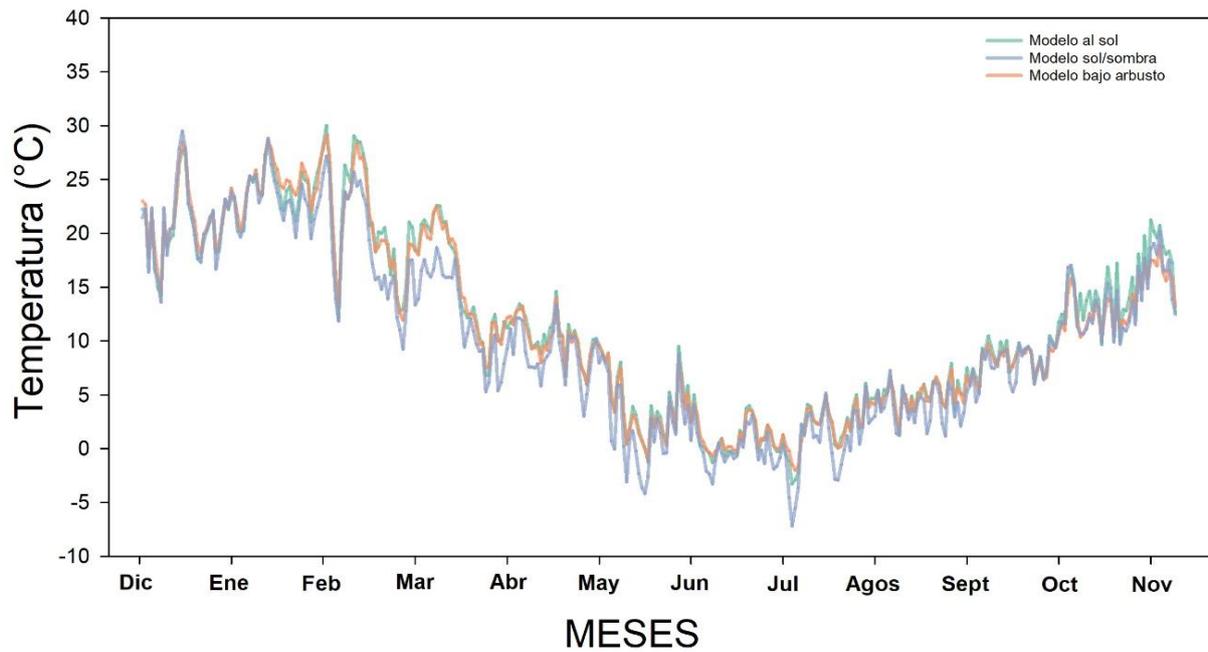


Figura 21. Promedio diario de las temperaturas operativas durante todo un año en el ambiente donde se capturaron los individuos de la especie *L. kingii* (modelo 1: colocado al sol directo; modelo 2: colocado al sol/sombra al lado de arbusto; modelo 3: colocado bajo arbusto). Temporada Diciembre 2016 a Noviembre 2017.

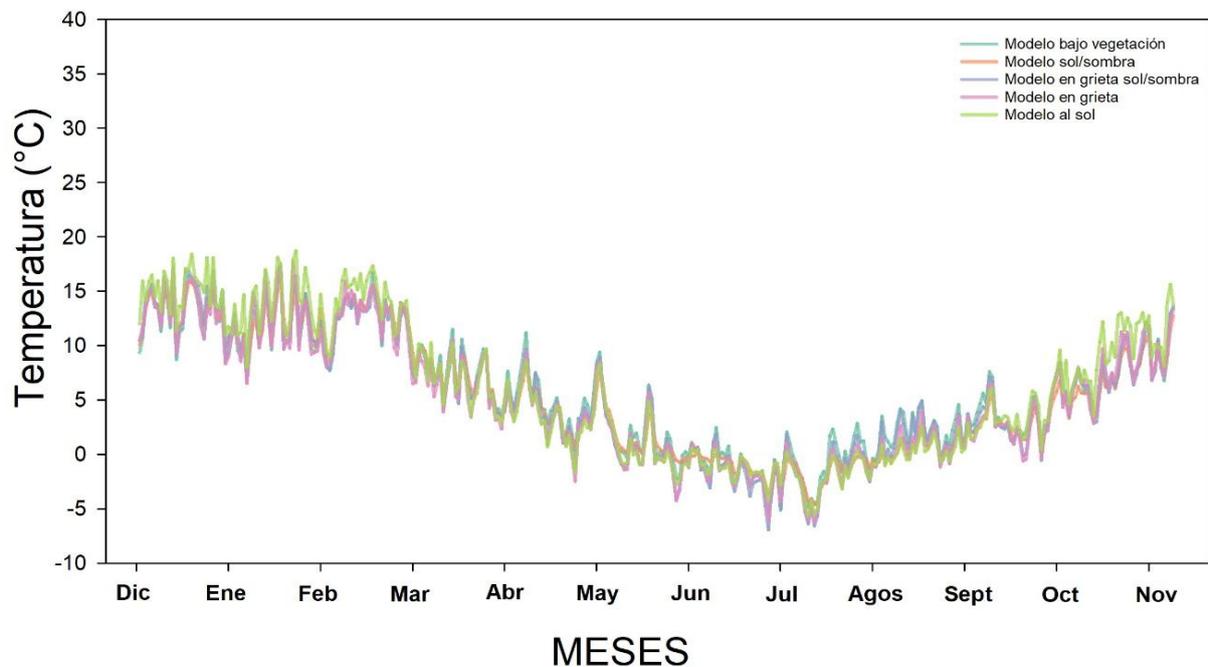


Figura 22. Promedio diario de las temperaturas operativas promedios durante todo un año en el ambiente donde se capturaron los individuos de la especie *L. sarmiento* (modelo 1:

colocado bajo vegetación; modelo 2: colocado al sol/sombra al lado de arbusto; modelo 3: colocado en grieta sol/sombra; modelo 4: colocado en grieta; modelo 5: colocado al sol directo). Temporada Diciembre 2017 a Noviembre 2018.



CAPÍTULO 4: EFECTOS DE UNA ENDOTOXINA BACTERIANA (LIPOPOLISACÁRIDO; LPS) EN LAS TEMPERATURAS PREFERIDAS Y EN LA CONDICIÓN CORPORAL

4.1 Materiales y Métodos

4.1.1 Experimentos con un lipopolisacárido (LPS)

Antes de comenzar los experimentos en los cuales los individuos fueron expuestos a los efectos de una endotoxina bacteriana (lipopolisacárido), las lagartijas se mantuvieron en un periodo de aclimatación de 20 días que comenzó al finalizar los experimentos de los Capítulos 2 y 3 (como se describió en los materiales y métodos del Capítulo 2). En ambas especies se llevaron a cabo metodologías idénticas, en condiciones similares de laboratorio y se las expuso al mismo desafío inmune. Utilicé un lipopolisacárido de *Escherichia coli* 0111:B4 (L2630, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), un componente de la membrana externa de bacterias gram-negativas

reconocidas como una potente endotoxina capaz de activar el sistema inmune de un animal. La elección del LPS y la dosis suministrada, se definió en base a la bibliografía disponible, considerando especialmente los estudios previos realizados en lagartos con tamaños corporales similares a los de las dos especies en estudio en esta Tesis (por ejemplo, Deen y Hutchison 2001; Uller et al. 2006; López et al. 2009). Por su parte, la elección del índice de condición corporal (ICC) que se utilizó en los análisis de este Capítulo y el método de cálculo fueron descritos en el Capítulo 2.

En ambas especies se separaron a los individuos en dos grupos denominados grupo tratamiento y grupo control. A los individuos del grupo tratamiento se le inyectó por vía intraperitoneal una solución del LPS de endotoxina bacteriana de *Escherichia coli* (2.5 µg de endotoxina/g de masa corporal, disuelto a una concentración de 0.5 mg/ml en solución salina estéril). A los individuos del grupo control, se les inyectó también por vía intraperitoneal un volumen de solución fisiológica estéril (PBS). El grupo control fue utilizado a fin de descartar los posibles efectos de las manipulaciones de los ejemplares y de las inyecciones en los resultados. La dosis del volumen inyectado de LPS o PBS en los individuos del grupo tratamiento y del grupo control, respectivamente, fue calculada teniendo en cuenta la masa corporal (MC) de cada individuo.

Para este experimento en la especie *L. kingii*, 18 machos del total de la muestra se dividieron en dos grupos de 9 individuos cada uno (grupo tratamiento y grupo control) teniendo en cuenta datos morfológicos (MC y LHC) registrados en los mismos. De la misma manera, 14 crías del total de las nacidas se dividieron en un grupo tratamiento ($N = 7$, LPS) y un grupo control ($N = 7$, PBS). Los 3 machos restantes de los 21 machos adultos capturados y 6 de las 20 crías nacidas de *L. kingii* fueron seleccionados al azar y reservados para otro estudio (análisis del perfil transcriptómico, como se menciona en el Capítulo 2).

Por su parte en la especie *L. sarmientoi*, los experimentos con LPS se realizaron con los 20 machos adultos y 4 hembras adultas no preñadas capturadas, asignados a dos grupos de 12 individuos cada uno (10 machos y 2 hembras no preñadas), también teniendo en cuenta la MC y LHC de los individuos. La misma metodología se aplicó a las 8 hembras postparto, las cuales fueron reasignadas a un grupo tratamiento ($N = 4$) y un grupo control ($N = 4$).

Se realizaron cinco experimentos de termorregulación siguiendo la misma metodología descrita y utilizada en los Capítulos 1 y 3 para obtener la T_p . La única

diferencia es que estos 5 experimentos de T_p se realizaron durante 5 días sucesivos, durante 6 hs por día de 10:00 a 16:00 hs considerando el horario en que las lagartijas están activas en su ambiente natural. El objetivo del experimento fue determinar la posible variación de las T_p en el tiempo, y en particular se tuvo en cuenta las T_p 24 hs antes de la inyección, y 2 hs, 24 hs, 48 hs y 72 hs postinyección. Los gradientes de temperatura de los terrarios se monitorearon continuamente durante el desarrollo del experimento utilizando 3 modelos (ubicados en uno de los terrarios), conectados a hobos ubicados a diferentes distancias de la fuente de calor a fin de controlar que las temperaturas provistas en el gradiente fueran las adecuadas (un modelo en el extremo cálido del gradiente, otro en la parte media y un tercero en el extremo frío/temperatura ambiente). Los individuos se alimentaron y se les proporcionó agua ad-libitum diariamente al finalizar cada experimento de termorregulación.

4.1.2 Cálculo del Índice de desviación individual de T_p (d_p)

En ambas especies se calculó la temperatura preferida media diaria para cada individuo (T_{p-ind}), 24 hs antes de la inyección con LPS o PBS y 2 hs, 24 hs, 48 hs y 72 hs después de la inyección. Para calcular la desviación de cada T_{p-ind} (24 hs antes y 2 hs, 24 hs, 48 hs y 72 hs) respecto del $T_{setind-inicial}$ inferior y superior obtenido para cada individuo al llegar al laboratorio, definimos un nuevo índice denominado "Índice de desviación individual de T_p " (d_p). El índice d_p se estimó a partir de la suma de los valores absolutos de las desviaciones de T_{p-ind} respecto del $T_{setind-inicial}$ inferior y superior de cada individuo, tanto en los del grupo tratamiento (LPS) como en los del grupo control (PBS). Así se obtuvo un índice d_p medio diario (24 hs antes y 2 hs, 24 hs, 48 hs y 72 hs después de la inyección) con el objetivo de determinar qué tan cerca las lagartijas de ambos grupos termorregulan respecto a su $T_{set-indicial}$ inferior y superior (valor medio inicial obtenido para cada especie) cuando son sometidas a LPS o PBS durante el experimento. El valor absoluto de la desviación de T_{p-ind} respecto del $T_{setind-inicial}$ inferior y superior se consideró 0 cuando T_{p-ind} se incluyó dentro del rango de $T_{setind-inicial}$.

En el caso de las crías nacidas en cautiverio de la especie *L. kingii*, y de las hembras postparto que dieron a luz en el laboratorio de la especie *L. sarmientoi*, utilizadas en estos estudios experimentales, el índice d_p se calculó con el rango de T_{setind} obtenido 24 hs antes de la inyección, ya que no se dispuso del $T_{setind-inicial}$

registrado al llegar al laboratorio después de la captura. Se calculó el índice d_p para estos individuos a las 2 hs, 24 hs, 48 hs y 72 hs después de la inyección con LPS o PBS respectivamente.

4.1.3 Extracción de sangre

Como se mencionó en el Capítulo 2, al finalizar los procedimientos experimentales con el LPS o PBS según el grupo, obtuve una muestra de sangre de cada individuo de los dos grupos, en ambas especies. Cada muestra de sangre se obtuvo por punción de la vena caudal ventral de la cola (misma metodología utilizada para la primera extracción) y parte del volumen extraído la utilicé para realizar el recuento de eritrocitos en la cámara de Neubauer modificada en microscopio, y otra parte del volumen para realizar un extendido (frotis) para el conteo de leucocitos (perfil leucocitario) en microscopio. Para llevar a cabo lo mencionado seguí los mismos procedimientos y la misma metodología descrita en el Capítulo 2.

4.1.4 Análisis estadístico

Los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza también los puse a prueba con los test de Kolmogorov-Smirnov y con la prueba de Levene, respectivamente. Cuando no se cumplieron estos supuestos, utilicé la prueba no paramétrica correspondiente, como el test de rango con signo de Wilcoxon (muestras apareadas) o las pruebas de suma de rangos de Mann-Whitney (muestras independientes). Las medias se presentan con ± 1 error estándar (SE).

Analicé las diferencias entre los valores medios de dos muestras utilizando la prueba- t de Student simple para muestras independientes, o apareadas cuando correspondieron a medidas realizadas en los mismos individuos. En ambas especies apliqué un modelo lineal mixto generalizado (GLMM) para evaluar los efectos de los tratamientos con LPS y PBS sobre la T_p a lo largo del tiempo utilizando el paquete *lme4* (Bates et al. 2015) y para las pruebas *post hoc*, el paquete *emmeans* (Russell 2019) en R software (R Core Team 2019). Este modelo fue el mismo que utilicé para evaluar el efecto de la PHA a lo largo del tiempo en el Capítulo 2. En este caso, para evaluar los efectos del desafío inmune con LPS, la T_p fue considerada como la variable respuesta, mientras que el tratamiento (LPS o PBS), el tiempo, los grupos de

individuos (adultos/crías, o machos y hembras no preñadas/hembras preñadas; según la especie) y sus interacciones fueron considerados efectos fijos, y la identidad individual fue la variable aleatoria. Evalué la significancia estadística de la identidad individual de los análisis mediante pruebas de razón de verosimilitud basadas en la probabilidad máxima restringida (análisis LPS: $\chi^2_{[1]} = -311.04$, $P < 0.05$ para la especie *L. kingii*; y análisis LPS: $\chi^2_{[1]} = 113.33$, $P < 0.01$ para la especie *L. sarmientoï*) utilizando la función `rand` del paquete *ImerTest* (Kuznetsova et al. 2017). En los análisis, los valores de P para efectos fijos se obtuvieron utilizando sumas de cuadrados de Tipo III basadas en la aproximación de Satterthwaite para los grados de libertad del denominador (Kuznetsova et al. 2017). En ambas especies, comencé los análisis con un modelo global que incluía todas las variables y sus interacciones. Para evitar el sobreajuste, debido a que el tamaño de muestra era pequeño, las comparaciones de modelos se basaron en el Criterio de Información de Akaike (AICc) corregido y se realizaron con la función de `dredge` del paquete *MuMIn* en R (Legendre y Legendre 1998; Burnham y Anderson 2002). De acuerdo con esta función, los modelos se clasifican de acuerdo con sus valores de AICc, y el modelo con el AICc más bajo se considera el mejor, mientras que aquellos con una diferencia de valor de AICc menor que 2 respecto del valor de AICc del mejor modelo se consideran modelos con soporte sustancial (Burnham y Anderson 2002). El mismo criterio se utilizó en el Capítulo 2.

Para comparar más de dos medidas realizadas en los mismos ejemplares utilicé Análisis de varianza de una vía para muestras repetidas (RM ANOVA). Cuando estos análisis dieron significativos, realicé el test a *posteriori* de Holm-Sidak.

4.2 Resultados

4.2.1 Efectos del LPS sobre la T_p y el ICC en machos adultos y crías de *Liolaemus kingii*

Antes de comenzar con los experimentos del desafío inmune, los machos asignados al grupo tratamiento con LPS y control con PBS, no mostraron diferencias significativas en el índice de condición corporal ($ICC_{2 \text{ machos}}$, prueba- t , $t_{16} = 0.125$, $P = 0.902$; $N_{\text{LPS}} = 9$; $N_{\text{PBS}} = 9$) ni en la $T_{p\text{-inicial}}$, (prueba- t , $t_{16} = 1.188$, $P = 0.252$; $N_{\text{LPS}} = 9$;

$N_{\text{PBS}} = 9$). Las crías asignadas a los grupos tratamiento (LPS) y control (PBS) tampoco difirieron en el ICC_2 crías obtenido antes del experimento (prueba- t , $t_{12} = 0.349$, $P = 0.733$; $N_{\text{LPS}} = 7$; $N_{\text{PBS}} = 7$) ni en la T_p obtenida 24 hs antes de las inyecciones (Mann–Whitney, $U = 17.000$, $P = 0.371$; $N_{\text{LPS}} = 7$; $N_{\text{PBS}} = 7$).

Después de las inyecciones, encontré en el modelo seleccionado que hubo efectos significativos del factor tratamiento (LPS vs PBS) y el factor tiempo (24 hs antes y 2 hs, 24 hs, 48 hs y 72 hs post). Del modelo también se desprende qué resultó significativa la interacción entre el factor tiempo y el factor tratamiento (LPS vs PBS) sobre la T_p (Tabla 15). El factor grupo de individuos (machos adultos y crías) no fue seleccionado por el modelo utilizado, por lo tanto, se analizaron todos los individuos juntos.

Tabla 15. Significancia de los efectos fijos del modelo lineal mixto generalizado seleccionado de las variables temperatura corporal preferida (T_p) a lo largo del tiempo (24 hs antes y 2 hs, 24 hs, 48 hs y 72 hs postinyección) entre tratamientos (LPS y PBS) para individuos de *L. kingii*.

	SS	MS	Num	DenDF	F value	Pr(>F)
Tiempo	48.796	12.199	4	120	4.1260	≤ 0.005
Tratamiento	21.387	21.387	1	30	7.2335	≤ 0.05
Tratamiento x tiempo interacción	43.630	10.908	4	120	3.6892	≤ 0.01

Nota: Se indican la SS = suma de cuadrados, MS = media de cuadrados, DenDF = grados de libertad del denominador.

Luego de 2 hs de la aplicación de la inyección, los individuos del grupo tratados con LPS presentaron una T_p media 2.7 °C más alta que los individuos del grupo control (test de Tukey, $t_{2\text{hs LPS vs }2\text{hs PBS}} = -4.006$, $P < 0.005$), sin embargo, luego de ese tiempo, no se encontraron diferencias significativas entre los individuos de los dos grupos (test de Tukey, $P > 0.05$; Tabla 16).

Cuando se comparó el efecto del LPS o PBS sobre la T_p a lo largo del tiempo, se encontró que los individuos tratados con LPS no mostraron diferencias significativas y mantuvieron su T_p a lo largo del tiempo con respecto al estado inicial antes de la inyección (test de Tukey, $P > 0.05$; Tabla 16). Por el contrario, los individuos control tratados con PBS disminuyeron 3.1 °C la T_p 2 hs después de la

inyección (test de Tukey, $t_{24\text{hs antes vs } 2\text{hs post}} = -5.088$, $P < 0.001$), recuperando sus valores de T_p con el tiempo, incrementando en 2.0 °C su T_p a las 24 hs postinyección (test de Tukey, $t_{2\text{hs post vs } 24\text{hs post}} = 3.279$, $P < 0.043$), seguido de 1.9 °C su T_p a las 48 hs postinyección (test de Tukey, $t_{2\text{hs post vs } 48\text{hs post}} = -4.006$, $P < 0.005$) y alcanzando un incremento de 2.4 °C su T_p a las 72 hs después de la inyección (test de Tukey, $t_{2\text{hs post vs } 72\text{hs post}} = -4.635$, $P < 0.005$).

En la Tabla 16 se detallan los datos obtenidos de las T_p medias de cada tratamiento, y los resultados de las comparaciones a lo largo del tiempo. Por otro lado, con fines descriptivos, presento gráficos considerando las T_p medias a lo largo del tiempo en los grupos de machos adultos inyectados con LPS y PBS y en las crías inyectadas con LPS y PBS (Fig. 23). También presento un gráfico considerando las T_p medias por individuo de ambos tratamientos (LPS y PBS) a lo largo del tiempo en ambos grupos (Fig. 24), aunque en el modelo los análisis se realizaron con estos grupos integrados.

Tabla 16. Datos obtenidos del modelo lineal mixto generalizado en la especie *L. kingii* en **a-** los individuos inyectados con LPS (tratamiento) y tratados con PBS (control) a lo largo del tiempo (hs), y **b-** sus comparaciones a lo largo del tiempo y entre tratamientos.

a-

<i>tiempo</i>	<i>iny</i>	<i>emmean</i>	<i>SE</i>	<i>df</i>	<i>lower.CL</i>	<i>upper.CL</i>
Pre	LPS	34.3	0.475	133	33.4	35.3
2Post	LPS	34.4	0.475	133	33.4	35.3
24Post	LPS	35.1	0.475	133	34.1	36.0
48Post	LPS	34.8	0.475	133	33.8	35.7
72Post	LPS	34.6	0.475	133	33.6	35.5
Pre	PBS	34.8	0.475	133	33.8	35.7
2Post	PBS	31.7	0.475	133	30.7	32.6
24Post	PBS	33.7	0.475	133	32.7	34.6
48Post	PBS	33.6	0.475	133	32.6	34.5
72Post	PBS	34.1	0.475	133	33.2	35.1

b-

	<i>estimate</i>	<i>SE</i>	<i>df</i>	<i>t.ratio</i>	<i>p.value</i>
LPS, 2Post – LPS, Pre	0.0310	0.608	120	0.051	1.0000
LPS, 24Post – LPS, Pre	0.7596	0.608	120	1.249	0.9624
LPS, 48Post – LPS, Pre	0.4529	0.608	120	0.745	0.9991
LPS, 72Post – LPS, Pre	0.2363	0.608	120	0.389	1.0000

PBS, 2Post – PBS, Pre	-3.0929	0.608	120	-5.088	0.0001*
PBS, 24Post – PBS, Pre	-1.0994	0.608	120	-1.808	0.7287
PBS, 48Post – PBS, Pre	-1.1791	0.608	120	-1.940	0.6423
PBS, 72Post – PBS, Pre	-0.6150	0.608	120	-1.012	0.9910
PBS, Pre – LPS, Pre	0.4351	0.671	133	0.648	0.9997
PBS, 2Post – LPS, 2Post	-2.6888	0.671	133	-4.006	0.0039*
PBS, 24Post – LPS, 24Post	-1.4239	0.671	133	-2.122	0.5159
PBS, 48Post – LPS, 48Post	-1.1969	0.671	133	-1.783	0.7444
PBS, 72Post – LPS, 72Post	-0.4163	0.671	133	-0.620	0.9998

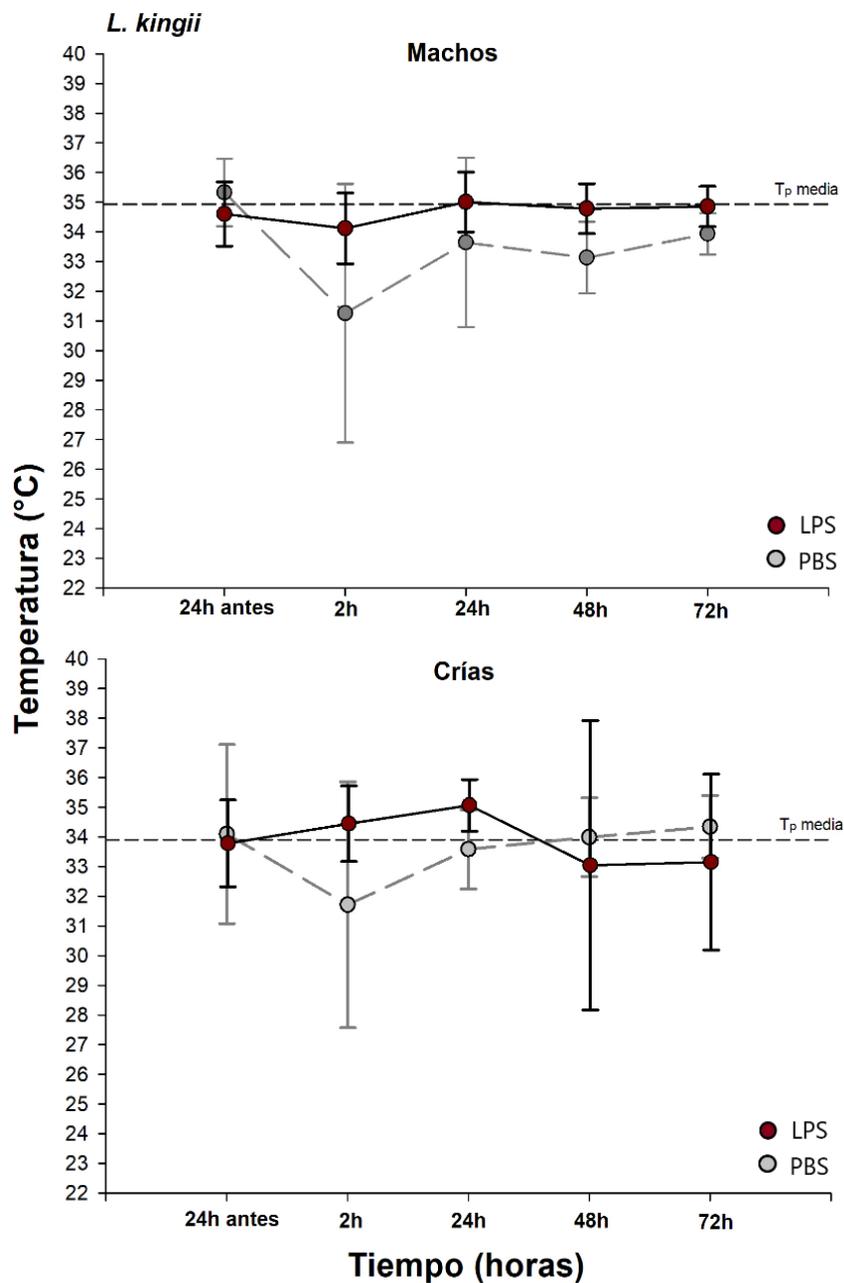


Figura 23. Temperaturas corporales preferidas medias (T_p) y sus desviaciones estándar durante el tratamiento con LPS o el control con PBS a lo largo del tiempo (24 hs antes y 2 hs, 24 hs, 48 hs y 72 hs después de la inyección) para individuos machos (**arriba**) y crías (**abajo**) de *L. kingii*. La línea discontinua indica la T_p media de los individuos antes de la inyección (24 hs antes).

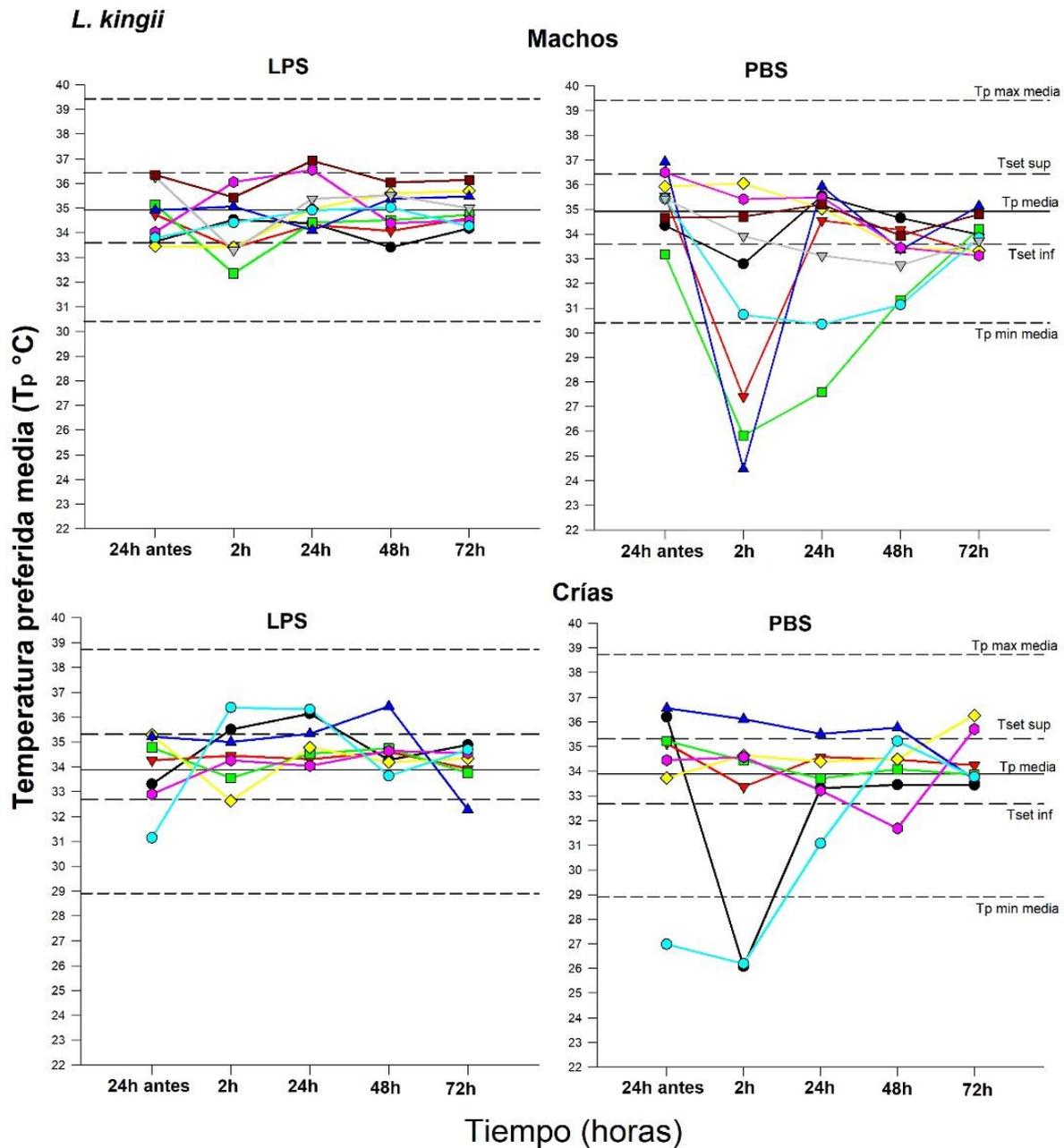


Figura 24. Temperaturas corporales medias preferidas (T_p) de cada uno de los individuos tratados (LPS, tratamiento; a la izquierda) e individuos control (PBS, control; a la derecha) a

lo largo del tiempo (hs) para machos adultos (arriba) y crías (abajo) de *L. kingii*. Se muestra la T_p media, el $T_{set-superior}$, el $T_{set-inferior}$, la T_{p-max} media y la T_{p-min} media registradas antes de los experimentos, al llegar al laboratorio (la denominada $T_{p-inicial}$).

El índice d_p medio obtenido a partir de los datos a las 2 hs, 24 hs, 48 hs y 72 hs después de la inyección en machos adultos del grupo tratamiento fue más bajo que el índice d_p medio obtenido en el grupo control (prueba- t , $t_6 = -3.636$, $P = 0.011$; d_p machos LPS = 0.30 ± 0.08 y d_p machos PBS = 1.99 ± 0.45 ; Fig. 25). Las crías tratadas con LPS exhibieron un índice de d_p medio más bajo que el índice d_p medio obtenido en las crías tratadas con PBS durante las 2 hs, 24 hs, 48 hs y 72 hs después de la inyección (prueba- t , $t_6 = -6.138$, $P < 0.001$; d_p crías LPS = 0.24 ± 0.09 y d_p crías PBS = 1.45 ± 0.17 ; Fig. 25).

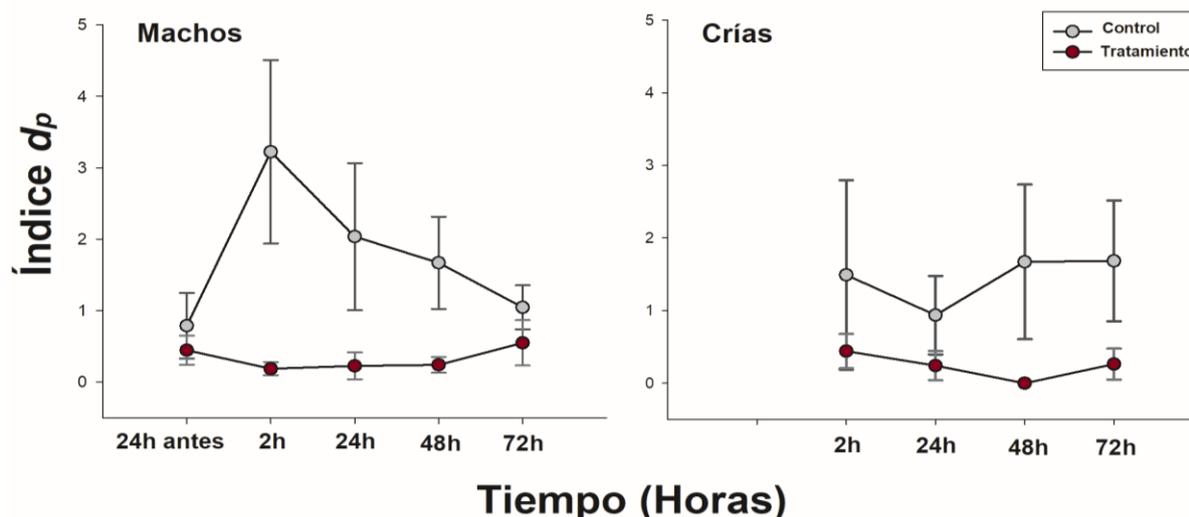


Figura 25. Comparación de las medias \pm error estándar (SE) del índice de desviación individual de T_p (d_p) entre los grupos tratamiento (LPS) y control (PBS) 24 hs antes de la inyección y 2 hs, 24 hs, 48 hs y 72 hs postinyección, para machos adultos (izquierda) y crías (derecha) de *L. kingii*.

El análisis del índice de condición corporal (ICC) a lo largo del tiempo mostró que no hubo variaciones significativas en los machos inyectados con LPS ni en los inyectados con PBS (Tabla 17). Tampoco hubo diferencias en el ICC entre los machos de los dos grupos (LPS vs PBS) después de los experimentos ($ICC_{3 LPS}$ vs $ICC_{3 PBS}$:

prueba- t , $t_{16} = 0.211$, $P = 0.835$). En cambio, el ICC de las crías del grupo tratamiento disminuyó con el tiempo, en particular el ICC_{2 crías} fue mayor que el ICC_{3 crías} (Tabla 17). Las crías del grupo control no mostraron variaciones en el ICC durante los experimentos (Tabla 17).

Tabla 17. Datos comparados para la especie *L. kingii* del Índice de condición corporal de machos adultos y crías, de los grupos tratamiento (LPS) y control (PBS), el primer día en el laboratorio (ICC₁), al inicio (ICC₂) y al finalizar (ICC₃) el desafío inmune. Se indica el tamaño de muestra (N) y valores significativos (*).

<i>L. kingii</i>	N	ICC ₁	ICC ₂	ICC ₃	RM ANOVA	
Machos adultos (LPS)	9	7.77 ± 1.16	7.66 ± 0.94	7.71 ± 0.83	$F_{8,26} = 0.195$	$P = 0.825$
Machos adultos (Control)	9	7.76 ± 0.81	7.71 ± 0.49	7.78 ± 0.50	$F_{8,26} = 0.052$	$P = 0.949$
Crías (LPS)	7	1.03 ± 0.04	0.96 ± 0.07	0.86 ± 0.07	$F_{6,20} = 11.406$	$P = 0.002^*$
Crías (Control)	7	1.01 ± 0.13	0.98 ± 0.11	0.92 ± 0.13	$F_{6,20} = 2.444$	$P = 0.129$

Nota: (*) test *a posteriori*. Método Holm-Sidak $t_{ICC2 \text{ vs } ICC3} = 2.713$, $P = 0.019$, $t_{ICC1 \text{ vs } ICC2} = 2.048$, $P = 0.063$.

4.2.2 Conteo de células sanguíneas en individuos de *L. kingii*

Se comparó el perfil leucocitario y el recuento de eritrocitos entre los individuos de los grupos tratamiento y control a fin de conocer si existen diferencias en la cantidad de los diferentes tipos celulares entre los individuos inyectados con LPS y los inyectados con PBS (Tabla 18). En los machos no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tipos celulares (prueba- t , $P > 0.05$), aunque se observó un pequeño aumento en el porcentaje de heterófilos de los individuos tratados con LPS en comparación con los individuos control (no significativo), y por consiguiente una mayor relación H/L (Tabla 18). La comparación entre el perfil leucocitario obtenido de la primera extracción de sangre de todos los machos al llegar al laboratorio, y el perfil leucocitario presentado por los individuos del grupo tratamiento (LPS) al finalizar los experimentos, no mostró diferencias significativas en ninguno de los tipos celulares (prueba- t , $P > 0.05$). Tampoco se hallaron diferencias en el perfil leucocitario de los machos de la muestra inicial respecto de los individuos del grupo control (prueba- t , $P > 0.05$). Los porcentajes de los diferentes leucocitos correspondientes a las dos extracciones de sangre se presentan en la Tabla 6 y la Tabla 18.

En cuanto al recuento de eritrocitos de los machos, no se hallaron diferencias significativas entre los grupos (prueba-*t*, $t_{16} = -0.195$, $P = 0.848$; $N_{LPS} = 9$, $N_{PBS} = 9$), los individuos inyectados con LPS presentaron un recuento de 535.000 eritocitos/ μl y los individuos inyectados con PBS presentaron un recuento de 548.000 eritocitos/ μl . Por otro lado, al comparar el recuento de eritrocitos de los machos al llegar al laboratorio (resultados en Capítulo 2) y al finalizar los experimentos del desafío inmune, tanto los machos del grupo control, como los del grupo tratamiento, sí presentaron una disminución del recuento de eritrocitos (prueba-*t*, $t_{28} = 2.903$, $P = 0.007$; $N_{PBS} = 9$, $N_{inicial} = 21$; prueba-*t*, $t_{28} = 2.943$, $P = 0.001$; $N_{LPS} = 9$, $N_{inicial} = 21$).

Las crías de *L. kingii* no presentaron diferencias significativas en ningún tipo celular al comparar entre los grupos tratamiento y control (prueba-*t*, $P > 0.05$), aunque aquellas tratadas con LPS exhibieron un menor porcentaje de linfocitos y mayor porcentaje de heterófilos, siendo estos últimos los leucocitos que presentaron mayor porcentaje y aumentando así, la relación H/L (Tabla 18). En análisis del perfil leucocitario también evidenció que las crías del grupo tratamiento presentaron un mayor porcentaje de basófilos en relación a los encontrados en las crías del grupo control, aunque esta diferencia no fue significativa (Tabla 18). Este porcentaje alto de basófilos encontrado en las crías tratadas con LPS, que supera el 20% en el conteo del perfil leucocitario, difiere del conteo de basófilos obtenido en los perfiles leucocitarios de los individuos machos adultos tanto del grupo LPS, como del grupo PBS (Tabla 18).

El recuento de eritrocitos en cámara de Neubauer modificada no pudo ser realizado en las crías debido al bajo volumen de sangre que se pudo obtener.

Tabla 18. Perfil leucocitario de los individuos inyectados con LPS (tratamiento) y los inyectados con PBS (control) de la especie *L. kingii*. Se presenta el porcentaje de cada tipo de leucocito (linfocitos, heterófilos, basófilos, eosinófilos, monocitos y azurófilos) y la relación heterófilo/linfocito (H/L). Se indica la media (\pm error standar, SE), valores mínimos y máximos, y el tamaño de muestra (*N*).

Perfil leucocitario	Machos				Crías			
	LPS (<i>N</i> = 9)		PBS (<i>N</i> = 9)		LPS (<i>N</i> = 7)		PBS (<i>N</i> = 7)	
	Media (\pm SE)	min-max						
Linfocitos (%)	56.44 (4.09)	33-73	68.44 (5.70)	40-94	38.14 (10.25)	9-78	51.57 (8.91)	24-91

Heterófilos	39.22		26.22		39.71		34.71	
(%)	(4.51)	22-63	(4.96)	3-47	(4.83)	19-57	(7.35)	9-61
Basófilos	3.66		5.11		21.71		13.57	
(%)	(0.93)	0-8	(1.56)	0-13	(7.88)	1-49	(3.32)	0-29
Eosinófilos	0.57		0.22		0	0	0	0
(%)	(0.24)	0-2	(0.22)	0-2				
Monocitos	0.11		0		0.43		0.14	
(%)	(0.11)	0-1		0	(0.43)	0-3	(0.14)	0-1
Azurófilos	0		0		0	0	0	0
(%)		0		0				
H/L	0.69		0.38		1.04		0.67	

4.2.3 Efectos del LPS sobre la T_p y el ICC en machos y hembras no preñadas adultas, y hembras postparto de *Liolaemus sarmientoi*

Antes de comenzar con los experimentos del desafío inmune, los machos adultos y hembras adultas no preñadas asignados al grupo tratamiento con LPS y control con PBS no mostraron diferencias significativas en el índice de condición corporal (ICC_2 , prueba- t , $t_{22} = -0.20$, $P = 0.840$; $N_{LPS} = 12$; $N_{PBS} = 12$) ni en la $T_{p-inicial}$ (prueba- t , $t_{22} = -0.50$, $P = 0.617$; $N_{LPS} = 12$; $N_{PBS} = 12$). Las hembras postparto asignadas a los grupos tratamiento (LPS) y control (PBS) tampoco presentaron diferencias significativas en su $ICC_{inicial}$ (Mann-Whitney, $U = 6.000$, $P = 0.686$; $N_{LPS} = 4$; $N_{PBS} = 4$), ni en la T_p obtenido 24 hs antes de las inyecciones de LPS o PBS (Mann-Whitney, $U = 5.000$, $P = 0.384$; $N_{LPS} = 4$; $N_{PBS} = 4$).

En el modelo seleccionado hubo efectos significativos del factor tiempo (24 hs antes y 2 hs, 24 hs, 48 hs y 72 hs después de la inyección) y del factor grupo de individuos (machos, hembras no preñadas adultas y hembras postparto). No obstante, sólo resultó significativa la interacción entre el factor tiempo y el factor tratamiento (LPS vs PBS) sobre la T_p (Tabla 19). Por ello el modelo trató a todos los individuos en conjunto sin discriminar por grupos.

Tabla 19. Significancia de los efectos fijos del modelo lineal mixto generalizado seleccionado de las variables temperatura corporal preferida (T_p) a lo largo del tiempo (24 hs antes y 2 hs, 24 hs, 48 hs y 72 hs postinyección) entre tratamientos (LPS y PBS) y entre grupos de individuos (machos y hembras no preñadas adultas y hembras postparto) para individuos de *L. sarmientoi*.

	SS	MS	Num	DenDF	F value	Pr(>F)
Tiempo	13.671	3.417	4	120	8.9055	≤ 0.001
Tratamiento	0.036	0.035	1	29	0.0926	0.7630
Grupo de individuos	6.492	6.492	1	29	16.9158	≤ 0.001
Tratamiento x tiempo interacción	32.137	8.0343	4	120	20.9342	≤ 0.001

Nota: SS = suma de cuadrados, MS = media de cuadrados, DenDF = grados de libertad del denominador.

Luego de 2 hs de aplicación de la inyección, los individuos del grupo tratados con LPS presentaron una T_p media de 1.7 °C más baja que los individuos del grupo control (test de Tukey, $t_{2\text{hs LPS vs } 2\text{hs PBS}} = 6.343$, $P < 0.001$). Sin embargo, en los tiempos posteriores a las 2 hs, no se encontraron diferencias significativas entre los individuos inyectados con LPS o PBS (test de Tukey, $P > 0.05$; Tabla 17). Cuando se comparó el efecto del factor tiempo en cada uno de los tratamientos (LPS o PBS) sobre la T_p se encontró que los individuos del tratamiento con LPS mostraron diferencias significativas en sus temperaturas, disminuyendo la T_p 1.9 °C 2 hs después de la inyección (test de Tukey, $t_{24\text{hs antes vs } 2\text{hs post}} = -8.766$, $P < 0.001$), y recuperaron sus valores de T_p con el tiempo, mostrando un incremento en 1.6 °C en la T_p a las 24 hs postinyección (test de Tukey, $t_{2\text{hs post vs } 24\text{hs post}} = 7.433$, $P < 0.001$) y 1.9 °C a las 48 hs postinyección, alcanzando así la misma T_p del inicio del experimento (test de Tukey, $t_{2\text{hs post vs } 48\text{hs post}} = 8.378$, $P < 0.001$). A partir de las 48 hs la T_p se estabilizó y se mantuvo hasta las 72 hs después de la inyección (test de Tukey, $t_{2\text{hs post vs } 72\text{hs post}} = 7.425$, $P < 0.001$). Por el contrario, los individuos control con PBS no mostraron diferencias en el factor tiempo durante el experimento y mantuvieron su T_p (test de Tukey, $P > 0.05$; Tabla 20). En la Tabla 20, también se detallan los datos de las T_p medias de cada tratamiento, y los resultados de las comparaciones a lo largo del tiempo. En este caso, también con fines descriptivos presento gráficos considerando las T_p medias a lo largo del tiempo en el grupo de los machos y hembras no preñadas adultas inyectados con

LPS y PBS, y en las hembras postparto inyectadas con LPS y PBS (Fig. 26). También presento un gráfico considerando las T_p medias por individuo de ambos tratamientos (LPS y PBS) a lo largo del tiempo en ambos grupos (Fig. 27), aunque en el modelo seleccionado los análisis se realizaron con estos grupos integrados.

Tabla 20. Datos obtenidos del modelo lineal mixto generalizado en la especie *L. sarmientoi* en **a-** los individuos inyectados con LPS (tratamiento) y tratados con PBS (control) a lo largo del tiempo (hs), y **b-** sus comparaciones a lo largo del tiempo y entre tratamientos.

a-

<i>tiem</i>	<i>lnty</i>	<i>emmean</i>	<i>SE</i>	<i>df</i>	<i>lower.CL</i>	<i>upper.CL</i>
Pre	LPS	35.4	0.197	92	35.0	35.8
2Post	LPS	33.5	0.197	92	33.1	33.9
24Post	LPS	35.1	0.197	92	34.8	35.5
48Post	LPS	35.4	0.197	92	35.0	35.7
72Post	LPS	35.1	0.197	92	34.8	35.5
Pre	PBS	34.9	0.197	92	34.5	35.3
2Post	PBS	35.2	0.197	92	34.8	35.6
24Post	PBS	34.9	0.197	92	34.6	35.3
48Post	PBS	34.8	0.197	92	34.5	35.2
72Post	PBS	34.4	0.197	92	34.0	34.8

b-

	<i>estimate</i>	<i>SE</i>	<i>df</i>	<i>t.ratio</i>	<i>p.value</i>
LPS, 2Post – LPS, Pre	-1.92000	0.219	120	-8.766	<.0001*
LPS, 24Post – LPS, Pre	-0.29187	0.219	120	-1.333	0.9440
LPS, 48Post – LPS, Pre	-0.08500	0.219	120	-0.388	1.0000
LPS, 72Post – LPS, Pre	-0.29375	0.219	120	-1.341	0.9418
PBS, 2Post – PBS, Pre	0.33187	0.219	120	1.515	0.8836
PBS, 24Post – PBS, Pre	0.06250	0.219	120	0.285	1.0000
PBS, 48Post – PBS, Pre	-0.04375	0.219	120	-0.200	1.0000
PBS, 72Post – PBS, Pre	-0.47687	0.219	120	-2.177	0.4780
PBS, Pre – LPS, Pre	-0.54875	0.268	101	-2.044	0.5707
PBS, 2Post – LPS, 2Post	1.70312	0.268	101	6.343	<.0001*
PBS, 24Post – LPS, 24Post	-0.19437	0.268	101	-0.724	0.9993
PBS, 48Post – LPS, 48Post	-0.50750	0.268	101	-1.890	0.6755
PBS, 72Post – LPS, 72Post	-0.73188	0.268	101	-2.726	0.1777

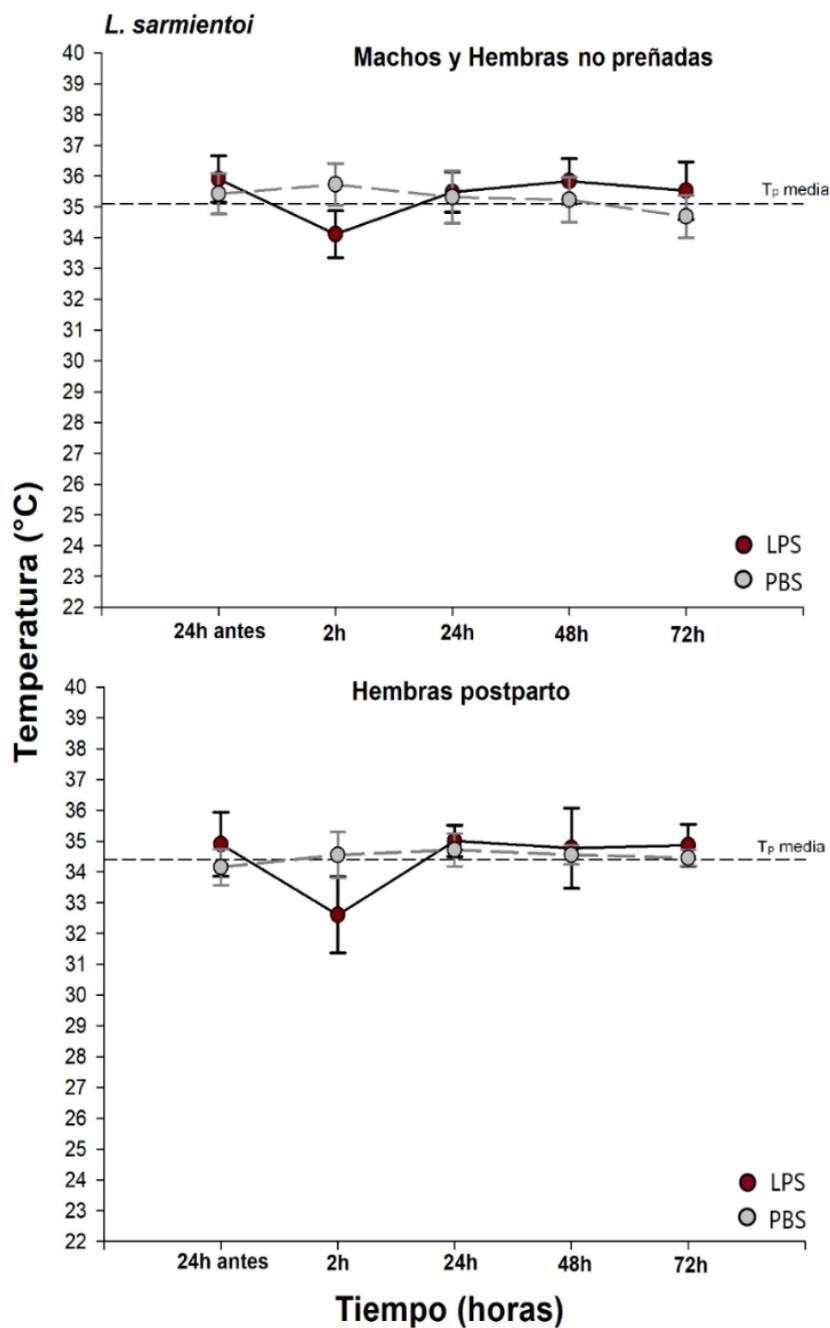


Figura 26. Temperaturas corporales preferidas medias (T_p) y sus desviaciones estándar durante el tratamiento con LPS o el control con PBS a lo largo del tiempo (24 hs antes y 2 hs, 24 hs, 48 hs y 72 hs después de la inyección) para individuos machos y hembras no preñadas (arriba) y hembras postparto (abajo) de *L. sarmientoi*. La línea discontinua indica la T_p media de los individuos antes de la inyección (24 hs antes).

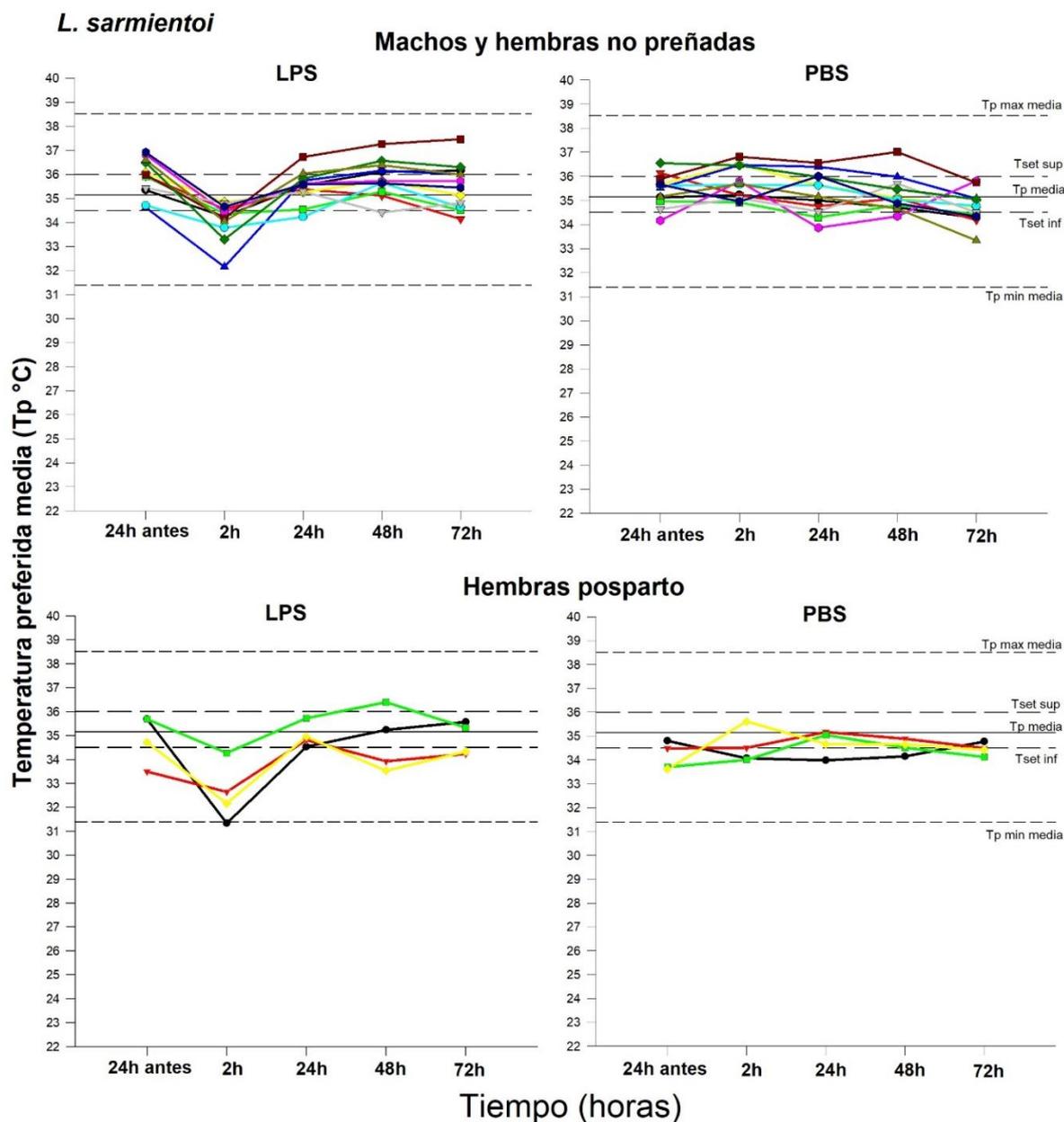


Figura 27. Temperaturas corporales medias preferidas (T_p) de cada uno de los individuos tratados (LPS, tratamiento; a la izquierda) e individuos de control (PBS, control; a la derecha) a lo largo del tiempo (hs) para machos y hembras no preñadas (arriba) y hembras postparto (abajo) de *L. sarmientoi*. Se presenta la T_p media, el T_{set} superior, el T_{set} -inferior, la T_{p-max} media y la T_{p-min} media registradas antes de los experimentos, al llegar al laboratorio (la denominada $T_{p-inicial}$).

El índice de d_p medio obtenido en los machos y hembras no preñadas a partir de los datos a las 2 hs, 24 hs, 48 hs y 72 hs después de la inyección, no mostró

diferencias significativas entre el grupo tratamiento y el grupo control (prueba- t , $t_6 = -0.331$, $P = 0.752$; d_p machos y hembras no preñadas LPS = 0.27 ± 0.12 y d_p machos y hembras no preñadas PBS = 0.31 ± 0.05 ; Fig. 28). En las hembras postparto, el índice d_p medio obtenido a las 2 hs, 24 hs, 48 hs y 72 hs después de la inyección, tampoco mostró diferencias significativas entre el grupo tratado con LPS y el grupo control tratado con PBS (Mann-Whitney, $U = 7.000$, $P = 0.885$; Fig. 28), pero el índice d_p mostró una tendencia a ser mayor a las 2 hs después de la inyección en las hembras postparto del grupo tratamiento (media $_{2hs}$ LPS = 1.38 ± 0.80 °C, $N = 4$) que en las hembras postparto del grupo control (media $_{2hs}$ PBS = 0.06 ± 0.06 °C, $N = 4$; Fig. 28).

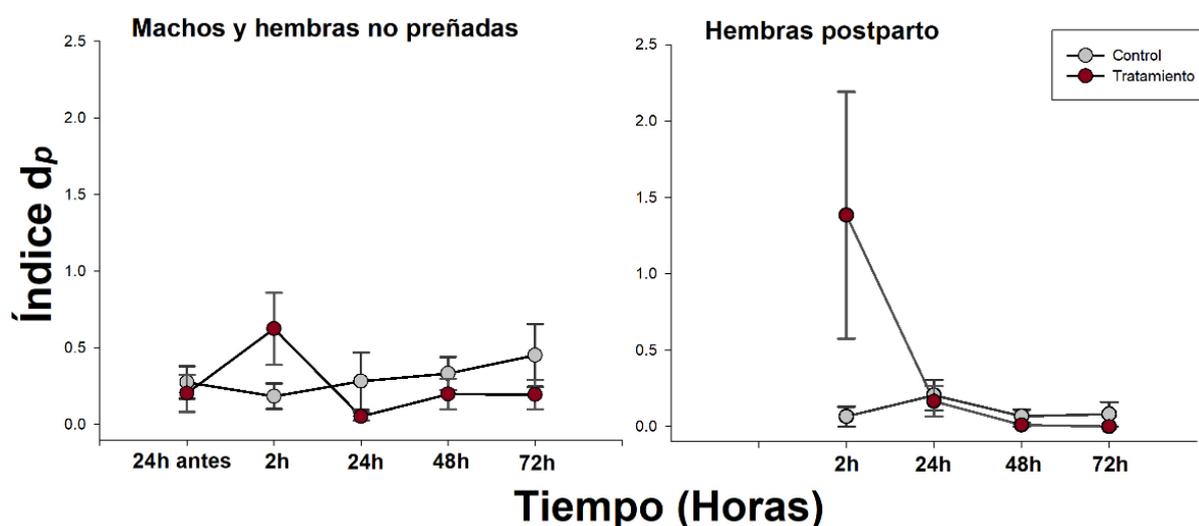


Figura 28. Comparación de las medias \pm error estándar (SE) del índice de desviación individual de T_p (d_p) entre los grupos tratamiento (LPS) y control (PBS) 24 hs antes de la inyección y 2 hs, 24 hs, 48 hs y 72 hs postinyección, para machos y hembras no preñadas (izquierda) y hembras postparto (derecha) de *L. sarmientoi*.

El ICC disminuyó durante el experimento en los machos y hembras no preñadas de ambos grupos (LPS y PBS; Tabla 21). No obstante, no hubo diferencias en el ICC entre los dos grupos (LPS vs PBS) al finalizar los experimentos (ICC_3 LPS vs ICC_3 PBS: prueba- t , $t_{22} = 0.02$, $P = 0.977$). El ICC de las hembras postparto del grupo tratamiento inyectadas con LPS, no mostró variaciones significativas durante el tiempo que duró

el experimento (Tabla 21), y lo mismo sucedió con las hembras postparto del grupo control inyectadas con PBS (Tabla 21). Sin embargo, aunque no hubo diferencias significativas entre los dos grupos (LPS vs PBS) al finalizar los experimentos (ICC_{final} LPS vs ICC_{final} PBS: prueba-*t*, $t_6 = 0.674$, $P = 0.525$, $N_{LPS} = 4$; $N_{PBS} = 4$), en ambos grupos el ICC disminuyó en parte su valor con respecto al estado inicial (Tabla 21).

Tabla 21. Datos comparados para la especie *L. sarmientoi* del Índice de condición corporal de machos y hembras no preñadas, de los grupos tratamiento (LPS) y control (PBS), al inicio (ICC₂) y al final (ICC₃) del desafío inmune, y el ICC de las hembras postparto al inicio (ICC_{inicial}) y al final (ICC_{final}) del desafío inmune. Se indica el tamaño de muestra (*N*) y valores significativos (*).

<i>L. sarmientoi</i>	<i>N</i>	ICC ₂	ICC ₃	Prueba- <i>t</i> apareada	
Machos y Hembras no preñadas (LPS)	12	9.58 ± 0.88	9.05 ± 0.80	$t_{11} = 6.202$	$P < 0.001^*$
Machos y Hembras no preñadas (Control)	12	9.67 ± 1.23	9.04 ± 1.06	$t_{11} = 8.662$	$P < 0.001^*$
		ICC _{inicial}	ICC _{final}	Test de rango con signo de Wilcoxon	
Hembras postparto (LPS)	4	7.34 ± 1.13	7.07 ± 1.19	$W = -10.000$	$P = 0.125$
Hembras postparto (Control)	4	7.88 ± 0.93	7.58 ± 0.94	$W = -10.000$	$P = 0.125$

4.2.4 Conteo de células sanguíneas en individuos de *L. sarmientoi*

Se comparó el perfil leucocitario y el recuento de eritrocitos entre los individuos de los grupos tratamiento y control a fin de identificar diferencias en la cantidad de los distintos tipos celulares entre los individuos inyectados con LPS y los inyectados con PBS (Tabla 22). Los machos adultos y hembras no preñadas no exhibieron diferencias significativas en el porcentaje de ningún tipo celular del perfil leucocitario al comparar el grupo tratamiento con LPS y el control con PBS (prueba-*t*, $P > 0.05$), siendo los porcentajes muy similares en cada grupo, así como la relación H/L (Tabla 22). Por otro lado, la comparación entre el perfil leucocitario obtenido de la primera extracción de sangre de todos los individuos machos y hembras no preñadas al llegar al laboratorio, y el perfil leucocitario presentado por los individuos del grupo tratamiento (LPS) al finalizar los experimentos, no mostró diferencias significativas en ninguno de los tipos

celulares (prueba- t , $P > 0.05$). Tampoco se hallaron diferencias en el perfil leucocitario de los machos y hembras no preñadas de la muestra inicial respecto de los individuos del grupo control (prueba- t , $P > 0.05$). Los porcentajes de los diferentes leucocitos de las dos extracciones de sangre se presentan en la Tabla 10 (Capítulo 2) y en la Tabla 22.

En el recuento de eritrocitos de los machos adultos y hembras no preñadas tampoco se hallaron diferencias significativas entre los grupos tratamiento y control (prueba- t , $t_{22} = 1.616$, $P = 0.120$; $N_{LPS} = 12$, $N_{PBS} = 12$). Sin embargo, los individuos inyectados con LPS presentaron un recuento de 487.000 eritocitos/ μl , y los individuos del grupo control presentaron un recuento menor, siendo de 392.000 eritocitos/ μl , aunque esta diferencia no resultó significativa. De igual manera, al comparar el recuento de eritrocitos de los individuos al llegar al laboratorio (resultados en Capítulo 2) y al finalizar los experimentos del desafío inmune, no se encontraron diferencias significativas con respecto a ninguno de los dos grupos LPS y PBS (prueba- t , $t_{34} = 0.892$, $P = 0.379$; $N_{PBS} = 12$, $N_{inicial} = 24$; prueba- t , $t_{34} = -0.932$, $P = 0.358$; $N_{LPS} = 12$, $N_{inicial} = 24$).

Las hembras postparto incluidas en el estudio experimental tampoco presentaron diferencias significativas en los porcentajes de ninguno de los diferentes tipos celulares en el perfil leucocitario al comparar entre los grupos LPS tratamiento y PBS control (prueba- t , $P > 0.05$), ni en la relación H/L (Tabla 19). Respecto al recuento de eritrocitos, no se hallaron diferencias significativas entre los grupos (prueba- t , $t_6 = 0.205$, $P = 0.845$; $N_{LPS} = 4$, $N_{PBS} = 4$), registrando 575.000 eritocitos/ μl en las hembras postparto inyectadas con LPS y 547.000 eritocitos/ μl en las hembras postparto a las cuales se le inyectó PBS.

Tabla 22. Perfil leucocitario de los individuos inyectados con LPS (tratamiento) y los inyectados con PBS (control) de la especie *L. sarmientoi*. Se presenta el porcentaje de cada tipo de leucocito (linfocitos, heterófilos, basófilos, eosinófilos, monocitos y azurófilos) y la relación heterófilo/linfocito (H/L). Se indica la media (\pm error standar, SE), valores mínimos y máximos, y el tamaño de muestra (*N*).

Perfil leucocitario	Machos y Hembras no preñadas				Hembras postparto			
	LPS (<i>N</i> = 12)		PBS (<i>N</i> = 12)		LPS (<i>N</i> = 4)		PBS (<i>N</i> = 4)	
	Media (\pm SE)	min-max	Media (\pm SE)	min-max	Media (\pm SE)	min-max	Media (\pm SE)	min-max
Linfocitos (%)	81.17 (2.05)	71-91	83.33 (2.17)	64-95	83.75 (1.55)	81-88	84.25 (2.78)	79-90
Heterófilos (%)	16.83 (1.76)	9-28	15.08 (2.24)	5-36	15.75 (1.31)	12-18	14.75 (2.46)	10-19
Basófilos (%)	1.92 (0.69)	0-8	1.58 (0.43)	0-4	0.50 (0.29)	1-0	1.00 (0.41)	0-2
Eosinófilos (%)	0.82 (0.82)	0-1	0	0	0	0	0	0
Monocitos (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
Azurófilos (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
H/L	0.20		0.18		0.18		0.17	

DISCUSIÓN DE LOS CAPÍTULOS 2, 3 Y 4

Estado de Salud de las Poblaciones silvestres – determinación de perfil leucocitario y su variación ante una infección inducida

El conocimiento de valores de referencia sobre parámetros indicadores del estado de salud de las poblaciones de reptiles, obtenido a partir de análisis sanguíneos (por ej., perfil leucocitario, conteo de eritrocitos) y otros parámetros fisiológicos (por ej., índice de condición corporal, temperatura corporal), es fundamental a la hora de evaluar el estado de las poblaciones silvestres y su vulnerabilidad frente a posibles desafíos inmunes. Las poblaciones de *L. kingii* y *L. sarmientoi* estudiadas no presentaron lesiones, ectoparásitos, ni diferencias en el índice de condición corporal entre individuos sugiriendo que presentan un buen estado de salud en su ambiente natural. Además, ambas especies mostraron la capacidad para desarrollar una respuesta inflamatoria temporal y localizada cuando fueron inyectadas con fitohemaglutinina (PHA). Este tipo de estudios es utilizado para determinar la actividad de las células inmunes en otros grupos de vertebrados, como por ejemplo en aves (*Passer domesticus*; Roitt et al. 1996; Martin et al. 2006), mamíferos como tuco-tuco (*Ctenomys talarum*; Merlo et al. 2014) o anfibios (*Epidalea calamita*; Zamora-Camacho y Comas 2018) dado que la magnitud de la inflamación es directamente proporcional a la capacidad de respuesta inmune celular (Clulow et al. 2015). La inflamación observada en los individuos de *L. kingii* y *L. sarmientoi* inyectados con PHA, similar a la respuesta de otras especies de lagartijas como *Podarcis hispanica* (Cabido et al. 2008) y *Podarcis liolepis* (Iglesias-Carrasco et al. 2016) confirma la inmunocompetencia de las especies estudiadas en esta tesis.

Muchas reacciones inflamatorias e infecciosas provocan cambios significativos y específicos en la sangre periférica que pueden determinarse para conocer el estado de salud e identificar procesos patológicos (Jacobson 2007). Los reptiles son un grupo muy heterogéneo resultando difícil hacer inferencias sobre los parámetros hematológicos de referencia de las diferentes especies. Por esta razón, es relevante conocer las características de las células sanguíneas de cada grupo y contribuir al conocimiento del sistema inmune en el género *Liolaemus*, para el cual existen sólo trabajos puntuales de descripción de parámetros hematológicos, hemoparásitos o

presencia de parásitos nematodos o ectoparásitos (Ceballos de Bruno 1995; Castillo et al. 2015, 2019; Espinoza-Carniglia et al. 2016; Megía-Palma et al. 2017). El perfil leucocitario de los individuos de *L. sarmientoii* capturados para los estudios de esta Tesis en 2018, fue similar al obtenido de los individuos de esta misma especie capturados en 2011 en el marco de estudios previos (resultados presentados en el Capítulo 1) permitiendo determinar el perfil leucocitario de referencia para la especie. El mismo perfil leucocitario se detectó en el laboratorio 72 hs después de que los individuos fueron inyectados con LPS y se mantuvo también la relación H/L, corroborando los valores hematológicos normales para la especie.

Algo similar ocurrió en los individuos de *L. kingii*, ya que no mostraron diferencias significativas en el perfil leucocitario antes y después del desafío inmune. No obstante, sí mostraron una diferencia en el recuento de eritrocitos, siendo mucho menor después del estudio experimental con el lipopolisacárido, tanto en los individuos del grupo tratamiento como los individuos control, con relación a la primera muestra de sangre obtenida durante los primeros días en el laboratorio. Esta diferencia encontrada podría deberse a diferentes razones, como por ejemplo, distintas condiciones ambientales (en referencia a las del campo y las del laboratorio), el estado nutricional (aunque los individuos no modificaron su índice de condición corporal estando en el laboratorio trascurrido el periodo de aclimatación), o el estrés causado por la inyección del LPS o PBS que pudiera haber causado cambios en el organismo.

Si bien no hubo diferencias significativas en el perfil leucocitario de *L. kingii* entre los individuos inyectados con LPS y los individuos control, se observó un aumento de ciertos tipos de leucocitos, encontrando un mayor porcentaje de heterófilos en machos y mayores porcentajes de heterófilos y basófilos en crías después de 72 hs de la inyección. También se observó, a partir de esto, que los individuos inyectados con LPS (tanto los machos como las crías) mostraron una mayor relación H/L que los individuos control y también comparando con la primera muestra de sangre tomada luego de la captura (en machos). Es importante resaltar que el mayor porcentaje de basófilos encontrado en las crías en relación a los adultos, concuerda con un estudio en serpientes de la especie *Tropidonophis mairii* en la cual encontraron que los recuentos de basófilos en las crías son cuatro veces más altos que los recuentos en los adultos (Brown y Shine 2016). Este cambio ontogenético en el número de basófilos encontrados, puede indicar que estas células ofrecen protección inespecífica generalizada a las crías inmunológicamente inmaduras, una función que se reemplaza

a medida que el individuo crece y desarrolla su sistema inmunológico adquirido (por ejemplo, respuestas humorales y mediadas por células).

Aunque en ambas especies no se observaron diferencias significativas en el perfil leucocitario (probablemente debido al tiempo de 72 hs transcurrido entre la inyección de LPS y la obtención de la muestra de sangre), sí desarrollaron respuestas de termorregulación conductual después de la inyección con LPS. *Liolaemus kingii* y *L. sarmientoii*, termorregularon de forma diferente ante el desafío inmune con LPS en condiciones experimentales de laboratorio similares. Las lagartijas inyectadas con LPS, a diferencia de los individuos control, termorregularon a temperaturas cercanas a la temperatura corporal (T_c) que experimenta cada especie en su ambiente. *Liolaemus sarmientoii* seleccionó temperaturas menores optando por la estrategia de reducir los efectos del patógeno, mientras que los resultados obtenidos para *L. kingii* sugieren una tendencia a mejorar la eficiencia del sistema inmunológico mediante un aumento de la temperatura corporal. De esta forma, *L. kingii* estaría promoviendo tanto la inmunidad innata, aumentando el reclutamiento de heterófilos y mejorando el potencial fagocítico de los macrófagos y de las células dendríticas, así como la inmunidad adaptativa aumentando la tasa de circulación de linfocitos a través de órganos linfoides (Evans et al. 2015; Rakus et al. 2017).

Respuestas termofisiológicas – Inmunología y Temperatura

La mayoría de los procesos fisiológicos progresan de manera óptima a temperaturas corporales cercanas a las T_p , pero ante un desafío inmune estas temperaturas óptimas pueden variar con respecto a los parámetros normales (Dawson 1975). Los efectos a corto plazo de la temperatura a partir de las respuestas del sistema inmune son particularmente interesantes ya que la capacidad de los patógenos para generar un daño, puede verse fuertemente afectada por fluctuaciones rápidas del sistema inmunológico del huésped (Wright y Cooper 1981). Los lagartos *L. kingii* y *L. sarmientoii* inyectados con LPS realizaron ajustes en su termorregulación conductual al poco tiempo de recibir la inyección. Alcanzaron diferentes temperaturas a aquellas observadas antes del experimento y también diferentes a las elegidas por los individuos control, evidenciando que existe un ajuste de la T_p óptima. Por ejemplo, los machos adultos de *L. kingii* respondieron termorregulando dentro del T_{set} pero con mayor precisión, con un menor rango de T_p y a temperaturas mayores que los machos

del grupo control (Fig. 24). Esta respuesta también fue observada en las crías nacidas en el laboratorio de la misma especie, que como se observó en algunas iguanas juveniles (*Iguana iguana*; Deen y Hutchison 2001, < 1 año de edad), incrementaron la T_p y mantuvieron su temperatura corporal dentro de un rango estrecho como respuesta al lipopolisacárido (Fig. 24). Los estudios sobre las respuestas inmunes y los cambios fisiológicos y comportamentales involucrados para reptiles recién nacidos son escasos (Brown y Shine 2016). En los mamíferos, por ejemplo, los recién nacidos no son capaces de desarrollar fiebre fisiológica en respuesta a pirógenos bacterianos, pero sí lo hicieron conductualmente cuando se les proporcionó un gradiente térmico (fiebre conductual; Satinoff et al. 1976; Kleitman y Satinoff 1981). Estos resultados muestran, una vez más, la importancia del comportamiento termorregulatorio en el desempeño del sistema inmune, no sólo en ectotermos sino también en mamíferos (Dawson 1975). El hallazgo de una mayor precisión de la termorregulación tanto en adultos como en crías de *L. kingii*, resulta coherente con la necesidad de controlar la temperatura dado que se ha demostrado que un incremento excesivo de la misma representa un desafío para la función enzimática, y puede causar la reducción de la actividad leucocitaria inespecífica y la reducción en la producción de anticuerpos en varias especies de reptiles (Dawson 1975; Zimmerman et al. 2010, 2017). Esta mayor precisión se observa con claridad cuando se analizan las diferencias en la desviación individual de T_p (índice d_p) que experimentaron los individuos de *L. kingii*. En el caso de los machos adultos y las crías nacidas en cautiverio, el índice d_p fue menor en los individuos del grupo tratamiento mientras que los individuos del grupo control eligieron termorregular entre las temperaturas extremas del gradiente térmico (índice d_p más alto).

El mantenimiento de la temperatura corporal dentro del punto de ajuste de T_p puede además ser ventajoso para evitar los costos de la termorregulación. Los costos metabólicos incluyen el aumento de las tasas metabólicas en aproximadamente un 10% por cada 1 °C de incremento de la temperatura corporal (Kluger 1979; Boltaña et al. 2013; Ramón-Romero y Farías 2014) y en consecuencia, termorregular a mayores temperaturas puede conducir al agotamiento de los cuerpos grasos (Huey 1974; Adolph y Porter 1993). Otros costos incluyen una mayor exposición a los depredadores, ya que pasan más tiempo fuera de los refugios para termorregular (Herczeg et al. 2008, Zamora-Camacho et al. 2016), lo que limita el tiempo disponible para dedicarlo a la reproducción, alimentación, interacciones sociales y otras

funciones. Algunas especies de lagartos alcanzan hasta 2 °C por encima de la T_p media en respuesta a exposiciones a LPS, como *Dipsosaurus dorsalis* (Vaughn et al. 1974), *Callopiastes maculatus* (Hallman et al. 1990), *Agama agama* (Ramos et al. 1993) y *Oplurus cyclurus* (Muchlinski et al. 1995). En cambio, otras especies no aumentan la T_c ni desarrollan hipotermia después de la inyección de un pirógeno, como se documentó en el lagarto armadillo *Cordylus cataphractus* (Laburn et al. 1981), el lagarto *Anolis equestris* (Muchlinski et al. 1995) y el lagarto alpino *Psammmodromus algirus* (Zamora-Camacho et al. 2016). Los resultados obtenidos en esta Tesis evidencian que los individuos de *L. kingii* desafiados con LPS mantuvieron o en algunos casos elevaron su temperatura corporal, aunque siempre dentro de los límites de su T_{set} , evitando las temperaturas críticas máximas (CT_{max}). De esta manera, las lagartijas bajo una amenaza por patógenos pueden mejorar su respuesta inmunológica, evitando comprometer las funciones enzimáticas, en detrimento del rendimiento locomotor u otras funciones fisiológicas, evitando CT_{max} y asegurando su supervivencia (Angilletta 2009).

Por otra parte, en contraste con lo observado para los individuos inyectados con LPS, la mayoría de los machos y algunas crías del grupo control de la especie *L. kingii* disminuyeron significativamente su T_p 2 hs después de la inyección con PBS. Esta breve hipotermia temprana que mostraron algunos individuos del grupo control puede interpretarse como una respuesta fisiológica al daño tisular causado por agujas hipodérmicas estériles. Los procesos inflamatorios, tanto estériles como infecciosos, ocurren después de la activación de los receptores tipo Toll (TLR) (Beutler 2004) a través del reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y patrones moleculares asociados a daños (DAMP) en leucocitos (Nourshargh y Alon 2014). Durante una infección o lesión tisular, los neutrófilos constituyen la primera línea de defensa al regular la respuesta inmune adaptativa a través de la activación de células B y células T (Hidalgo et al. 2019). La investigación sobre la lesión del tejido estéril en ratones ha demostrado que la acumulación de neutrófilos en el sitio del daño ocurre durante la primera hora, y los neutrófilos presentes en el sitio de la lesión forman grupos (Ng et al. 2011). Por el contrario, la inyección de LPS activa el reconocimiento de PAMP por TLR con neutrófilos que continúan migrando al sitio infectado produciendo grupos dinámicos que muestran un comportamiento de enjambre (Chtanova et al. 2008). Esos estudios demostraron que los DAMP y PAMP regulan la inflamación y controlan la infiltración de neutrófilos (Ng et al. 2011). Por lo

tanto, aún en ausencia de patógenos, ante una inyección de PBS, existe una respuesta inmune innata con invasión de neutrófilos que pueden activar mecanismos de vasodilatación mediante la producción de óxido nítrico (Skovgaard et al. 2005), e inducir así una pérdida de calor hacia el ambiente a corto plazo, como se observa aquí en el desempeño termorregulador de los individuos control de *L. kingii* tratados con PBS.

Los individuos de la especie *L. sarmientoi* tienden a disminuir la T_p después de la administración de una endotoxina bacteriana (LPS), desarrollando una hipotermia conductual incluso cuando en el gradiente térmico provisto en el laboratorio tenían la opción de elegir temperaturas más altas, tales como la T_p seleccionada por los mismos individuos antes del desafío inmune (Fig. 27). Todos los individuos del grupo tratamiento, a las 2 hs posteriores a la inyección con LPS, seleccionaron T_p más bajas (31.33 °C - 34.85 °C) que la T_p media para la especie (35.16 °C; la obtenida en esta tesis). Las T_p de los individuos a las 2 hs posteriores a la inyección con LPS, fue similar a las temperaturas que los lagartos presentaron al momento de la captura (T_c) y que tienen disponibles en su ambiente (ver T_s y T_a , T_e , Fig. 29; mostrada al final de esta sección), sugiriendo una respuesta adaptativa al clima frío donde habitan (Ferguson et al. 2018). Por otro lado, las hembras postparto mostraron un patrón similar, pero la disminución de las T_p 2 hs después del desafío inmune con LPS, resultó mucho más pronunciada (d_p media = 1.38 °C) que en el resto de los individuos (machos y hembras no preñadas, d_p media = 0.62 °C). En el grupo control, en cambio, todos los individuos (machos y hembras no preñadas, y hembras postparto) mantuvieron su T_p dentro de su T_{set} a lo largo del experimento (d_p media machos y hembras no preñadas = 0.18; d_p media hembras postparto = 0.06 °C). En climas fríos una respuesta tendiente a menores T_c puede asegurar no sólo la posibilidad de encontrar las temperaturas en el ambiente, sino una mayor precisión en la termorregulación con menor gasto energético para alcanzar las temperaturas adecuadas. Además, los individuos infectados pueden no ser capaces de asignar suficiente energía para ajustes conductuales y fisiológicos cuando la disponibilidad de microambientes térmicos adecuados es muy reducida (Paranjpe et al. 2014; Megía-Palma et al. 2020).

En la naturaleza, los lagartos de la especie *L. sarmientoi* alcanzan una T_c media baja de 26 °C durante la temporada de actividad, incluso cuando prefieren una temperatura corporal mucho más alta en el laboratorio (T_p = 34.43 ± 0.28 °C; Iburgüengoytía et al. 2010; T_p = 35.16 °C, esta tesis). Esta especie se comporta como

un termorregulador entre deficiente a moderado ($E = 0,30$; Ibargüengoytía et al. 2010; $E = 0.31$, esta tesis), lo que sugiere que el ambiente limita el logro de una T_c más alta y, por consiguiente, la capacidad de combatir una infección utilizando el mecanismo de fiebre conductual. Por su parte, la especie *L. kingii* se comporta también como un pobre o deficiente termorregulador ($E = 0.12$), pero a diferencia del ambiente que habita *L. sarmiento*, los individuos de *L. kingii* tienen mayor disponibilidad térmica en su ambiente para termorregular. La tendencia de los individuos de *L. sarmiento* a disminuir su temperatura corporal conductualmente y desarrollar hipotermia en lugar de aumentar su temperatura mediante la termorregulación y desarrollar fiebre como mecanismo de defensa, puede estar influenciada por los costos de la termorregulación, tanto en términos del gasto energético, como en relación al riesgo de depredación al tomar el sol fuera de los refugios en los promontorios rocosos. Además, en un ambiente frío hay un alto gasto de energía en la búsqueda de sustratos cálidos en detrimento de las actividades sociales, reproductivas y de alimentación (Ibargüengoytía et al. 2010; Fernández et al. 2015; 2017a). La hipotermia, como respuesta a un desafío inmune, se vuelve especialmente importante en las hembras postparto, teniendo en cuenta su pobre condición corporal luego de los partos, el cual puede agravarse si se expone a altas temperaturas. Cuando los lagartos están sanos (individuos del grupo control), eligen temperaturas incluidas en el T_{set} , ideales para un rendimiento fisiológico óptimo como la locomoción (Fernández et al. 2011; Fernández y Ibargüengoytía 2012), actividades sociales (Fernández et al. 2018) o el desarrollo embrionario (Fernández et al. 2017a).

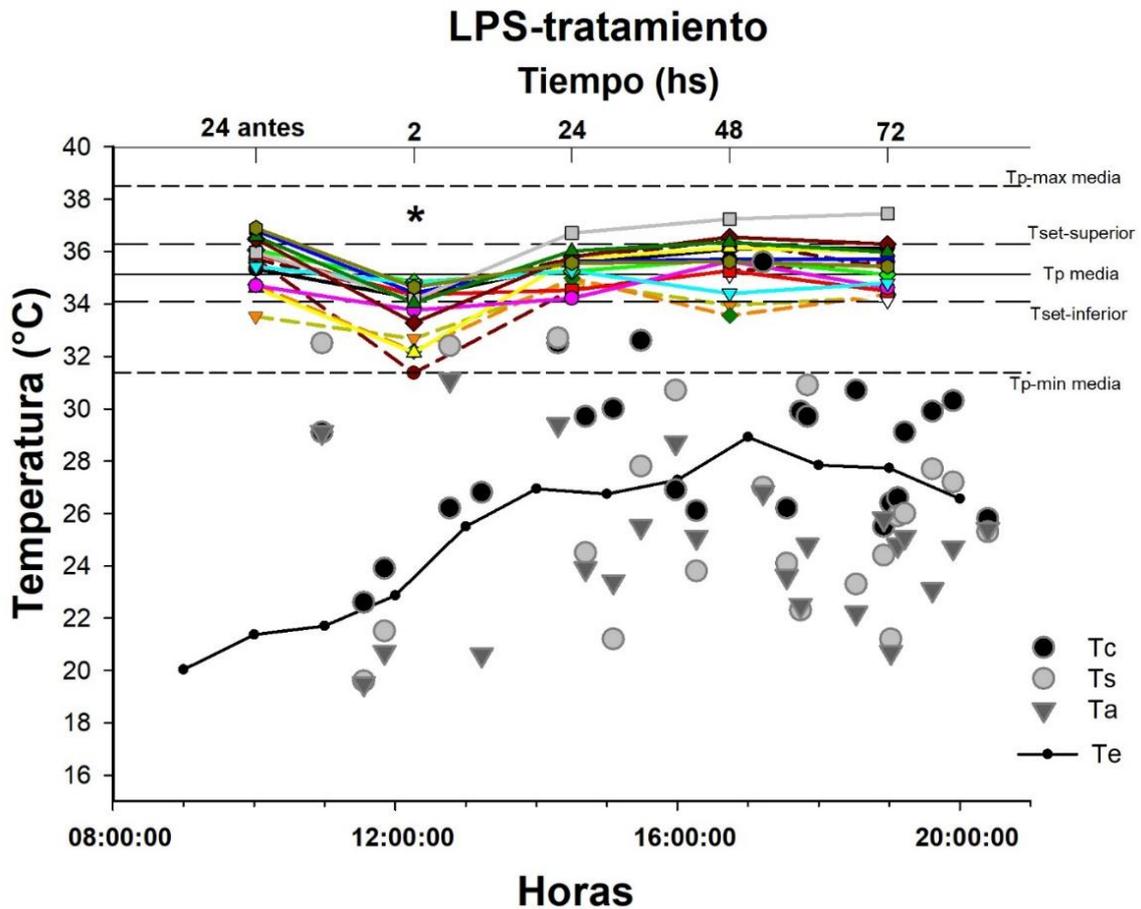


Figura 29. Se presenta la temperatura corporal (T_c) de los individuos de la especie *L. sarmientoi* y la temperatura del sustrato (T_s) y temperatura del aire a 1 cm (T_a) en cada microambiente donde se capturaron. Las temperaturas operativas (T_e) se obtuvieron durante los días de muestreo cada una hora (**eje inferior**). También se indican las temperaturas corporales preferidas medias (T_p) de todos los individuos tratados con LPS a lo largo del tiempo (hs) en machos y hembras no preñadas (líneas coloreadas continuas, $N = 12$) y en hembras postparto (líneas coloreadas discontinuas, $N = 4$) (**eje superior**). Las diferencias significativas ($P < 0.05$) para machos y hembras no preñadas, y para hembras postparto, se indica con (*).

Fisiología térmica y gasto energético

Las altas temperaturas comprometen el funcionamiento de los procesos metabólicos, en particular de las proteínas tanto en vertebrados endotermos, como en ectotermos. Los endotermos asignan gran parte de su metabolismo energético para mantener la temperatura corporal dentro de límites muy estrechos; sin embargo,

cuando desarrollan fiebre, cambian su termostato hipotalámico alrededor de 2 °C por encima de la temperatura corporal normal (Blatteis 2003; Bicego et al. 2007). Los ectotermos, en cambio, pueden variar su temperatura corporal en mayores rangos de acuerdo a la disponibilidad térmica en su entorno natural (Angilletta et al. 2002, 2006). Aun así, los cambios en la temperatura corporal de algunos grados centígrados por encima de la normotermia como consecuencia de una infección pirogénica tienen un costo energético significativo (Sherman y Stephen 1998). Sin embargo, los machos adultos de *L. kingii* no mostraron cambios significativos en el ICC mientras se mantuvieron en cautiverio desde la captura hasta 72 hs después del experimento, tampoco hubo diferencias en el ICC entre los individuos del grupo tratamiento y control antes de exponerlos experimentalmente al LPS, ni al finalizar el estudio experimental. En cambio, las crías confirman las predicciones realizadas, ya que las desafiadas con LPS parecen haber comprometido su condición corporal a expensas de mantener la temperatura corporal dentro de un rango estrecho de T_{set} . Las crías tratadas con LPS mostraron una disminución significativa del ICC a lo largo del tiempo que no se observó en las crías del grupo control. Estos resultados podrían evidenciar una asignación de reservas energéticas a la respuesta inmune en los recién nacidos, señalando la vulnerabilidad de las crías y la presión selectiva que los patógenos ejercen sobre las poblaciones naturales.

En la especie *L. sarmientoii*, los machos y hembras no preñadas tanto del grupo inyectado con LPS como del grupo control inyectado con PBS, experimentaron una reducción del ICC al final del experimento. En cambio, no ocurrió lo mismo en las hembras postparto, que aún teniendo una condición corporal baja al inicio de los experimentos por haber parido recientemente, tanto las inyectadas con LPS como las inyectadas con PBS, no mostraron una disminución significativa del ICC. La disminución en el ICC podría deberse al hecho de que las altas temperaturas disponibles en el gradiente térmico durante varios días, pueden haber causado un mayor gasto de energía en los individuos, independientemente de si estaban inyectados con LPS o PBS. Sin embargo, tanto los machos y hembras no preñadas como las hembras postparto inyectados con LPS, disminuyeron sus T_p a las pocas horas postinyección, elevándola de a poco a lo largo de los días de experimento. Estudios previos mostraron que aquellos individuos inyectados con LPS que iniciaron los experimentos con una baja condición corporal, tendieron a elegir bajas temperaturas corporales probablemente como una forma de reducir el gasto

energético y poder desarrollar una respuesta inmune efectiva frente a ese desafío (Romanovsky y Szekely 1998; Deen y Hutchison 2001). No obstante, los machos y hembras no preñadas utilizados en esta Tesis iniciaron los protocolos experimentales con un buen ICC. La elección de bajas temperaturas corporales, además de reducir el gasto energético, disminuiría la tasa de crecimiento de un organismo patógeno y, en consecuencia, el impacto negativo en el huésped (Medzhitov et al. 2012). Por lo tanto, la hipotermia puede dar tiempo al sistema inmune para desarrollar un ataque inmunológico completo (Kluger et al. 1998), mecanismo de defensa generalizado para muchas especies de lagartos frente a un desafío inmune (Deen y Hutchison 2001; Merchant et al. 2008; Paranjpe et al. 2014; Zamora-Camacho et al. 2016). En *Liolaemidos* que viven en ambientes templados fríos, latitudes extremadamente altas del sur de la Patagonia y con escasos recursos térmicos (Ibargüengoytía et al. 2010; Fernández et al. 2011; Fernández y Ibargüengoytía 2012), los costos de producir fiebre podrían ser excesivamente altos y, por lo tanto, la estrategia opuesta de hipotermia observada en *L. sarmiento*, estaría favorecida para conservar energía y al mismo tiempo disminuir la aptitud del patógeno (Kluger et al. 1998).

Los resultados contrastantes observados entre los individuos de las especies *L. kingii* y *L. sarmiento* pueden explicarse por la diferente disponibilidad de temperaturas para la termorregulación en sus entornos naturales, tal como fue planteado en la hipótesis. Por ejemplo, el índice de la calidad térmica del hábitat desde la perspectiva de un organismo ($d_e = |T_e - T_{set}|$; *sensu* Hertz et al. 1993) para *L. kingii* correspondió a $d_e = 2.38$, mientras que para *L. sarmiento* el d_e fue 9.90, uno de los índices más altos para *Liolaemus* (Ibargüengoytía et al. 2010, 2020). Las dos especies eligen posibles temperaturas disponibles en su ambiente para responder al mismo desafío inmune (LPS). Las diferencias ambientales parecen haber conformado diferentes caminos evolutivos para las respuestas térmicas a los desafíos inmunes: mantener una T_p estable o más alta en *L. kingii* e hipotermia en *L. sarmiento* (en condiciones metodológicas experimentales idénticas). Se espera que futuras investigaciones continúen contribuyendo en el entendimiento de la ecoinmunología en lagartos y los posibles desafíos relacionados con el cambio climático que están afectando la diversidad de ambientes para la termorregulación y sometiendo a las poblaciones a nuevos patógenos.

CONCLUSIONES FINALES

En esta tesis he integrado algunos aspectos del sistema inmune como el perfil leucocitario, con el índice de condición corporal y las respuestas termofisiológicas a posibles infecciones bacterianas de dos especies hermanas del género *Liolaemus*, *L. kingii* y *L. sarmiento* que habitan ambientes con diferente rigurosidad climática. Los resultados obtenidos se discutieron en relación al efecto de factores bióticos y abióticos en las posibles respuestas ecofisiológicas ante un desafío inmune. Así, este estudio contribuyó a obtener una primera aproximación a la compleja interrelación entre la termorregulación, la función inmune y el ambiente. En particular, esta tesis representa un avance acerca de las limitaciones ambientales sobre la termorregulación y su influencia en las respuestas inmunes.

Ambas especies mostraron un buen estado de salud en su ambiente natural, evidenciado por la ausencia de lesiones o ectoparásitos, similar índice de condición corporal entre individuos y la capacidad para realizar una respuesta inmune innata cuando fueron inyectadas con PHA. Se observó que *L. kingii* y *L. sarmiento* presentan un perfil leucocitario similar, que se mantuvo durante el tiempo en cautiverio, caracterizado por la presencia de un mayor porcentaje de linfocitos seguido de heterófilos, mientras que los porcentajes de basófilos, eosinófilos y especialmente monocitos y azurófilos fueron comparativamente escasos.

Tanto los individuos de *L. kingii* como los individuos de *L. sarmiento* mostraron una gran diferencia entre la T_c que presentaron en el ambiente natural y la T_p obtenida en un gradiente térmico en el laboratorio, siguiendo el patrón común para la familia Liolaemidae (Ibargüengoytía et al. 2021) con T_c s entre 4 - 7 °C menores a las T_p s, consideradas óptimas para maximizar numerosos procesos fisiológicos. No obstante, presentaron la capacidad de realizar ajustes termorregulatorios para mejorar la respuesta inmune frente a una posible infección bacteriana simulada.

En este sentido, las respuestas termofisiológicas observadas en ambas especies sugieren una adaptación para responder a los desafíos inmunes de acuerdo a la disponibilidad térmica de los ambientes que habitan. Los adultos y las crías de *L. kingii* mantuvieron su T_p alta y estable frente al desafío inmune (Duran et al. 2021 en Prensa), mientras que los individuos de *L. sarmiento* desarrollaron hipotermia frente

a ese mismo desafío inmune (Duran et al. 2020) en concordancia con las características ambientales de cada especie (*L. kingii*, $T_e = 18.6\text{ °C}$ y *L. sarmientoi*, $T_e = 11.7\text{ °C}$).

La respuesta de hipotermia frente a un desafío inmune en *L. sarmientoi* resulta particularmente conveniente para las especies que viven en latitudes cercanas a los polos, como el sur de la Patagonia, donde mantener una temperatura corporal óptima representa un alto esfuerzo de termorregulación y gasto energético (Carothers 1997; Veblen et al. 2007; Stelatelli et al. 2020). La efectividad de la termorregulación en *L. sarmientoi* fue baja y coherente con un clima caracterizado por bajas temperaturas del aire, fuertes vientos y grandes fluctuaciones de temperatura diarias y estacionales (Ibargüengoytía et al. 2010; Fernández y Ibargüengoytía 2012). En cambio, *L. kingii* aunque también se comporte como un pobre o deficiente termorregulador, se distribuye en ambientes con mayor oferta térmica. Esta especie ante un desafío inmune eligió temperaturas estables y dentro del intercuartil de las T_p . En conclusión, nuestros datos muestran que el LPS afectó la termorregulación en forma diferente en los individuos de las especies *L. kingii* y *L. sarmientoi*.

En el presente estudio se destaca la relevancia de comprender la capacidad de las lagartijas para hacer frente a un desafío inmune mediante la termorregulación conductual, pero también se señala que tales demandas termorregulatorias, dependen no sólo del estado de salud o la condición corporal inicial de los individuos, sino que, para llevar a cabo una respuesta inmune eficiente, dependen también de la disponibilidad de temperaturas para la termorregulación en su ambiente natural. Los cambios ambientales causados por el impacto antropogénico, como el uso de la tierra para la producción animal o la extracción de minerales, así como el calentamiento climático, podrían desencadenar nuevas amenazas de patógenos desafiando a las poblaciones residentes y afectando en particular a las crías recién nacidas. El conocimiento de la variabilidad en las respuestas inmunes de los reptiles podría ser vital para proteger y conservar la biodiversidad.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Abdala CS, Acosta JL, Acosta JC, Álvarez BB, Arias F, Avila LJ, et al. (2012). Categorización del estado de conservación de las lagartijas y anfisbenas de la República Argentina. *Cuad. Herpetol.* 26.
- Abdala CS and Quinteros AS (2014). Los últimos 30 años de estudios de la familia de lagartijas más diversa de Argentina. Actualización taxonómica y sistemática de Liolaemidae. *Cuad. Herpetol.* 28(2), 55-82.
- Abdala CS, Laspiur A and Langstroth RP (2021). Las especies del género *Liolaemus* (Liolaemidae). Lista de taxones y comentarios sobre los cambios taxonómicos más recientes. *Cuad. Herpetol.* vol. 35.
- Adolph SC and Porter WP (1993). Temperature, activity, and lizard life histories. *Am. Nat.* 142, 273-295.
- Aguilar C, Wood Jr PL, Cusi JC, Guzman A, Huari F, Lundberg M, et al. (2013). Integrative taxonomy and preliminary assessment of species limits in the *Liolaemus walkeri* complex (Squamata, Liolaemidae) with descriptions of three new species from Peru. *ZooKeys* 364, 47-91.
- Almeida MC, Steiner AA, Branco LG and Romanovsky AA (2006). Cold-seeking behavior as a thermoregulatory strategy in systemic inflammation. *European Journal of Neuroscience* 23(12), 3359-3367.
- Amey AP and Whittier JM (2000). Seasonal patterns of plasma steroid hormones in males and females of the bearded dragon lizard, *Pogona barbata*. *General and Comparative Endocrinology* 117(3), 335-342.
- Angilletta MJ Jr (2001). Variation in metabolic rate between populations of a geographically widespread lizard. *Physiol. Biochem. Zool.* 74(1), 11-21.
- Angilletta MJ Jr, Niewiarowski PH and Navas CA (2002). The evolution of thermal physiology in ectotherms. *J. Therm. Biol.* 27, 249-268.
- Angilletta MJ Jr, Steury TD, Sears MW (2004). Temperature, growth rate, and body size in ectotherms: fitting pieces of a life-history puzzle. *Integr. Comp. Biol.* 44(6), 498-509.
- Angilletta MJ Jr, Bennett AF, Guderley H, Navas CA, Seebacher F and Wilson RS (2006). Coadaptation: a unifying principle in evolutionary thermal biology. *Physiol. Biochem. Zool.* 79, 282-294. <https://doi.org/10.1086/499990>.
- Angilletta MJ Jr (2009). *Thermal adaptation: a theoretical and empirical synthesis*. Oxford University Press, Oxford.
- Aparicio J and Ocampo M (2010). *Liolaemus* grupo montanus Etheridge, 1995 (Iguania–Liolaemidae). *Cuad. Herpetol.* 24(2), 133-135.
- Atkins E (1982). Fever: its history, cause, and function. *The Yale journal of biology and medicine.* 55(3-4), 283.
- Bakken GS (1992). Measurement and application of operative and standard operative temperatures in ecology. *Am. Zool.* 32, 194-216.
- Balon E (1990). Epigenesis of an epigeneticist: the development of some alternative concepts of the early ontogeny and evolution of fishes. *Guelph Ichthyology Reviews* 1, 1-48.
- Barr M, Glennly AT and Howie JW (1953). Active immunisation of ewes and their lambs. *J. Pathol. Bacteriol.* 65(1), 155-168.
- Beaupre S, Jacobson E, Lillywhite H and Zamudio K (2004). Guidelines for use of live amphibians and reptiles in field and laboratory research. Second Edition, Revised by the Herpetological Animal Care and Use Committee (HACC) of the American Society of Ichthyologists and Herpetologists.
- Belliure J and Carrascal LM (1998). Influence of heat transmission mode on heating rates and on the selection of patches for heating in a mediterranean lizard. *Physiol. Biochem. Zool.* 75, 369-376.
- Bennett AF (1980). The thermal dependence of behavioral performance in small lizards. *Anim. Behav.* 28, 752-762.

- Bernheim HA and Kluger MJ (1976). Fever and antipyresis in the lizard *Dipsosaurus dorsalis*. *Am. J. Physiol.* 231, 198-203.
- Beutler B (2004). Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 430(6996), 257-263.
- Bicego KC, Barros RC and Branco LG (2007). Physiology of temperature regulation: comparative aspects. *Comp. Biochem. Physiol., A: Mol. Integr. Physiol.* 147(3), 616-639.
- Blatteis CM (2003). Fever: pathological or physiological, injurious or beneficial? *J. Therm. Biol.* 28(1), 1-13.
- Boltaña S, Rey S, Roher N, Vargas R, Huerta M, Huntingford FA, Goetz FW, Moore J, Garcia-Valtanen P, Estepa A, et al. (2013). Behavioural fever is a synergic signal amplifying the innate immune response. *Proc. R. Soc. B: Biol. Sci.* 280(1766), 20131381.
- Bonadiman SF, Miranda FJ, Ribeiro MLS, Rabelo G, Lainson R, Silva EO and Damatta RA (2010). Hematological parameters of *Ameiva* (Reptilia: Teiidae) naturally infected with hemogregarine: Confirmation of monocytosis. *Vet. Parasitol.* 171, 146-150.
- Bradshaw SD and Dèath G (1991). Variation in condition indices due to climatic and seasonal factors in an Australian desert lizard, *Amphibolurus nuchalis*. *Aust. J. Zool.* 39, 373- 385.
- Breitman MF, Minoli I, Avila LJ, Medina CD, Sites JW Jr and Morando M (2014). Lagartijas de la provincia de Santa Cruz, Argentina: distribución geográfica, diversidad genética y estado de conservación. *Cuad. Herpetol.* 28, 83-110.
- Bronstein SM and Conner WE (1984). Endotoxin-induced behavioural fever in the Madagascar cockroach, *Gromphadorhina portentosa*. *J. Insect. Physiol.* 30(4), 327-330.
- Brown GP and Shine R (2016). Maternal body size influences offspring immune configuration in an oviparous snake. *Roy. Soc. Open. Sci.* 3(3), 160041.
- Brown GP and Shine R (2018). Immune configuration in hatchling snakes is affected by incubation moisture, and is linked to subsequent growth and survival in the field. *J. Exp. Biol. A.* doi: 10.1002/jez.2154.
- Burns G, Ramos A and Muchlinski A (1996). Fever response in North American snakes. *J. Herpetol.* 30, 133-139.
- Cabanac M and Laberge F (1998). Fever in goldfish is induced by pyrogens but not by handling. *Physiol. Behav.* 63, 377-379.
- Cabezas-Cartes F, Kubisch EL and Ibargüengoytía NR (2014). Consequences of volcanic ash deposition on the locomotor performance of the *Phymaturus spectabilis* lizard from Patagonia, Argentina. *J. Exp. Zool. A* 321, 164-172.
- Cabido C, Gonzalo Martínez A, López Martínez P and Martín Rueda J (2008). Poblaciones urbanas de la lagartija ibérica: Uso como bioindicador de los efectos del ambiente urbano.
- Cabido C. (2009). Evolución de las señales implicadas en los procesos de selección sexual de las lagartijas serranas ibéricas. PhD thesis, Universidad de A Coruña, A Coruña.
- Cahill AE, Aiello-Lammens ME, Fisher-Reid MC, Hua X, Karanewsky CJ, Ryu HY and Wiens JJ (2012). How does climate change cause extinction?. In *Proc. R. Soc. B* (p. rspb20121890). The Royal Society.
- Camilloni I (2007). Atlas de sensibilidad ambiental de la costa y mar argentino: http://atlas.ambiente.gov.ar/tematicas/mt_01/pdfs/ME_01_Introduccion.pdf.
- Campbell TW (1995). *Avian hematology and cytology*. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- Campbell TW (1996). *Clinical pathology. Reptile medicine and surgery* (ed. D.R. Mader), W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA, p. 248-257.
- Carothers JH, Fox SF, Marquet PA and Jaksic FM (1997). Thermal characteristics of ten Andean lizards of the genus *Liolaemus* in central Chile. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 70, 297-309.
- Carranza J and Hidalgo de Trucios J (1993). Condition-dependence and sex traits in the male great bustard. *Ethology* 94, 187-200.
- Casal AB, Camacho M, López-Jurado LF, Juste C and Orós J (2009). Comparative study of hematologic and plasma biochemical variables in eastern Atlantic juvenile and adult nesting loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Vet. Clin. Path.* 38, 213-218.
- Casterlin ME and Reynolds WW (1977a). Behavioral fever in crayfish. *Hidrobiologia* 56(2), 99-101. doi: 10.1007/BF00023345

- Casterlin ME and Reynolds WW (1977b). Behavioral fever in anuran amphibian larvae. *Life Sciences* 20(4), 593-596.
- Castillo GN, González Rivas CJ, Villavicencio Martin HJ, Acosta JC and Nava S (2015). Primer registro de infestación en un reptil por larvas de *Amblyomma parvitarsum* (Acari: Ixodidae) en Argentina. *Cuad. Herpetol.* 29 (1), 00-00.
- Castillo GN, Acosta JC and Blanco GM (2019). Trophic analysis and parasitological aspects of *Liolaemus parvus* (Iguania: Liolaemidae) in the Central Andes of Argentina. *Turkish Journal of Zoology* 43(3), 277-286.
- Ceballos De Bruno S (1995). Algunos parámetros hematológicos en *Liolaemus wiegmanni* (Sauria: Tropiduridae). *Cuad. Herpetol.* 9.
- Cei J (1986). Reptiles del centro-oeste y sur de la Argentina. Herpetofauna de las zonas áridas y semiáridas, 1st edn. Museo Regionale di Scienze Naturali, Monografía IV, Torino, Italy.
- Chandra RK and Newberne PM (1977). Nutrition, immunity and infection: mechanisms of interactions. Plenum, New York.
- Christian KA and Tracy CR (1981). The effect of the thermal environment on the ability of hatchling Galapagos Land Iguanas to avoid predation during dispersal. *Oecologia* 49, 218-223.
- Chtanova T, Schaeffer M, Han SJ, van Dooren GG, Nollmann M, Herzmark P, et al. (2008). Dynamics of neutrophil migration in lymph nodes during infection. *Immunity* 29(3), 487-496.
- Civantos E, López P and Martín J (2010). Non-lethal effects of predators on body growth and health state of juvenile lizards, *Psammotrypa algirus*. *Physiol. Behav.* 100, 332-339.
- Clulow S, Harris M and Mahony MJ (2015). Optimization, validation and efficacy of the phytohaemagglutinin inflammation assay for use in ecoimmunological studies of amphibians. *Conserv. Physiol.* 3:cov042. doi:10.1093/conphys/cov042.
- Covert JB and Reynolds WW (1977). Survival value of fever in fish. *Nature* 267(5606), 43.
- Cruz F, Belver L, Acosta JC, Villavicencio HJ, Blanco G and Cánovas MG (2009). Thermal biology of *Phymaturus* lizards: evolutionary constraints or lack of environmental variation? *Zoology* 112, 425-432.
- Cuadrado M (1998). The influence of female size on the extent and intensity of mate guarding by males in *Chamaeleo chamaeleon*. *J. Zool.* 246, 351-358.
- D'Alecy LG and Kluger MJ (1975). Avian febrile response. *J. Physiol.* 253, 223-232.
- Davis AK, Cook KC and Altizer S (2004). Leukocyte profiles in wild house finches with and without mycoplasmal conjunctivitis, a recently emerged bacterial disease. *EcoHealth* 1, 362-373.
- Davis AK, Maney DL and Maerz JC (2008). The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Funct. Ecol.* 22, 760-772.
- Davis AK, Keel MK, Ferreira A and Maerz JC (2010). Effects of chytridiomycosis on circulating white blood cell distributions of bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*). *Comp. Clin. Path.* 19, 49-55.
- Davis AK, Ruyle LE and Maerz JC (2011). Effect of trapping method on leukocyte profiles of black-chested spiny-tailed iguanas (*Ctenosaura melanosterna*): implications for zoologists in the field. *ISRN Zoology* 2011.
- Dawson WR (1975). On the physiological significance of the preferred body temperatures of reptiles. In *Perspectives of biophysical ecology* (pp. 443-473). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Deen CM and Hutchison VH (2001). Effects of lipopolysaccharide and acclimation temperature on induced behavioral fever in juvenile *Iguana iguana*. *J. Therm. Biol.* 26, 55-63.
- Demas GE (2004). The energetics of immunity: a neuroendocrine link between energy balance and immune function. *Horm. Behav.* 45, 173-180.
- do Amaral JP, Marvin GA and Hutchison VH (2002). The influence of bacterial lipopolysaccharide on the thermoregulation of the box turtle *Terrapene carolina*. *Physiol. Biochem. Zool.* 75, 273-282.
- Dobson FS and Michener GR (1995). Maternal traits and reproduction in Richardson's ground squirrels. *Ecology* 76, 851-862.
- Donoso-Barros R (1966) Reptiles de Chile. Ediciones Universidad de Chile, Santiago de Chile.

- Duran F, Kubisch EL and Boretto JM (2018). Thermal physiology of three sympatric and syntopic liolaemidae lizards in cold and arid environments of Patagonia (Argentina). *J. Comp. Physiol. B.* 188, 141-152.
- Duran F, Boretto JM, Fernández JB, Ibáñez Molina M, Medina M and Iburgüengoytía NR (2019). Impact of immunological state on eco-physiological variables in one of the southernmost lizards in the world. *An. Acad. Bras. Cienc.* 91, e20190055. doi 10.1590/0001-3765201920190055.
- Duran F, Boretto JM and Iburgüengoytía NR (2020). Decrease in preferred temperature in response to an immune challenge in lizards from cold environments in Patagonia, Argentina. *J. Therm. Biol.* 102706.
- Duran F, Boretto JM, Becker LA and Iburgüengoytía NR (2021). Effects of an immune challenge on the thermal preferences of adult and newborn *Liolaemus* lizards from Patagonia, Argentina (ACEPTADO, en prensa, *An. Acad. Bras. Cienc.*).
- Dzialowski EM (2005). Use of operative temperature and standard operative temperature models in thermal biology. *J. Therm. Biol.* 30, 317-334.
- Eliman MM (1997). Hematology and plasma chemistry of the inland bearded dragon, *Pogona vitticeps*. *Bulletin of the Association of Reptile and Amphibian Veterinarians* 7(4).
- Elliot SL, Horton CM, Blanford S and Thomas MB (2005). Impacts of fever on locust life-history traits: costs or benefits?. *Biol. Letters* 1(2), 181-184.
- Espinoza-Carniglia M, Pérez-Leiva A, Silva-de la Fuente MC, Victoriano-Sepúlveda P and Moreno-Salas L (2016). Abundancia y distribución de ácaros parásitos (*Eutrombicula araucanensis* y *Pterygosoma* sp.) en lagartijas (*Liolaemus pictus*) de Chile central. *Revista mexicana de biodiversidad* 87(1), 101-108.
- Evans SS, Repasky EA and Fisher DT (2015). Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat. *Nat. Rev. Immunol.* 15(6), 335-349.
- Eymann J, Degreef J, Häuser Ch, Monje J, Samyn Y and VandenSpiegel D (2010). Manual on field recording techniques and protocols for All Taxa Biodiversity, Inventories and Monitoring. ABC Taxa.
- Fedson DS (2018). Influenza, evolution, and the next pandemic. *Evolution, medicine, and public health* 2018(1), 260-269.
- Ferguson LV, Kortet R and Sinclair BJ (2018). Eco-immunology in the cold: the role of immunity in shaping the overwintering survival of ectotherms. *J. Exp. Biol.* 221(13).
- Fernández JB, Smith J Jr, Scolaro A and Iburgüengoytía NR (2011). Performance and thermal sensitivity of the southernmost lizards in the world, *Liolaemus sarmientoi* and *Liolaemus magellanicus*. *J. Therm. Biol.* 36, 15-22.
- Fernández J and Iburgüengoytía N (2012). Does acclimation at higher temperatures affect the locomotor performance of one of the southernmost reptiles in the world? *Acta Herpetologica* 7(2), 281-296.
- Fernández JB, Medina M, Kubisch EL, Manero AA, Scolaro JA and Iburgüengoytía NR (2015). Female reproductive biology of the lizards *Liolaemus sarmientoi* and *L. magellanicus* from the southern end of the world. *Herpetol. J.* 25, 101-108.
- Fernández JB, Kubisch EL and Iburgüengoytía NR (2017a). Viviparity advantages in the lizard *Liolaemus sarmientoi* from the end of the world. *Evol. Biol.* 1-14.
- Fernández JB, Medina M, Kubisch EL, Scolaro JA and Iburgüengoytía NR (2017b). Reproductive strategies in males of the world's southernmost lizards. *Integr. Zool.* 12, 132-147.
- Fernández JB, Bastiaans E, Medina M, De la Cruz FR, Sinervo BR and Iburgüengoytía NR (2018). Behavioral and physiological polymorphism in males of the austral lizard *Liolaemus sarmientoi*. *J. Comp. Physiol. A.* 204(2), 219-230.
- French SS and Moore MC (2008). Immune function varies with reproductive stage and context in female and male tree lizards, *Urosaurus ornatus*. *Gen. Comp. Endocr.* 155(1), 148-156.
- Frye FL (1998). Herpetological haematology. *Congreso Nacional de AVEPA*; 33, 25.
- Ganeshan K, Nikkanen J, Man K, Leong YA, Sogawa Y, Maschek JA, Ry TV, Chagwedera DN, Cox JE and Chawla A (2019). Energetic trade-offs and hypometabolic states promote disease tolerance. *Cell* 177(2), 399-413.

- Garami A, Steiner AA and Romanovsky AA (2018). Fever and hypothermia in systemic inflammation. In Handbook of clinical neurology (Vol. 157, pp. 565-597). Elsevier.
- Garrido M and Pérez-Mellado V (2013). Sprint speed is related to blood parasites, but not to ectoparasites, in an insular population of lacertid lizards. *Can. J. Zool.* 92, 67-72.
- Gillooly JF, Brown JH, West GB, Savage VM and Charnov EL (2001). Effects of size and temperature on metabolic rate. *Science* 293, 2248-2251.
- Glenny AT, Pope CG, Waddington H and Wallace U (1925). Immunological notes. I.-VII. *J. Pathol. Bacteriol.* 28(2), 333-344. doi: 10.1002/path.1700280221 .
- Goessling JM, Guyer C and Mendonça MT (2017). More than fever: thermoregulatory responses to immunological stimulation and consequences of thermoregulatory strategy on innate immunity in Gopher Tortoises (*Gopherus polyphemus*). *Physiol. Biochem. Zool.* 90(4), 484-493.
- Graae BJ, De Freene P, Kolb A, Brunet J, Chabrierie O, Verheyen K, Pepin N, Heinken T, Zobel M, Shevtsova A, Nijs I and Milbau A (2012). On the use of weather data in ecological studies along altitudinal and latitudinal gradients. *Oikos* 121, 3-19.
- Graham AL, Allen JE and Read AF (2005). Evolutionary causes and consequences of immunopathology. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36, 373-397.
- Graham AL, Shuker DM, Pollitt LC, Auld SK, Wilson AJ and Little TJ (2011). Fitness consequences of immune responses: strengthening the empirical framework for ecoimmunology. *Funct. Ecol.* 25(1), 5-17.
- Grasman KA (2002). Assessing immunological function in toxicological studies of avian wildlife. *Integr. Comp. Biol.* 42, 34-42.
- Greenwald OE (1974). Thermal dependence of striking and prey capture by gopher snakes. *Copeia* 141-148.
- Gutiérrez JA, Krenz JD and Ibarregui NR (2010). Effect of altitude on thermal responses of *Liolaemus pictus argentinus* in Argentina. *J. Thermal Biol.* 35, 332-337.
- Hallman GM, Ortega CE, Towner MC and Muchlinski AE (1990). Effects of bacterial pyrogen on three lizard species. *Comp. Biochem. Phys. A.* 96, 383-386.
- Hamstra TL and Badyaev AV (2009). Comprehensive investigation of ectoparasite community and abundance across life history stages of avian host. *J. Zool.* 278(2), 91-99.
- Heatley JJ and Russel KE (2019). Hematology. In: Divers SJ, Stahl SJ, eds. *Mader's Reptile and Amphibian Medicine and Surgery*. Third Edition. Missouri: Elsevier Health Sciences 301-318.
- Herczeg G, Herrero A, Saarikivi J, Gonda A, Jäntti M and Merilä J (2008). Experimental support for the cost-benefit model of lizard thermoregulation: the effects of predation risk and food supply. *Oecologia* 155(1), 1-10.
- Hertz PE (1992). Temperature regulation in Puerto Rican *Anolis* lizards: a field test using null hypotheses. *Ecology* 73, 1405-1417.
- Hertz PE, Huey RB and Stevenson RD (1993). Evaluating temperature regulation by field-active ectotherms: the fallacy of the inappropriate question. *Am. Nat.* 142, 796-818.
- Hidalgo A, Chilvers ER, Summers C and Koenderman L (2019). The neutrophil life cycle. *Trends in immunology*.
- Howie JW, Barr M and Glenny AT (1953). The effect of diet and of the interval between toxoid injections upon diphtheria-antitoxin levels in blackface ewes and their lambs. *J. Pathol. Bacteriol.* 65(1), 143-154.
- Huey RB (1974). Behavioral thermoregulation in lizards: importance of associated costs. *Science* 184, 1001-1003. doi:10.1126/science.184.4140.1001.
- Huey RB and Slatkin M (1976). Costs and benefits of lizard thermoregulation. *Q. Rev. Biol.* 51, 363-384. doi:10.1086/409470.
- Husak JF, Rohlf CM and Lailvaux SP (2021). Immune activation affects whole-organism performance in male but not female green anole lizards (*Anolis carolinensis*). *J. Compar. Physiol. B*, 1-11.
- Hutchison VH and Erskine DJ (1981). Thermal selection and prostaglandin E1 fever in the salamander *Necturus maculosus*. *Herpetologica* 37, 195-198.

- Hutchison VH and Dupré RK (1992). Thermoregulation. Environmental physiology of the amphibians, 206-249.
- Huyghe K, Van Oystaeyen A, Pasmans F, Tadić Z, Vanhooydonck B and Van Damme R (2010). Seasonal changes in parasite load and a cellular immune response in a colour polymorphic lizard. *Oecologia* 163(4), 867-874.
- Ibargüengoytía NR and Cussac VE (2002). Body temperatures of two viviparous *Liolaemus* lizard species, in Patagonian rain forest and steppe. *Herpetological journal* 12(3), 131-134.
- Ibargüengoytía NR, Halloy M and Crocco M (2002). El parto en el lagarto *Liolaemus kingii* (Sauria: Liolaemidae): observaciones etológicas. *Cuad. Herpetol.* 16, 129-135.
- Ibargüengoytía NR, Acosta JC, Boretto JM, Villavicencio HJ, Marinero JA and Krenz JD (2008). Field thermal biology in *Phymaturus* lizards: comparisons from the Andes to the Patagonian steppe in Argentina. *J. Arid. Environ.* 72, 1620-1630.
- Ibargüengoytía NR, Medina SM, Fernández JB, Gutiérrez JA, Tappari F and Scolaro A (2010). Thermal biology of the southernmost lizards in the world: *Liolaemus sarmientoi* and *Liolaemus magellanicus* from Patagonia, Argentina. *J. Therm. Biol.* 35, 21-27.
- Ibargüengoytía NR, Kubisch E, Cabezas Cartes F, Fernández JB, Duran F, Piantoni C, Medina M and Sinervo B (2020). Effects of acute and chronic environmental disturbances on lizards of Patagonia. In *Lizards of Patagonia. Diversity, Systematics, Biogeography and Biology of the Reptiles at the End of the World*. Eds. Morando Mariana and Ávila Luciano. Springer ISBN 978-3-030-42751-1.
- Ibargüengoytía NR, Medina M, Laspiur A, Qu YF, Peralta CAR, Sinervo B and Miles DB (2021). Looking at the past to infer into the future: Thermal traits track environmental change in Liolaemidae. *Evolution*.
- Iglesias-Carrasco M, Head ML and Cabido C (2016). Habitat dependent effects of experimental immune challenge on lizard anti-predator responses. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 70(11), 1931-1939.
- Jacobson ER (Ed.) (2007). Infectious diseases and pathology of reptiles: color atlas and text. CRC Press.
- Joachim R, Suber F and Kobzik L (2017). Characterising pre-pubertal resistance to death from endotoxemia. *Scientific reports* 7(1), 1-13.
- Juárez Heredia VI, Salva AG and Robles CI (2020). Primer registro de ectoparásitos en cinco especies de lagartijas del género *Liolaemus* (Liolaemidae) y en *Teius teyou* (Teiidae). *Cuad. Herpetol.* vol. 34.
- Kerr WR and Robertson M (1954). Passively and actively acquired antibodies for *Trichomonas foetus* in very young calves. *J. Hyg-Cambridge* 52(2), 253-263.
- Kleitman N and Satinoff E (1981). Behavioral responses to pyrogen in cold-stressed and starved newborn rabbits. *Am. J. Physiol-Reg. I.* 241(3), R167-R172.
- Kluger MJ, Ringler DH and Anver MR (1975). Fever and survival. *Science* 188(4184), 166-168. doi:10.1126/science.188.4184.166.
- Kluger MJ (1977). Fever in the frog *Hyla Cinerea*. *J. Therm. Biol.* 2, 79-81.
- Kluger MJ (1979). Fever in ectotherms: evolutionary implications. *Am. Zool.* 19(1), 295-304.
- Kluger MJ (1986). Is fever beneficial?. *The Yale journal of biology and medicine* 59(2), 89.
- Kluger MJ, Kozak W, Conn CA, Leon LR and Soszynski D (1998). Role of fever in disease. *Ann. Ny. Acad. Sci.* 856(1), 224-233.
- Kubisch EL, Fernández JB and Ibargüengoytía NR (2011). Is locomotor performance optimised at preferred body temperature? A study of *Liolaemus pictus argentinus* from northern Patagonia, Argentina. *J. Therm. Biol.* 36, 328-333.
- Labra A, Pienaar J and Hansen TF (2009). Evolution of thermal physiology in *Liolaemus* lizards: adaptation, phylogenetic inertia, and niche tracking. *Am. Nat.* 174(2), 204-220.
- Laburn HP, Mitchell D, Kenedi E and Louw GN (1981). Pyrogens fail to produce fever in a cordylid lizard. *Am. J. Physiol-Reg. I.* 241(3), R198-R202.
- Lang JW (1987). Crocodylian thermal selection. *Wildlife management: crocodiles and alligators*, 301, 317.

- Leary S, Underwood W, Anthony R, Corey D, Grandin T, Gwaltney-Brant S, et al. (2016). AVMA guidelines for the humane slaughter of animals: 2016 edition. Association AVMA, editor.: AVMA, 64.
- Lee KA (2006) Linking immune defenses and life history at the levels of the individual and the species. *Integr. Comp. Biol.* 46, 1000-1015. <https://doi.org/10.1093/icb/icl049>
- Legendre P (2015). lmodel2: Model II Regression. R package version 1.7-2. URL: <https://cran.rproject.org/web/packages/lmodel2/index.html/>
- Liu E, Lewis K, Al-Saffar H, Krall CM, Singh A, Kulchitsky VA, et al. (2012). Naturally occurring hypothermia is more advantageous than fever in severe forms of lipopolysaccharide-and *Escherichia coli*-induced systemic inflammation. *Am. J. Physiol-Reg. I.* 302(12), R1372-R1383.
- López P, Gabirot M and Martín J (2009). Immune activation affects chemical sexual ornaments of male Iberian wall lizards. *Naturwissenschaften* 96(1), 65-69.
- Maceda-Veiga A, Figuerola J, Martínez-Silvestre A, Viscor G, Ferrari N and Pacheco M (2015). Inside the Redbox: applications of haematology in wildlife monitoring and ecosystem health assessment. *Science of the Total Environment* 514, 322-332.
- Main AR and Bull CM (2000). The impact of tick parasites on the behaviour of the lizard *Tiliqua rugosa*. *Oecologia* 122, 574-581.
- Maloney SK y Gray DA (1998). Characteristics of the febrile response in Pekin ducks. *J. Comp. Physiol. B.* 168, 177-182.
- Martin LB, Han P, Lewittes J, Kuhlman JR, Klasing KC and Wikelski M (2006). Phytohemagglutinin-induced skin swelling in birds: histological support for a classic immunoecological technique. *Funct. Ecol.* 20(2), 290-299.
- Martínez-Silvestre A, Lavín S and Cuenca R (2011). Hematología y citología sanguínea en reptiles. *Clínica veterinaria de pequeños animales: revista oficial de AVEPA, Asociación Veterinaria Española de Especialistas en Pequeños Animales* 31(3).
- McCallum H and Dobson A (1995). Detecting disease and parasite threats to endangered species and ecosystems. *Trends. Ecol. Evol.* 10(5), 190-194.
- Medina M, Scolaro A, Méndez-de la Cruz F, Sinervo B and Ibarquengoytía N (2011). Thermal relationships between body temperature and environment conditions set upper distributional limits on oviparous species. *J. Therm. Biol.* 36, 527-534.
- Medzhitov R, Schneider DS and Soares MP (2012). Disease tolerance as a defense strategy. *Science* 335(6071), 936-941.
- Megía-Palma R, Martínez J, Paranjpe D, D'Amico V, Aguilar R, Palacios MG, et al. (2017). Phylogenetic analyses reveal that Schellackia parasites (Apicomplexa) detected in American lizards are closely related to the genus *Lankesterella*: is the range of Schellackia restricted to the Old World?. *Parasites & vectors* 10(1), 1-10.
- Megía-Palma R, Paranjpe D, Blaimont P, Cooper R and Sinervo B (2020). To cool or not to cool? Intestinal coccidians disrupt the behavioral hypothermia of lizards in response to tick infestation. *Ticks and tick-borne diseases* 11(1), 101275.
- Merchant M, Williams S, Troscclair PL, Elsey RM and Mills K (2007). Febrile response to infection in the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comp. Biochem. Phys. A.* 148(4), 921-925.
- Merchant M, Fleury L, Rutherford R and Paulissen M (2008). Effects of bacterial lipopolysaccharide on thermoregulation in green anole lizards (*Anolis carolinensis*). *Vet. Immunol. Immunop.* 125(1-2), 176-181.
- Merlo JL, Cutrera AP and Zenuto RR (2014). Inflammation in response to phytohemagglutinin injection in the Talas tuco-tuco (*Ctenomys talarum*): implications for the estimation of immunocompetence in natural populations of wild rodents. *Can. J. Zool.* 92(8), 689-697.
- Miles DB (2004). The race goes to the swift: fitness consequences of variation in sprint performance in juvenile lizards. *Evolutionary Ecology Research* 6(1), 63-75.
- Monagas WR and Gatten RE Jr. (1983). Behavioural fever in the turtles *Terrapene carolina* and *Chrysemys picta*. *J. Therm. Biol.* 8, 285-288.

- Moreno-Azócar DL, Vanhooydonck B, Bonino MF, Perotti MG, Abdala CS, Schulte JA and Cruz FB (2013). Chasing the Patagonian sun: comparative thermal biology of *Liolaemus* lizards. *Oecologia* 171, 773-788.
- Muchlinski AE (1985). The energetic cost of the fever response in three species of ectothermic vertebrates. *Comp. Biochem. Phys. A* 81(3), 577-579.
- Muchlinski AE, Stouutenburgh J and Hogen JM (1989). Fever response in laboratory maintained and free ranging chuck-wallars (*Sauromalus obesus*). *Am. J. Physiol-Reg. I.* 257, R150-R155.
- Muchlinski AE, Estany A and Don MT (1995). The response of *Anolis equestris* and *Oplurus cyclurus* (Reptilia: Iguanidae) to bacterial endotoxin. *J. Therm. Biol.* 20(4), 315-320.
- Muñoz-Leal S, Tarragona EL, Martins TF, Martín CM, Burgos-Gallardo F, Nava S, et al. (2016). *Liolaemus* lizards (Squamata: Liolaemidae) as hosts for the nymph of *Amblyomma parvitarsum* (Acari: Ixodidae), with notes on Rickettsia infection. *Experimental and Applied Acarology* 70(2), 253-259.
- Naldo JL, Libanan NL and Samour JH (2009). Health assessment of a spiny-tailed lizard (*Uromastyx spp.*) population in Abu Dhabi, United Arab Emirates. *J. Zoo. Wildlife Med.* 40, 445-452.
- Ng LG, Qin JS, Roediger B, Wang Y, Jain R, Cavanagh LL, et al. (2011). Visualizing the neutrophil response to sterile tissue injury in mouse dermis reveals a three-phase cascade of events. *J. Invest. Dermatol.* 131(10), 2058-2068.
- Nourshargh S and Alon R (2014). Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity* 41(5), 694-707.
- Nunn CL, Gittleman JL and Antonovics J (2003). A comparative study of white blood cell counts and disease risk in carnivores. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 270, 347-356.
- Oliva G, González L, Rial P and Livraghi E (2001). Áreas ecológicas de Santa Cruz y Tierra del Fuego, in: Borelli P, Oliva G (Eds), Ganadería ovina sustentable en la Patagonia Austral: tecnología de Manejo Extensivo, pp. 41-82. INTA, EEA Santa Cruz.
- Opliger A, Celerier ML and Clobert J (1996). Physiological and behaviour changes in common lizards parasitized by haemogregarines. *Parasitology* 113, 433-438.
- Ortega CE, Stranc DS, Casal MP, Hallman GM and Muchlinski AE (1991). A positive fever response in *Agama agama* and *Sceloporus orcutti* (Reptilia: Agamidae and Iguanidae). *J. Comp. Physiol. B.* 161, 377-381.
- Paranjpe DA, Medina D, Nielsen E, Cooper RD, Paranjpe SA and Sinervo B (2014). Does thermal ecology influence dynamics of side-blotched lizards and their micro-parasites?. *Am. Zool.* 54(2), 108-117.
- Paruelo JM, Beltran A, Jobbagy E, Sala OE and Golluscio RA (1998). The climate of Patagonia: general patterns and controls on biotic. *Ecol. Austral.* 8, 85-101.
- Peig J and Green AJ (2009). New perspectives for estimating body condition from mass/length data: the scaled mass index as an alternative method. *Oikos* 118, 1883-1891.
- Peig J and Green AJ (2010). The paradigm of body condition: a critical reappraisal of current methods based on mass and length. *Funct. Ecol.* 24, 1323-1332.
- Peterson AM, Gleeson TT and Scholnick DA (2003). The effects of oxygen and adenosine on lizard thermoregulation. *Physiol. Biochem. Zool.* 76, 339-347
- Perpiñán D, Hernandez-Divers SM, Latimer KS, Akre T, Hagen C, Buhlmann KA and Hernandez-Divers SJ (2008). Hematology of the pascagoula map turtle (*Graptemys gibbonsi*) and the southeast asian box turtle (*Cuora amboinensis*). *J. Zoo. Wildlife. Med.* 39, 460-463.
- Piantoni C, Navas CA and Ibarguengoytia NR (2016). Vulnerability to climate warming of four genera of New World iguanians based on their thermal ecology. *Anim. Conserv.* 19, 391-400.
- Plasman M, McCue MD, Reynoso VH, Terblanche JS, Clusella-Trullas S (2019). Environmental temperature alters the overall digestive energetics and differentially affects dietary protein and lipid use in a lizard. *J. Exp. Biol.* 222(6), jeb194480.

- Ponsen S, Talabmook C, Narkkong N and Aengwanich W (2008). Blood cell characteristics and some hematological values of sand lizards (*Leiolepis belliana rubritaeniata* Mertens 1961) in Northeastern Thailand. *Inter. J. Zool. Res* 4, 119-123.
- R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org/>
- R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria URL <https://www.Rproject.org/>
- Rakus K, Ronsmans M and Vanderplasschen A (2017). Behavioral fever in ectothermic vertebrates. *Dev. Comp. Immunol.* 66, 84-91.
- Ramón-Romero F and Farías JM (2014). Fever. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 57(4), 20-33.
- Ramos AB, Don MT and Muchlinski AE (1993). The effect of bacteria infection on mean selected body temperature in the common Agama, *agama agama*: a dose-response study. *Comp. Biochem. Physiol. Comp. Physiol.* 105(3), 479-484.
- Raskin RE (2000). Reptilian complete blood count. *Laboratory Medicine: Avian and exotic pets.* WB Saunders, Philadelphia. 486p, 193-204.
- Reynolds WW, Casterlin ME and Covert JB (1976). Behavioural fever in teleost fishes. *Nature* 259(5538), 41-42.
- Reynolds WW, Covert JB and Casterlin ME (1978). Febrile responses of goldfish *Carassius auratus* (L.) to *Aeromonas hydrophila* and to *Escherichia coli* endotoxin. *J. Fish Dis.* 1(3), 271-273.
- Roitt I, Brostoff J and Male D (1996). *Immunology.* Mosby, London.
- Romanovsky AA and Székely M (1998). Fever and hypothermia: Two adaptive thermoregulatory responses to systemic inflammation. *Med. Hypotheses* 50, 219-226.
- Romanovsky AA, Almeida MC, Aronoff DM, Ivanov AI, Konsman JP, Steiner AA and Turek VF (2005). Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions. *Front. Biosci.* 10(10), 2193-2216.
- Rossini M, García G, Rojas J and Zerpa H (2011). Hematologic and serum biochemical reference values for the wild spectacled caiman, *Caiman crocodilus crocodilus*, from the Venezuelan plains. *Vet. Clin. Path.* 40, 374-379.
- Rothenberg ME and Hogan SP (2006). The eosinophil. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 147-174.
- Ryan MP, Neuman-Lee LA, Durham SL, Smith GD and French SS (2018). A sex-dependent change in behavioral temperature regulation in African house snakes (*Lamprophis fuliginosus*) challenged with different pathogens. *J. Therm. Biol.* 73, 8-13.
- Sacchi R, Scali S, Cavirani V, Pupin F, Pellitteri-Rosa D and Zuffi MAL (2011). Leukocyte differential counts and morphology from twelve European lizards. *Ital. J. Zool.* 78, 418-426.
- Saint Girons MC (1970). Morphology of the circulating blood cells. *Biology of the Reptilia* 3(2), 73-92.
- Salakij C, Salakij J, Apibal S, Narkkong NA, Chanhom L and Rochanapat N (2002). Hematology, morphology, cytochemical staining, and ultrastructural characteristics of blood cells in king cobras (*Ophiophagus hannah*). *Vet. Clin. Path.* 31, 116-126.
- Sandmeier FC, Horn KR and Tracy CR (2016). Temperature-independent, seasonal fluctuations in immune function of the Mojave Desert Tortoise (*Gopherus agassizii*). *Can. J. Zool.* 94(8), 583-590.
- Satinoff E, McEwen GN and Williams BA (1976). Behavioral fever in newborn rabbits. *Science* 193(4258), 1139-1140. doi:10.1126/science.959829.
- Schall JJ, Bennett AF and Putnam RW (1982). Lizards infected with malaria: physiological and behavioral consequences. *Science* 217, 1057-1059.
- Schall JJ (1990). Virulence of lizard malaria: the evolutionary ecology of an ancient parasite-host association. In: Keymer AE, Reed AF (eds) *The Evolutionary Biology of Parasitism.* Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK, pp 35-52.
- Schmid-Hempel P (2011). *Evolutionary Parasitology: The integrated study of infections, immunology, ecology, and genetics* (Oxford Univ Press, Oxford), pp xviii, 516 pp.

- Schulte JA, Macey RJ, Espinoza RE and Larson A (2000). Phylogenetic relationships in the iguanid lizard genus *Liolaemus*: multiple origins of viviparous reproduction and evidence for recurring Andean vicariance and dispersal. *Biol. J. Linn. Soc.* 69(1), 75-102.
- Scolaro JA and Cei JM (1997). Systematic status and relationships of *Liolaemus* species of the archeformis and kingii groups: a morphological and taxonumerical approach (Reptilia: Tropiduridae). *Bollettino-Museo Regionale Di Scienze Naturali* 15, 369-406.
- Scolaro JA (2005). Reptiles Patagónicos Sur: una guía de campo. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Trelew.
- Sears MW and Angilletta MJ Jr (2015). Costs and benefits of thermoregulation revisited: both the heterogeneity and spatial structure of temperature drive energetic costs. *The American Naturalist* 185(4), E94-E102.
- Seebacher F and Franklin CE (2005). Physiological mechanisms of thermoregulation in reptiles: a review. *J. Comp. Physiol. B* 175, 533-541.
- Sherman E, Baldwin L, Fernández G and Deurell E (1991). Fever and thermal tolerance in the toad *Bufo marinus*. *J. Therm. Biol.* 16, 297-301.
- Sherman, E. and Stephens, A. (1998). Fever and metabolic rate in the toad *Bufo marinus*. *J. Therm. Biol.* 23, 49-52.
- Shine R (1995). A new hypothesis for the evolution of viviparity in reptiles. *Am. Nat.* 145(5), 809-823.
- Shine R (2004). Does viviparity evolve in cold climate reptiles because pregnant females maintain stable (not high) body temperatures? *Evolution* 58, 1809-1818.
- Silvestre AM (2014). How to assess stress in reptiles. *Journal of Exotic Pet Medicine* 23(3), 240-243.
- Sinervo B and Huey RB (1990). Allometric engineering: an experimental test of the causes of interpopulational differences in performance. *Science* 248, 4.
- Sinervo B, Miles DB, Frankino WA, Klukowski M and Denardo DF (2000). Testosterone, endurance, and darwinian fitness: natural and sexual selection on the physiological bases of alternative male behaviors in side-blotched lizards. *Horm. Behav.* 38, 222-233.
- Skovgaard N, Galli G, Abe A, Taylor EW and Wang T (2005). The role of nitric oxide in regulation of the cardiovascular system in reptiles. *Comp. Biochem. Phys. A.* 142(2), 205-214.
- Smith GR and Ballinger RE (2001). The ecological consequences of habitat and microhabitat use in lizards: a review. *Contemporary Herpetology* 3, 1-37.
- Smith GD and French SS (2017). Physiological trade-offs in lizards: costs for individuals and populations. *Integr. Comp. Biol.* 57(2), 344-351.
- Smits JE, Bortolotti GR and Tella JL (1999). Simplifying the phytohaemagglutinin skin-testing technique in studies of avian immunocompetence. *Funct. Ecol.* 13, 567-572.
- Sokal RR and Rohlf FJ (1969). *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*, p. 776.
- Soto J and Vázquez M (2001). Las condiciones climáticas de la provincia de Santa Cruz. In: Soto J and Vázquez M (Eds), *El gran libro de la provincia de Santa Cruz*. Ed. Oriente-Alfa Centro literario. Madrid, p. 651.
- Stacy BA and Whitaker N (2000). Hematology and blood biochemistry of captive mugger crocodiles (*Crocodylus palustris*). *J. Zoo. Wildlife Med.* 31, 339-347.
- Stacy NI, Alleman AR and Sayler KA (2011). Diagnostic hematology of reptiles. *Clin. Lab. Med.* 31, 87-108.
- Stahlschmidt ZR and Adamo SA (2013). Context dependency and generality of fever in insects. *Naturwissenschaften* 100, 691-696.
- Stellatelli OA, Vega LE, Block C, Rocca C, Bellagamba PJ and Cruz FB (2020). Latitudinal comparison of the thermal biology in the endemic lizard *Liolaemus multimaculatus*. *J. Therm. Biol.* 88, 102485.
- Stitt J (1973). Prostaglandin E1 fever induced in rabbits. *J. Physiol.* 232, 163-179.
- Svensson E, Sinervo B and Comendant T (2001). Density dependent competition and selection on immune function in genetic lizard morphs. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 12561-12565.

- Sykes JM and Klaphake E (2008) Reptile hematology. *N. Am. Exotic Animal Practice* 11, 481-500.
- Sykes JM and Klaphake E (2015). Reptile hematology. *Clinics in Laboratory Medicine* 35(3), 661-680.
- Todd G, Jodrey A and Stahlschmidt Z (2016). Immune activation influences the trade-off between thermoregulation and shelter use. *Anim. Behav.* 118, 27-32.
- Tomašević N, Cvetković D, Aleksić I and Crnobrnja-Isailović J (2007). Effect of climatic conditions on posthibernation body condition and reproductive traits of *Bufo bufo* females. *Arch. Biol. Sci. Belg.* 59, 51-52.
- Troiano JC (2013). Colecta de muestras sanguíneas en reptiles. En *Memorias de la Conferencia Interna en Medicina y Aprovechamiento de Fauna Silvestre, Exótica y no Convencional*. p. 68-72.
- Uller T, Isaksson C and Olsson M (2006). Immune challenge reduces reproductive output and growth in a lizard. *Funct. Ecol.* 20(5), 873-879.
- Underwood W and Anthony R (2020). AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2020 edition. Retrieved on March, 2013(30), 2020-2021.
- Urison NT, Goelst K and Buffenstein RA (1993). A positive fever response by a poikilothermic mammal, the naked mole rat (*Heterocephalus glaber*). *J. Therm. Biol.* 18, 315-320.
- Vaughn LK, Bernheim HA and Kluger MJ (1974). Fever in the lizard *Dipsosaurus dorsalis*. *Nature* 252(5483), 473.
- Veblen TT, Young KR and Orme AR (2007). *The physical geography of South America*. Oxford University Press, Oxford.
- Vicenzi N, Ibargüengoytia N and Corbalán V (2019). Activity patterns and thermoregulatory behavior of the viviparous lizard *Phymaturus palluma* in Aconcagua Provincial Park, Argentine Andes. *Herpetol. Conserv. Bio.* 14(2), 337-348.
- Viney ME, Riley EM and Buchanan KL (2005). Optimal immune responses: Immunocompetence revisited. *Trends Ecol. Evol.* 20, 665-669.
- Vinkler M, Schnitzer J, Munclinger P, Votýpka J and Albrecht T (2010). Haematological health assessment in a passerine with extremely high proportion of basophils in peripheral blood. *Journal of Ornithology* 151, 841-849.
- Wakelin D and Apanius V (1997). Immune defence: genetic control. In: Clayton DH, Moore J. editors. *Host-parasite evolution: General principles and avian models*. Oxford, Oxford University Press. p. 30-58.
- Wang Z, Lu HL, Ma L and Ji X (2014). Viviparity in high-altitude *Phrynocephalus* lizards is adaptive because embryos cannot fully develop without maternal thermoregulation. *Oecologia* 174(3), 639-649.
- Wright RK and Cooper EL (1981). Temperature effects on ectotherm immune responses. *Developmental & Comparative Immunology* 5, 117-122.
- Zamora-Camacho FJ, Reguera S, Rubiño-Hispán MV and Moreno-Rueda G (2015). Eliciting an immune response reduces sprint speed in a lizard. *Behav. Ecol.* 26(1), 115-120.
- Zamora-Camacho FJ, Reguera S and Moreno-Rueda G (2016). Elevational variation in body-temperature response to immune challenge in a lizard. *PeerJ* 4, e1972.
- Zamora-Camacho FJ and Comas M (2018). Early swelling response to phytohemagglutinin is lower in older toads. *PeerJ*, 6, e6104.
- Zeisberger E (1999). From humoral fever to neuroimmunological control of fever. *J. Therm. Biol.* 24, 287-326.
- Zimmerman LM, Vogel LA and Bowden RM (2010). Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective. *J. Exp. Biol.* 213, 661-67.
- Zimmerman LM, Carter AW, Bowden RM and Vogel LA (2017). Immunocompetence in a long-lived ectothermic vertebrate is temperature dependent but shows no decline in older adults. *Funct. Ecol.* 31(7), 1383-1389.
- Zimmerman LM (2020). The reptilian perspective on vertebrate immunity: 10 years of progress. *Journal of Experimental Biology* 223(21), jeb214171.
- Zurovsky Y, Mitchell D and Laburn H (1987). Pyrogens fail to produce fever in the leopard tortoise *Geochelone pardalis*. *Comp. Biochem. Phys. A.* 87(2), 467-469.

AGRADECIMIENTOS

Aunque los que me conocen saben que soy de pocas palabras, quisiera usar este espacio para agradecer con mucho cariño a todos los que me han acompañado en todo momento y que me han apoyado siempre en este largo camino de momentos muy buenos, buenos y no tan buenos.

Mi mamá Marcela y mi papá Horacio, mis hermanas Verónica y Alejandra, mis sobrinos Agus y Nico, mis cuñados Mauro y Toni, mis abuelas, mis tíos y toda mi familia, por siempre interesarse y acompañarme en lo que hacía y especialmente incentivarme para que siempre siga adelante con lo que me gustaba hacer, mi vocación.

A mi Directora Nora, por darme una oportunidad y confiar en mí para la realización de esta tesis, por incentivarme, ayudarme, brindarme su experiencia y contribuir en mi formación, y a mi Co-Directora Jorgelina por ayudarme en mis inicios y también, por darme una oportunidad para desarrollar esta tesis, por compartir sus conocimientos y siempre darme una mano en lo que necesitara. A ambas les quería agradecer por el tiempo que me dedicaron y el compromiso que tuvieron conmigo y con esta tesis.

A todo el grupo del Laboratorio por el apoyo y principalmente por ser buenas personas, por su compañía y por incluirme muy rápidamente al grupo, aunque ninguno me conociera (desde el primer día me sentí muy cómodo). También por ayudarme con todas mis dudas iniciales y compartir sus conocimientos y experiencias de trabajo de oficina, trabajo de laboratorio y trabajo de campo (lo más lindo de la profesión). Por todo eso quiero agradecerles a Facu, Jime, Nico, Eri, Marlin, Ale, Maru, Nadia, Mora y Leandro por tantos buenos momentos.

A mis amigos de la Facultad, un excelente grupo, que siempre estuvieron y están, cerca o a distancia, compartiendo y dando una mano en lo que sea durante mi carrera.

A mis amigos de la vida, que me han preguntado más de una vez que hacía, de que trabajaba y porque estudiaba las lagartijas, pero siempre me acompañaron con buena onda. También quería agradecerle a Virginia, por apoyarme y acompañarme en gran parte de este proceso.

Por último, agradezco al FONCyT y al CONICET por otorgarme las becas para poder llevar a cabo el Doctorado y hacer posible la ejecución de esta investigación, y al Instituto INIBIOMA y a la Universidad del Comahue por darme un espacio como lugar de trabajo y la posibilidad de poder desarrollar la Tesis Doctoral con normalidad.

PUBLICACIONES

Con los resultados que se desprenden de esta Tesis se han publicado un total de 3 artículos. Dos artículos se publicaron en la revista científica “Anais Da Academia Brasileira De Ciencias” y el restante en la revista científica “Journal of Thermal Biology”. El primer artículo se titula “Impact of immunological state on eco-physiological variables in one of the southernmost lizards in the world” y corresponde al Capítulo 1 de la Tesis Doctoral. El segundo artículo se titula “Decrease of thermal preference in response to an immune challenge in lizards from cold environments in Patagonia, Argentina” y el tercero se titula “Effects of an immune challenge on the thermal preferences of adult and newborn *Liolaemus* lizards from Patagonia, Argentina”. Tanto el artículo 2, como el artículo 3 corresponden a lo presentado en los Capítulos 2, 3 y 4 de la Tesis Doctoral.

Citas:

- **Duran F**, Boretto JM, Fernández JB, Ibáñez Molina M, Medina MS and Ibarquengoytía NR (2019). Impact of immunological state on eco-physiological variables in one of the southernmost lizards in the world. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 91(4), e20190055. Epub November 25, 2019. <https://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201920190055>
- **Duran F**, Boretto JM and Ibarquengoytía NR (2020). Decrease in preferred temperature in response to an immune challenge in lizards from cold environments in Patagonia, Argentina. J. Therm. Biol. 102706. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102706>
- **Duran F**, Boretto JM, Becker LA and Ibarquengoytía NR (2021). Effects of an immune challenge on the thermal preferences of adult and newborn *Liolaemus* lizards from Patagonia, Argentina (ACEPTADO, en prensa, Anais da Academia Brasileira de Ciências).



Anais da Academia Brasileira de Ciências (2019) 91(4): e20190055
 (Annals of the Brazilian Academy of Sciences)
 Printed version ISSN 0001-3765 / Online version ISSN 1678-2690
<http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201920190055>
www.scielo.br/aabc | www.fb.com/aabcjournal

Impact of immunological state on eco-physiological variables in one of the southernmost lizards in the world

FERNANDO DURAN¹, JORGELINA M. BORETTO¹, JIMENA B. FERNÁNDEZ¹, MORA
IBÁÑEZ MOLINA², MARLIN S. MEDINA³ and NORA R. IBARGÜENGOYTÍA¹

¹Laboratorio de Eco-fisiología e Historia de Vida de Reptiles, INIBIOMA, CONICET, Universidad Nacional del Comahue, Quintral 1250, 8400 San Carlos de Bariloche, Rio Negro, Argentina

²Laboratorio de Histología Animal y Vegetal, INIBIOMA, CONICET, Universidad Nacional del Comahue, Quintral 1250, 8400 San Carlos de Bariloche, Rio Negro, Argentina

³CIEMEP-CONICET, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, 9200, Esquel, Chubut, Argentina

Manuscript received on January 16, 2019; accepted for publication on March 30, 2019

How to cite: DURAN F, BORETTO JM, FERNÁNDEZ JB, IBÁÑEZ MOLINA M, MEDINA MS AND IBARGÜENGOYTÍA NR. 2019. Impact of immunological state on eco-physiological variables in one of the southernmost lizards in the world. *An Acad Bras Cienc* 91: e20190055. DOI 10.1590/0001-3765201920190055.

Abstract: The immune state is an essential component of survival as it directly influences physiological performance and health status. Variation in the leukocyte profile, a significantly increase in body temperature, and a detriment of the eco-physiological performance are among the possible consequences of an unhealthy state. In this study we analyse and discuss how field body temperature, preferred body temperature, the speed for sprint and long runs, locomotor stamina, and body condition can be affected by the immunological state (i.e. leukocyte profile) in a wild population of *Liolaemus sarmientoi*. Juveniles and adult males with a high percentage of eosinophils, basophils, and a low percentage of monocytes preferred higher body temperatures in a thermal gradient, while pregnant females maintained thermal preferences independently of leukocyte profile. Although juveniles with a high percentage of heterophils showed less locomotor stamina, adult males and pregnant females showed no differences in locomotor performance in relation to leukocyte profile. This study represents a starting point in eco-immunology of a wild lizard population of *Liolaemus* in cold and temperate environments of Patagonia where the southward shift in the geographic ranges of pathogen populations due to global warming represents a threat to resident host populations.

Key words: body condition, leukocyte profile, *Liolaemus sarmientoi*, locomotor performance, thermoregulation.

INTRODUCTION

The interplay between immune system responses and phenotypic plasticity of physiological performance related with fitness defines the

resilience of populations (Graham et al. 2011). The immune response depends on several factors such as the type of pathogens, the body condition, and body temperature of the host (Zimmerman et al. 2010). Non-specific defence components, such as leukocyte mobility, lymphocyte transformation, and the effects of interferon, are optimized at high body temperature (T_b ; Kluger et al. 1975, 1998,

Correspondence to: Fernando Duran
 E-mail: fernandoduran@comahue-conicet.gob.ar
 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7256-1478>



Zimmerman et al. 2010). A diversity of vertebrates enhance the immune system's capacity by changes in body temperature (Rakus et al. 2017). Even ectotherms, that depend on external heat sources, modify their T_b (Bernheim and Kluger 1976, Kluger 1977, 1979) mitigating or neutralizing an infection (Hallman et al. 1990, Deen and Hutchison 2001, do Amaral et al. 2002, Merchant et al. 2008). Vertebrate ectotherms and mainly Lepidosaurs can use behavioural and physiological thermoregulation mechanisms to modify T_b and optimize physiological performance within a limited range of temperatures (T_p ; Carothers et al. 1997, Ibarquengoytia et al. 2010, Fernández et al. 2011). The elevation of body temperature via behavioural thermoregulation in response to bacterial infections has been described in turtles (Monagas and Gatten 1983), crocodiles (Merchant et al. 2007), snakes (Burns et al. 1996) and lizards (Muchlinski et al. 1989, Ortega et al. 1991).

Although immune function may benefit from modified body temperature, in ectotherms the energetic costs of immune responses and other physiological demands, such as reproductive output, and ultimately fitness, result in a balance between the benefits accrued from the control of body temperature and the costs of thermoregulation (Hallman et al. 1990, Ortega et al. 1991, Merchant et al. 2008). In many cases, when individuals allocate resources to immune processes, they may suffer a general decrease in body condition (amount of energetic reserves stored as fat; Peig and Green 2009, 2010) affecting overall performance and the individual's interactions with environment. Locomotor performance is one of the most relevant eco-physiological variables since it affects the ability to disperse, to forage, to socialize and to evade predators (Greenwald 1974, Bennett 1980, Christian and Tracy 1981). Thus a decrease in speed for sprint and long runs, and stamina could negatively affect individual fitness, and ultimately, survival (Schall et al. 1982,

Oppliger et al. 1996, Garrido and Pérez-Mellado 2013, Zamora-Camacho et al. 2014). During an infection, the activity of the immune system is costly in terms of the re-allocation of energetic reserves as well as specific resources, such as proteins and amino acids (Schmid-Hempel 2011). The allocation of energetic reserves to the immune response reduces the availability of energy for other functions, such as reproduction, particularly embryonic development in pregnant females (Wang et al. 2014). For example, in *Urosaurus ornatus* wound healing was approximately 30% slower during the energetically taxing period of vitellogenesis (French and Moore 2008). Hence, there is a range of costly consequences impacting behavioural and eco-physiological performance in ectotherms whose avoidance is determined not only by immune system responses, but also by thermoregulatory efficiency (Deen and Hutchison 2001, Zamora-Camacho et al. 2016).

The immune system includes a series of white blood cells (leukocytes) that recognize foreign agents or pathogens and respond by phagocytosis (cellular response), antibodies (humoral response), and oxidizing agents or lysozymes (Wakelin and Apanius 1997, Zimmerman et al. 2010). In this regard, blood tissue can be assayed to provide valuable information and diagnoses on the general health of the animals (leukocyte profile and haematological values such as haematocrit, total counts of erythrocytes and haemoglobin), as well as clear signs of pathology such as blood parasites (Sykes and Klaphake 2008, Stacy et al. 2011). Some of the leukocytes present in blood tissue are important components of the innate or non-specific immune system and are the first line of defence against a foreign agent (Zimmerman et al. 2010).

The immunological function of leukocytes, although varying among taxa, is similar in most vertebrates (Davis et al. 2008). It is known that in most organisms, a high concentration of stress hormones (glucocorticoid hormones, such as

corticosterone) alters the number of leukocytes in circulation, increasing the number of heterophils and decreasing lymphocytes (Davis et al. 2008). In consequence, the heterophil:lymphocyte ratio (H:L) is frequently used as a proxy measure of stress. Additionally, an infection causes an increase in the number of circulating heterophils, which are the first phagocytic cells to attack and absorb particles and foreign organisms (Davis et al. 2004, 2010). In the different avian and non-avian reptiles, the heterophils are considered equivalent to mammalian neutrophils because they exhibit the same immune function (Stacy et al. 2011). The eosinophils are associated with parasitic infections and modulate the immune response by the secretion of chemicals that promote phagocytosis, although the number in circulation is typically low (Rothenberg and Hogan 2006). Basophils are involved in inflammation and, when they are activated by an antigen, they degranulate and release histamine (Campbell 1995). Meanwhile, lymphocytes are related to a variety of immunological functions such as immunoglobulin production and modulation of immune defence (Campbell 1996). Monocytes are also phagocytic and may increase in circulation during infections (Davis et al. 2004, Bonadiman et al. 2010). Finally, azurophils are a type of leukocyte found mainly in squamata that increase during infections and protozoal blood parasitism (Salakij et al. 2002, Stacy et al. 2011).

The genus *Liolaemus* is the most diversified genus of the family Liolaemidae and has broad latitudinal and altitudinal distribution, extending from the Andes of Peru to Tierra del Fuego in Argentina and Chile (from 10°S to 54° 30'S), and from sea level to more than 5000 m above sea level (m asl; Schulte et al. 2000, Aparicio and Ocampo 2010, Aguilar et al. 2013). This genus shows a wide variety of physiological responses that accommodates the diversity of climates and environments they inhabit (Ibargüengoytía et al. 2008, Cruz et al. 2009, Medina et al. 2011, Corbalán

et al. 2013, Moreno-Azócar et al. 2013). However, there are few studies of the immune system in liolaemids (Ceballos de Bruno 1995) and there are not previous studies about eco-immunology in the genus. *Liolaemus sarmiento* is a medium-sized lizard (mean snout-vent length, SVL_{females}: 76.90 ± 1.21 mm; SVL_{males}: 76.82 ± 2.02 mm; Ibargüengoytía et al. 2010), viviparous, omnivorous, and saxicolous (Ceï 1986, Scolaro and Ceï 1997). They inhabit the central and southern regions of Santa Cruz province, Argentina, reaching the Strait of Magellan at the South (Breitman et al. 2014). *Liolaemus sarmiento*, together with the sympatric *Liolaemus magellanicus*, are the southernmost reptile species of the world. It shows the second lowest mean field body temperature of liolaemids ($T_b = 26.2$ °C, Ibargüengoytía et al. 2010), which is lower than their optimal body temperature for locomotor performance (Fernández et al. 2011).

The aim of this study is to determine the effects of the immune state on eco-physiological traits impacting individual survival and viability of a free-ranging population of the lizard *Liolaemus sarmiento* (Donoso-Barros 1973). In particular, we estimate the percentages of heterophils, eosinophils, basophils, lymphocytes, or monocytes based on leukocyte profile (blood smear), and relate them to body temperature in the field, preferred body temperature, speed for sprint and long runs, locomotor stamina, and body condition, all response variables relate directly to fitness. We hypothesize that the immunological state of lizards induces changes in thermoregulation and a reduction in locomotor performance. In particular, individuals with a high percentage of leukocytes are expected to show higher body temperatures and decreased overall physiological performance. Finally, we analyse constraints on thermoregulation imposed by body condition and discuss the vulnerability of a resident lizard population to pathogens.

MATERIALS AND METHODS

STUDY AREA AND CAPTURED SPECIMENS

Field work was carried out in Santa Cruz province, Argentina (51 °S, 69 °W; 109 m asl) in November 2011. The climate is cold-temperate, semiarid (Soto and Vázquez 2001), dominated by sub-polar cold and humid air masses with winds increasing toward the south which contribute to aridity, a distinctive feature of the Patagonian climate (Camilloni 2007). Winds are very strong, with a mean speed of 37 km/h during spring and summer, and a maximum speed during summer that reaches 120 km/h, which results in ever-changing weather conditions. The mean annual air temperature is 8.04 ± 1.37 °C (ranging from 1.2 to 14.1 °C), but the mean air temperature during the lizards' activity period from October to March is 12.1 ± 0.81 °C (Meteorological Station in Río Gallegos, Santa Cruz).

We captured 8 juveniles (all males), 14 adult males and 15 adult females (all pregnant) of *L. sarmientoi* ($N = 37$) by hand or loop when they were active between 0900 to 1900 hours. Immediately after capture, the body temperature (T_b) was measured (TES 1303, ± 0.03 °C digital thermometer) using a thermocouple (TES TP-K01, 1.62 mm diameter) inserted approximately 1 cm inside the cloaca. The temperature measurements were taken within 10 seconds of capture to prevent heat transfer from the operator's hands. Every capture micro-site was geo-referenced (GPS data 3 m resolution, GARMIN), allowing us to return lizards precisely after experiments. Capture permit (No. 09/09) was obtained from the Wildlife Delegation of Santa Cruz Province, Argentina. Lizards care followed ASIH/HL/SSAR Guidelines for Use of Live Amphibians and Reptiles, as well as the regulations detailed in Argentinian National Law No. 14346.

Laboratory experiments

We brought the lizards to the laboratory in individual cloth bags. Lizards were kept in a quiet

place, handled carefully, and all experiments were performed individually to avoid behavioural interference among individuals and to minimize stress. Experiments were performed during their natural daily activity period (0900 to 1900 hours) and within 48 hs after capture. First, each lizard performed the thermoregulation trial (2:30 hs duration) followed by at least 2 hs rest before the running trial which lasted < 15 min. Each lizard then rested at least 2 hs before the 30 min stamina trial. Immediately after the stamina trial, a blood sample was taken and the SVL and body mass were measured. After the experiments, each lizard was released at their capture site using GPS.

PREFERRED BODY TEMPERATURE

Lizards were placed individually in open-top terraria with 24 individual tracks (100 x 25 x 15 cm) made of medium density fiberboard wood (MDF; in walls and substrate). A thermal gradient was created in each track using a heating lamp (75-W, full spectrum). Aluminium foil covered the hot end of each track and around the heating lamp so as to concentrate the heat in the track and to minimize heat loss to surroundings during the experiment. In this set up, we achieved a thermal gradient of 17 to 45 °C along each track. The temperature gradients were continuously monitored during the experiment using a thermometer (TES 1303, ± 0.03 °C digital thermometer). The terraria did not contain any special substrate, shelter, water or food during experiments in order to offer the individuals the possibility to behaviourally choose their preferred temperature without any distractions. The body temperature of each lizard was measured using an ultra-thin (0.08 mm) catheter thermocouple inserted approximately 1 cm inside the cloaca and fastened to the base of the tail, which allowed the normal movement and behaviour of the lizards (Ibargüengoytía et al. 2010). The other end of each probe was connected to a Data Acquisition Module

(USB-TC08, OMEGA) which automatically recorded body temperatures simultaneously at 1 min intervals. The lizards, with thermocouple probes attached, were placed in the thermal gradient and allowed to acclimatize and to recover from manipulation for 20 min after which their T_b was recorded continuously for 2 hs (according with the methodologies of Iburgüengoytia et al. 2010, Paranjpe et al. 2013). The mean temperature (T_{pref}), minimum value ($T_{pref\ min}$), and the maximum value ($T_{pref\ max}$) were obtained for each lizard and used to relate them to their leukocyte profile.

LOCOMOTOR PERFORMANCE

Before the sprint and long runs (SR and LR respectively) and locomotor stamina experiments, the lizards were maintained 30 min at the mean T_{pref} for the species (34.4 ± 0.28 °C; Iburgüengoytia et al. 2010) in a terrarium (35 x 20 x 20 cm) conditioned with 75-W incandescent bulbs. The body temperature (T_b) was measured using a thermocouple inserted approximately 1 cm inside the cloaca connected to a digital thermometer (TES TP-K01, 1.62 mm diameter and TES 1303, ± 0.03 °C, respectively). In all experiments (SR, LR and stamina), lizards were encouraged to run by touching them on their hind legs or tail gently in order not to interfere with the locomotor performance.

Speed for sprint and long runs

The speed for sprint and long runs was calculated for each lizard as $V_i = d_i / t_p$, where d is the distance between the first and the last sensor (1.05 m) and t is the elapsed time between sensors. Running trials were conducted in the laboratory maintained at temperatures near the mean T_{pref} ($T_{b\ run\ speed} = 32.81 \pm 0.33$ °C) on a racetrack (0.07 m width, 1.20 m length), with cork as a substrate, and a shelter at one end. The speed of the race was measured using eight infrared photoreceptors positioned at 0.15

m intervals to sense lizard motion. The racetrack was connected to a computer. During analysis, each run was broken into a sprint-run component (SR; first 0.15 m section), indicative of the fright reaction, and secondly, a long-run component (LR; 0.15–1.20 m), indicative of locomotor capacity of the lizard to perform activities such as foraging, territorial defence and courtship. Each lizard ran three consecutive times and only the maximum run speed of the three runs performed for either SR or LR by each lizard was used in analyses. We followed the methodologies used before for *L. sarmientoi* (Fernández et al. 2011) and other *Liolaemus* (Kubisch et al. 2011).

Locomotor stamina

We measured the locomotor stamina on a 0.5 km/h treadmill following the methodology of Sinervo et al. (2000). Stamina was defined as the time spent running on the treadmill before exhaustion, indicated by the inability of individuals to right themselves when placed on their back (Sinervo and Huey 1990, Sinervo et al. 2000). Lizards ran at the mean T_{pref} ($T_{b\ locomotor\ stamina} = 34.36 \pm 0.08$ °C), and the temperature was maintained with a 75-W incandescent bulb mounted over the track (Sinervo et al. 2000).

BODY MEASUREMENTS AND SEX DETERMINATION

Snout-vent length (SVL, Vernier calliper ± 0.01 mm) and body mass (BM, 50-g Pesola[®] spring scale, ± 0.3 g) of each specimen were registered. Sex was determined by the presence of pre-cloacal glands in males. Adults were defined as individuals of SVL > 57.2 mm in females (Fernández et al. 2015) and > 63.2 mm in males (Fernández et al. 2017a).

BODY CONDITION INDEX

For the estimation of body condition, we calculated the scaled mass index (M) of each individual as

an estimator of stored (fat) energy (*sensu* Peig and Green 2009, 2010) as:

$$M = M_i \times [SVL_0/SVL_i]^{b^{SMA}};$$

where M_i and SVL_i are the mass and SVL of the individual, SVL_0 is the arithmetic mean SVL of the population, and b^{SMA} exponent is the standardized major axis slope from the regression of \ln mass on \ln SVL for the population (Peig and Green 2009, 2010). The b^{SMA} exponent was calculated using the package 'lmodel2' (Legendre 2015) in R (R Core Team 2015). We calculated the M of each juvenile and adult male; adult females were excluded from the analyses since they were all pregnant.

Blood smears

At the end of the experiments and at ambient temperature (20 to 25°C), we prepared a smear on a glass slide from a tail blood sample of each individual. The blood smear was stained with May-Grünwald Giemsa (Biopack®) that highlights granulations and improves staining of erythrocytes (Martínez-Silvestre et al. 2011). Blood smears were used to determine leukocyte profiles (expressed as a percentage of each type of white blood cell), following a manual counting method known as "greek guard" in which the observer picks randomly a field and moves the slide from top to bottom and from left to right through different fields until 100 leukocytes are counted. Leukocytes were classified as heterophils, eosinophils, basophils, lymphocytes, monocytes, and azurophils using the categories for reptiles (Stacy et al. 2011). The H:L was also calculated. Azurophils were not included in the subsequent analysis because they were found in only one smear (an adult male). The blood smears were analysed by only one observer (FD) under an optic microscope (Olympus® BX51, America Inc., Melville, NY, USA; 1000X with immersion oil) equipped with a camera (TUCSEN® DigiRetinal16; 16mp CMOS sensor). A subsample of 21 smears of juveniles ($N = 6$), males ($N = 7$)

and females ($N = 8$), were randomly chosen to photograph and measure the diameter of each type of leukocyte (μm), using the open-source image-analysis software program ImageJ 1.51n/Fiji (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Each leukocyte measurement was the mean of the measurements of each smear obtained for each individual in order to avoid pseudoreplication.

Statistical analyses

The differences in the percentages of heterophils, eosinophils, basophils, lymphocytes, monocytes and H:L among juveniles, adult males and pregnant females were analysed using either Analysis of Variance (One-Way ANOVA) or Kruskal-Wallis and Dunn's non-parametric tests (as posteriori; SPSS 17.0® or Sigma Stat 3.5® software). The effect of SVL on all variables was analysed using simple regression. For those variables that showed a significant dependence on SVL, we obtained the residuals using SPSS 17.0® and replaced the original variables (residuals of $T_{\text{pref min}}$ in adult males, and the residuals of stamina in pregnant females were obtained).

The effects of the leukocyte profile on T_b , T_{pref} , $T_{\text{pref min}}$, $T_{\text{pref max}}$, speed for sprint and long runs, and stamina of juveniles, adult males, and pregnant females were analysed by Multiple Stepwise Regression (SPSS 17.0®). R (R Core Team 2015) was used to obtain the body condition index. The relationships of body condition of juveniles and adult males to the leukocyte profile were analysed by Multiple Stepwise Regression. The relationship between the physiological variables (T_b , T_{pref} , $T_{\text{pref min}}$, $T_{\text{pref max}}$, speed for sprint and long runs, and stamina), with either body condition or H:L were analysed using Linear Regression (all regressions were performed with SPSS 17.0®). The mean body condition of juveniles and adult males were compared using t-test. The assumptions of normality and homogeneity of variance for parametric

procedures were checked using Kolmogorov-Smirnov and Levene's tests, respectively (Sokal and Rohlf 1969) with SPSS 17.0® and Sigma Stat 3.5®. Figures were created using Sigma Plot 10.0®. Means are given with standard errors (\pm 1 SE).

RESULTS

DESCRIPTION OF WHITE BLOOD CELLS AND LEUKOCYTE PROFILE

The most frequent cells were lymphocytes, and the second most frequent were heterophils. The abundances of other cell types (eosinophils, basophils, and monocytes) were much lower (Table I). The heterophils exhibited a medium size (mean $11.59 \pm 0.22 \mu\text{m}$, ranging from 8 to 17 μm , measured on 70 cells from $n = 15$ lizards, measuring 4 or 5 cells per lizard). Heterophils exhibited a round and eccentric bilobed nucleus with clear cytoplasm fill with oval or elongated granules of bright pink-orange coloration (Figure 1a). The eosinophils were more variable in size than heterophils (mean $16.71 \pm 0.41 \mu\text{m}$, ranging from 12 to 22 μm , measured on 30 cells from $n = 17$ lizards, measuring 1 or 2 cells per lizard). Eosinophils exhibited an eccentric nucleus with a clear cytoplasm, and show spherical pink granules (Figure 1b). Basophils usually exhibited a medium size (mean $10.57 \pm 0.49 \mu\text{m}$, ranging from 7 to 17 μm , measured on 30 cells from $n = 14$, measuring 1 or 3 cells per lizard). Basophils were characterized by the presence of a pale purple cytoplasm and by the presence of abundant darkly basophilic granules that cover the nucleus (nucleus not distinguishable; Figure 1c). Lymphocytes were small agranulitic cells (mean $7.23 \pm 0.18 \mu\text{m}$, ranging from 5 to 11 μm , measured on 70 cells from $n = 15$ lizards, measuring 4 or 5 cells per lizard) characterized by the presence of a high nucleus-to-cytoplasm ratio with basophilic cytoplasm (Figure 1d). Only one monocyte was photographed and measured; it exhibited a medium size (11.68 μm),

characterized by a round, oval or bilobed nucleus, and an abundant pale blue-grey cytoplasm (Figure 1e). Finally, azurophils were similar to monocytes, and exhibited a medium size (mean $11.98 \pm 0.38 \mu\text{m}$, measured on 3 cells from $n = 1$ lizard), characterized by having a central nucleus, usually rounded or oval, with high nucleus-cytoplasm ratio and with little azurophil granules dispersed in the cytoplasm (Figure 1f).

Comparison of leukocyte profile in juveniles, adult males and pregnant females

Juveniles exhibited more basophils than pregnant females, but were not different than adult males, and there was no difference between adult males and females (Kruskal-Wallis, $H_2 = 8.146$, $p = 0.017$; Dunn's Method, $Q_{\text{juveniles vs females}} = 2.755$, $p < 0.05$; $Q_{\text{males vs juveniles}} = 2.146$, $p > 0.05$; $Q_{\text{males vs females}} = 0.686$, $p > 0.05$; Table I). Juveniles, adult males, and pregnant females did not show differences in the percentage of heterophils, eosinophils, lymphocytes, and monocytes ($p > 0.05$; Table I). The H:L did not differ in the juveniles, adult males, and pregnant females (Kruskal-Wallis, $H_2 = 1.497$, $p = 0.473$; Table I), and in consequence, they were pulled together to determine the relationship of the thermophysiology and locomotor performance with the H:L (see below).

Relationship of the body condition, thermophysiology, and locomotor performance, with the leukocyte profile

Means or medians of thermophysiology variables, locomotor performance, and body condition with a descriptive purpose for juveniles, adult males, and pregnant females are shown in Table II. The body condition of juveniles and adult males did not differ (t -test, $t_{20} = -0.140$, $p = 0.890$). In consequence, juveniles and adult males were pooled in the subsequent analyses. Body condition did not show a significant relationship with leukocyte profile

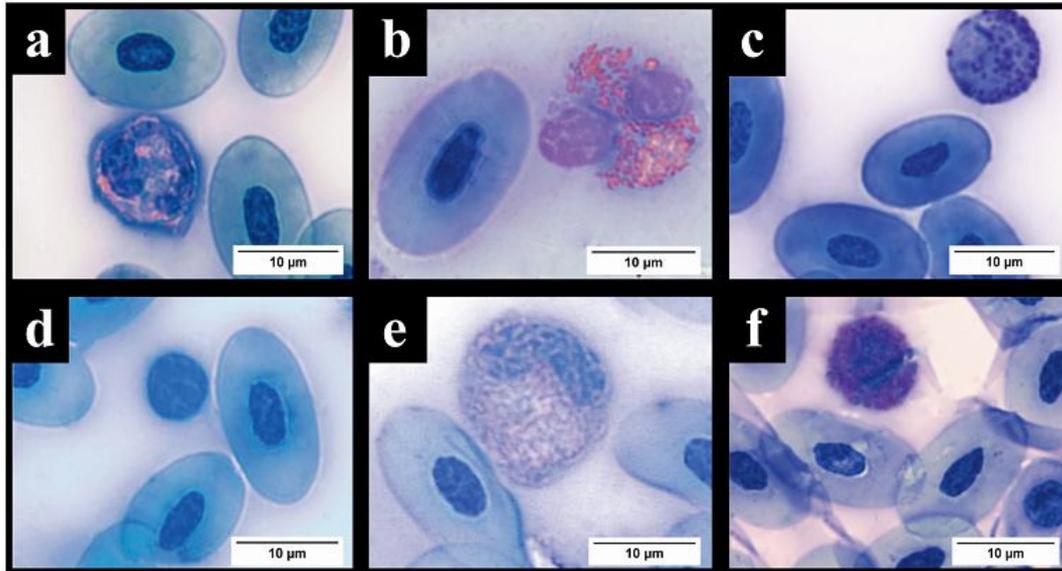


Figure 1 - Selected photographs of six types of leukocytes found in *Liolaemus sarmientoi*. Granulocyte cells: heterophil (a), eosinophil (b), and basophil (c); mononuclear cells: lymphocyte (d) and monocyte (e); and azurophil (f) are indicated. May-Grünwald Giemsa stain. Bars = 10 µm.

(Multiple Regression Stepwise, $F_{4,21} = 0.77$, $r^2 = 0.154$, $p = 0.558$; the lymphocytes were excluded from the model because of collinearity).

In juveniles, the only two physiological variables that showed a relationship with the leukocyte profile were the $T_{\text{pref max}}$, which increased with the number of basophils (Multiple Regression Stepwise, $F_{1,7} = 7.208$, $r^2 = 0.546$, $p = 0.036$; Figure 2a, Table III), and the stamina, which decreased with the linear combination of the heterophils and eosinophils ($F_{2,7} = 5.859$, $r^2 = 0.701$, $p = 0.049$; Table III). The T_b , T_{pref} , $T_{\text{pref min}}$, and speed for sprint and long runs did not exhibit a relationship with the leukocyte profile (Multiple Regression Stepwise, $p > 0.05$; Table III).

In adult males, the $T_{\text{pref max}}$ increased with the number of basophils ($F_{1,12} = 33.859$, $r^2 = 0.755$, $p = 0.001$; Figure 2b, Table III) and the T_{pref} showed a positive relationship with the number of eosinophils and basophils, and a negative relationship with monocytes (Multiple Regression Stepwise, $F_{3,12} = 17.86$, $r^2 = 0.859$, $p = 0.001$; Table III). The

T_b , $T_{\text{pref min}}$, speed for sprint and long runs, and stamina of adult males did not exhibit a significant relationship with the leukocyte profile (Multiple Regression Stepwise, $p > 0.05$; Table III). Pregnant females did not show a relationship between the physiological variables (T_b , T_{pref} , $T_{\text{pref min}}$, $T_{\text{pref max}}$, speed for sprint and long runs, and stamina) and the leukocyte profile (Multiple Regression Stepwise, $p > 0.05$; Table III).

Effects of body condition and the relationship H:L on thermophysiology and locomotor performance

The physiological variables analysed (T_b , T_{pref} , $T_{\text{pref min}}$, $T_{\text{pref max}}$, speed for sprint and long runs, and stamina) did not show a significant relationship with body condition (Linear Regression, $p > 0.05$; Table IV). The physiological variables analysed (T_b , T_{pref} , $T_{\text{pref min}}$, $T_{\text{pref max}}$, speed for sprint and long runs, and stamina) also did not show significant relationships with the H:L (Linear Regression, $p > 0.05$; Table IV).

TABLE I
 Percentage of each type of leukocyte (heterophils, eosinophils, basophils, lymphocytes, and monocytes) and heterophils:lymphocytes ratio (H:L) of the leukocyte profile (count 100 white blood cells), and comparisons among juveniles, adult males, and pregnant females of *Liolaemus sarmientoi*. Coefficients of the variance analyses (ANOVA) or Kruskal-Wallis test, mean (\pm standard error, SE) or median (when data distribution was not normal), minimum and maximum values, and sample sizes (N) are indicated. Significant *p* values are indicated in bold.

Leukocyte profile	Juveniles			Adult Males			Pregnant females			Total		ANOVA or Kruskal-Wallis	<i>p</i>	
	Mean (\pm SE) or Median	min-max	N	Mean (\pm SE) or Median	min-max	N	Mean (\pm SE) or Median	min-max	N	Mean (\pm SE) or Median	min-max			N
Heterophils (%)	24.87 (4.04)	12-43	8	24.64 (3.58)	6-55	14	21.40 (3.49)	6-53	15	19	6-55	37	$H_2=1.154$	0.561
Eosinophils (%)	0.87 (0.39)	0-3	8	1.42 (0.27)	0-3	14	0	0-3	15	1	0-3	37	$H_2=5.203$	0.074
Basophils (%)	5.62 (1.80)	1-17	8	2.00 (0.57)	0-7	14	1.26 (0.30)	0-3	15	2	0-17	37	$H_2=8.146$	0.017
Lymphocytes (%)	68.50 (4.16)	49-82	8	71.42 (3.77)	39-90	14	76.60 (3.68)	40-93	15	72.89 (2.26)	39-93	37	$F_{2,36} = 1.036$	0.366
Monocytes (%)	0	0-1	8	0	0-3	14	0	0-1	15	0	0-3	37	$H_2=2.767$	0.251
H:L	0.40 (0.09)	0.14-0.87	8	0.40 (0.09)	0.06-1.41	14	0.23	0.06-1.32	15	0.28	0.06-1.41	37	$H_2=1.497$	0.473

TABLE II

Mean (\pm standard error) or median (when data did not have a normal distribution), and sample size (N) of physiological variables measured for *Liolaemus sarmientoi*: snout-vent length (SLV, mm), body mass (BM, g), body temperature (T_b , °C), preferred body temperature (T_{pref} ; °C), minimum preferred body temperature ($T_{pref-min}$; °C), maximum preferred body temperature ($T_{pref-max}$; °C), short run (SR; m/s), long run (LR; m/s), and locomotor stamina (s) of juveniles, adult males, and pregnant females, and body condition index of juveniles and adult males.

Physiological variables	Juveniles		Adult males		Pregnant females	
	Mean (\pm SE)	N	Mean (\pm SE)	N	Mean (\pm SE)	N
SVL	54.97 (1.47)	8	80.12 (1.69)	14	77.32 (1.64)	15
BM	4.61 (0.37)	8	14.64 (0.81)	14	12.33 (0.99)	15
T_b	26.40 (2.49)	6	27.44 (1.56)	13	27.99 (1.03)	15
T_{pref}	34.09 (0.29)	7	34.29 (0.34)	13	33.54 (0.19)	15
$T_{pref-min}$	29.89 (0.85)	7	28.98 (0.65)	13	29.47 (0.70)	15
$T_{pref-max}$	38.11 (0.31)	7	37.94 (0.49)	13	36.69 (0.40)	15
SR	0.98 (0.18)	8	0.85 (0.16)	14	0.99 (0.10)	15
LR	1.17 (0.19)	8	1.25 (0.10)	14	1.10 (0.07)	15
Locomotor stamina	240.89 (31.62)	8	440.41 (76.20)	14	254.17 (30.35)	15
Body condition	9.97 (0.45)	8	10.04 (0.27)	14		

DISCUSSION

The differences in the percentage of certain leukocytes among genera, species or individuals can be related to both extrinsic and intrinsic variables. For example, differences in abundance of certain leukocytes among seasons (Sandmeier et al. 2016), before and after hibernation (Sykes and Klaphake 2008, Stacy et al. 2011), and also in neonates (Brown and Shine 2016, 2018) have been described. Leukocytes vary widely among different vertebrate groups, and within squamata, in the abundance and morphology of granules, in the cytochemical staining patterns, and in the relative occurrence in the peripheral blood (Stacy et al. 2011). Most studies only report the variation in the proportion of the different leukocyte cells, but in general do not discuss the possible causes or eco-physiological costs. For example, healthy freshwater turtles (*Graptemys gibbonsi*) in

captivity can show a high percentage of basophils (up to 50%) of the total leukocytes in comparison with other reptiles (Perpiñán et al. 2008). In contrast, a predominance of heterophils in the leukocyte profile was reported in crocodiles, like *Crocodylus palustris* (Stacy and Whitaker 2000) and *Caiman crocodilus* (Rossini et al. 2011), in the marine turtle *Caretta caretta* (Casal et al. 2009), and in some lizards like *Uromastyx spp.* (Naldo et al. 2009). The only study in *Liolaemus* provided a description of a high proportion of heterophils in *Liolaemus wiegmanni* (Ceballos de Bruno 1995). However, in the lizards *Pogona vitticeps* (Eliman 1997), *Leiolepis belliana rubritaeniata* (Ponsen et al. 2008), *Ctenosaura melanosterna* (Davis et al. 2011), and in some species of the genus *Podarcis* and *Algyroides* (Sacchi et al. 2011), lymphocytes were the most abundant cells in the leukocyte profile. In *Liolaemus sarmientoi*, the percentage

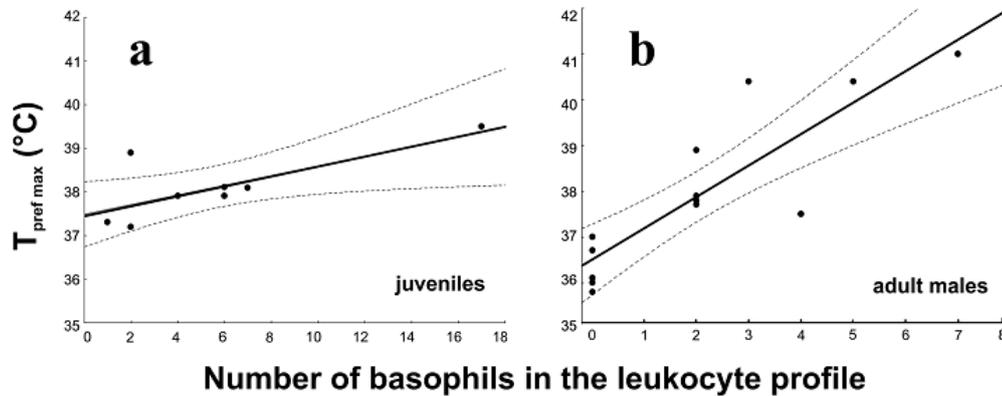


Figure 2 - Significant relationships in the regression analyses among variables related with thermoregulation: mean maximum value ($T_{pref\ max}$) preferred body temperature *versus* percentages of basophils (●) of *Liolaemus sarmientoi*. Linear regression (solid line) and their 95% confidence intervals (dashed lines) of $T_{pref\ max}$ *versus* basophils in juveniles (a) and adult males (b).

TABLE III

Multiple Regression Stepwise of body temperature (T_b , °C), preferred body temperature (T_{pref} ; °C), minimum preferred body temperature ($T_{pref\ min}$; °C), maximum preferred body temperature ($T_{pref\ max}$; °C), short run (SR; m/s), long run (LR; m/s), and locomotor stamina (s) versus leukocyte profile of juveniles, adult males, and pregnant females. Regression coefficients, correlation coefficient (r^2), and p values are indicated. The asterisk (*) indicates when residuals between the snout-vent length (SVL) and $T_{pref\ min}$ or stamina were used. Significant p values are indicated in bold.

		Leukocyte profile					
		Juveniles	p	Adult males	p	Pregnant females	p
T_b	coefficients	$F_{3,5} = 3.48$	0.231	$F_{4,12} = 0.19$	0.933	$F_{4,14} = 0.60$	0.666
	r^2	0.839		0.090		0.196	
T_{pref}	coefficients	$F_{3,7} = 0.71$	0.594	$F_{3,12} = 17.86$	<0.001	$F_{4,14} = 1.34$	0.319
				$t_{basophils} = 6.84$	<0.001		
				$t_{eosinophils} = 4.63$	0.001		
				$t_{monocytes} = 3.88$	0.004		
	r^2	0.348		0.856		0.350	
$T_{pref\ min}$	coefficients	$F_{3,7} = 0.57$	0.660	$F_{4,12} = 2.03^*$	0.183	$F_{4,14} = 1.34$	0.320
	r^2	0.302		0.504		0.349	
$T_{pref\ max}$	coefficients	$F_{1,7} = 7.20$	0.036	$F_{1,12} = 33.85$	<0.001	$F_{4,14} = 1.96$	0.176
		$t_{basophils} = 2.68$	0.036	$t_{basophils} = 5.81$	<0.001		
	r^2	0.545		0.755		0.440	
Sprint run (SR)	coefficients	$F_{3,7} = 1.55$	0.332	$F_{4,13} = 1.83$	0.206	$F_{1,14} = 2.18$	0.144
	r^2	0.538		0.449		0.418	
Long runs (LR)	coefficients	$F_{3,7} = 0.69$	0.604	$F_{4,13} = 0.50$	0.733	$F_{4,14} = 0.68$	0.621
	r^2	0.341		0.183		0.214	
Stamina	coefficients	$F_{2,7} = 5.85$	0.049	$F_{4,13} = 0.37$	0.822	$F_{4,13} = 1.83^*$	0.206
		$t_{heterophils} = -2.88$	0.034				
		$t_{eosinophils} = -2.18$	0.080				
	r^2	0.701		0.142		0.450	

of lymphocytes and heterophils were similar to those recorded for other reptiles, such as lizards and snakes (70-80% of lymphocytes, and 15-40% of heterophils; Martínez-Silvestre et al. 2011, Stacy et al. 2011), while eosinophils, basophils and especially monocytes and azurophils were scarce. In particular, the basophil percentages varied between juveniles and pregnant females.

In cold temperate environments, the attainment of optimal temperatures for physiological performance to fight an infection poses a challenge for species like *L. sarmientoi* because the harsh environment offers few microenvironments to raise body temperatures near their T_{pref} (Ibargüengoytía et al. 2010, Fernández et al. 2011). *Liolaemus sarmientoi* thermoregulation and locomotor performance varied according to the leukocyte profile of individuals, suggesting a physiological adjustment to enhance the immunological response to infection, disease, or stress. Lizards selected high temperatures (T_{pref} and $T_{pref\ max}$) when harbouring high counts of some leukocytes (eosinophils or basophils) related with innate immune responses, suggesting they can improve phagocytic activity by thermoregulation. In particular, juveniles responded by preferring warmer temperatures while showing a high percentage of basophils, as did adult males exhibiting high percentage of eosinophils and basophils, and low percentage of monocytes. In contrast, pregnant females of *L. sarmientoi* did not show a relationship between the leukocyte profile and preferred temperatures in laboratory (T_{pref} , $T_{pref\ min}$ or $T_{pref\ max}$).

There is a balance between improving the immune response and the advantages of homeostasis during embryonic development (French and Moore 2008). In nature, *L. sarmientoi* lizards are exposed to a mean air temperature of 12 °C during most of the activity season (spring and summer) but they can reach a mean T_b of 27.5 ± 0.84 °C by active thermoregulation in the field. However, this T_b is well below the T_{pref} selected in

laboratory (33.9 ± 0.16 °C, present result). This constraint is corroborated by previous work on another population of the same species ($T_b = 26.2 \pm 0.55$ °C; $T_{pref} = 34.4 \pm 0.28$ °C; Ibargüengoytía et al. 2010) and on other liolaemids from cold environments (Medina et al. 2011, Moreno Azócar et al. 2013). The low T_b registered in lizards that inhabit cold temperate environments is interpreted as a way to allow pregnant females to maintain stable T_b thereby benefitting offspring fitness (*L. pictus*, Ibargüengoytía and Cussac 2002, *L. sarmientoi*, Fernández et al. 2017b) according to the maternal manipulation hypothesis that explains the evolution of viviparity (Shine 1995, 2004). In particular, pregnant females of *L. sarmientoi* could be constrained from a thermoregulatory response to infection because higher and more variable temperatures have been shown to be detrimental for embryonic development and survivorship (Fernández et al. 2017b). Previous studies on this species show that pregnant females maintain a narrower range of T_{pref} than the rest of the population, providing a stable thermal environment for their offspring during gestation, and ensuring high aptitude after they are born (Fernández et al. 2017b). Even though our study is preliminary, the preference for higher temperatures by only juveniles and males of *L. sarmientoi* with increased percentage eosinophils or basophils suggests that they could employ behavioural fever, unlike gravid females.

In addition, there is a physiological trade-off between the benefits of enhanced immune-system performance and consumption of stored energy which could otherwise be used for growth, reproduction, or the maintenance of body condition (Smith and French 2017). Immunity, like all other physiological processes, requires adequate energy to maintain optimal functioning (Demas 2004). Individuals with poor overall physiological and energetic state (low body condition index) are more susceptible to infections or parasites

TABLE IV
Linear Regression of body condition index (in pooled data of juveniles and adult males) and heterophil:lymphocyte ratio (H:L; in pooled data of juveniles, adult males, and pregnant females). Coefficients, correlation coefficient (r^2), and p values are indicated.

	Body condition (juveniles and adult males)			H:L (juveniles, adult males and pregnant females)		
	coefficients	r^2	p	coefficients	r^2	p
T_b	$F_{1,18} = 0.25$	0.015	0.622	$F_{1,33} = 0.84$	0.026	0.365
T_{pref}	$F_{1,20} = 0.38$	0.019	0.542	$F_{1,35} = 1.59$	0.045	0.216
$T_{pref\ min}$	$F_{1,20} = 4.24$	0.183	0.053	$F_{1,35} = 1.46$	0.041	0.234
$T_{pref\ max}$	$F_{1,20} = 0.08$	0.004	0.779	$F_{1,35} = 1.29$	0.037	0.263
Sprint run (SR)	$F_{1,21} = 1.09$	0.052	0.309	$F_{1,36} = 2.69$	0.071	0.110
Long runs (LR)	$F_{1,21} = 1.66$	0.077	0.212	$F_{1,36} = 0.95$	0.027	0.334
Stamina	$F_{1,21} = 0.77$	0.037	0.389	$F_{1,36} = 0.38$	0.011	0.541

(Merchant et al. 2008). For example, lizards with low body condition could be limited in their ability to increase their T_b to counteract pathogens because of the energy costs of maintaining high T_b (Romanovsky and Szekely 1998). This is the case of the juvenile green iguanas (*Iguana iguana*) with low energy reserves (poor body condition) which developed hypothermia as a defence strategy when they were infected with LPS (lipopolysaccharide of the cell wall of *Escherichia coli*) to conserve the individual's energy reserves (Deen and Hutchison 2001). The same result was described in green anoles (*Anolis carolinensis*; Merchant et al. 2008). In our observations of free-ranging *L. sarmientoi*, body conditions of juveniles and adult males were similar, and they did not show any relationship with thermal biology, locomotor performance, or leukocyte profile, suggesting that the actual body condition of *L. sarmientoi* would not prevent lizards from modifying their body temperature (i.e., elevating T_{pref}) to improve immune system performance if needed.

Infected or unhealthy states not only lead to a change in the blood-cell profile (Schall et al. 1982, Zamora-Camacho et al. 2014), but could also affect much of the general physiological homeorhesis of the individual (*sensu* Balon 1990), as evidenced

by the reduction of efficiency of eco-physiological variables such as locomotor performance. For example, the lizards *Podarcis lilfordi* exhibited faster sprint speeds and had a better body condition when they were uninfected or had low blood parasite loads (Garrido and Pérez-Mellado 2013). Also, males of *Psammotromus algirus* lizards inoculated with LPS diminished sprint speed, whereas infected females did not (Zamora-Camacho et al. 2014). In our study, the locomotor performance (speed for sprint and long runs, and stamina), in both adult males and pregnant females were not related to the immune state (measured here as the leukocyte profile). However, in juveniles the capacity to run for long periods (stamina) was reduced in individuals that had a high percentage of heterophils. The reduction of locomotor stamina of juveniles could affect vital activities including predator avoidance and dispersal, pointing out their vulnerability in the population under infection (associated with presence of heterophil cells; Stacy et al. 2011) or stress episodes (which can also decrease lymphocytes; Davis et al. 2008).

The great variety of pathogens exerts strong selection pressures on their hosts, and affects variables intimately linked with biological adaptation and fitness, such as thermoregulation

FERNANDO DURAN et al.

ECO-IMMUNOLOGY OF *Liolaemus sarmientoi*

and physiological performance (Graham et al. 2011, Zamora-Camacho et al. 2014). Thus, lizards can exhibit a great variability in the magnitude and efficiency of the immune response, finding a balance between the activation of the immune defence and the associated costs of thermoregulation and energy expenditure as a consequence of the higher T_b . The result of this balance generates differences in the magnitude of the defence deployed and is under strong adaptive pressure (Schmid-Hempel 2011). The cold temperate environments of Patagonia represent a potential thermal refuge for northern lizard populations under a global warming scenario (Piantoni et al. 2016), but infections by new colonizing bacteria, parasites and viruses represent a threat for resident lizard populations (Cahill et al. 2012). Nevertheless, it is expected that host populations in cold-temperate environments could benefit by the reduction in costs of thermoregulation (Piantoni et al. 2016, Fernández et al. 2017b) and may therefore have more opportunities to increase body temperatures to improve immune defence responses. Juveniles are probably the most vulnerable in the population, since a reduction in locomotor stamina could affect their ability to disperse and to evade predators (Main and Bull 2000, Civantos et al. 2010).

Former studies on Liolaemidae from Patagonia discussed the efficiency in thermoregulatory behaviour in relation to the availability of thermal microenvironments (Medina et al. 2011, Duran et al. 2018), refuges (Duran et al. 2018), the condition of pregnancy (Fernández et al. 2017b), and feeding habits (Ibargüengoytía et al. 2008), but this study represents a starting point that provides background information on the leukocyte profile and body condition of a wild lizard population of *L. sarmientoi*, and the first evidence of how immunological state influences thermoregulatory behaviour and locomotor performance in the genus *Liolaemus*.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. J. D. Krenz for the insightful comments on the manuscript. Mr. I. Kenneth Schorr and H.E. Chaves, from Rio Gallegos, Santa Cruz Province, provided lodging during field work and experiments. We also thank A. Scolari, F. Méndez De la Cruz, R Lara-Resendiz and A. Manero for their help with the capture of individuals. This research was supported by the Universidad Nacional del Comahue (CRUB) and the Argentinean Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, PIP 100271 and RD2702-12), and by Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCyT) PICT-20143100.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Fernando Duran conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, prepared figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the paper, approved the final draft. Jorgelina M. Boretto conceived and designed the experiments, authored or reviewed drafts of the paper, approved the final draft. Jimena B. Fernández performed the experiments, analyzed the data, approved the final draft. Mora Ibáñez Molina stained the blood smears, analyzed the data, approved the final draft. Marlin S. Medina performed the experiments, analyzed the data, approved the final draft. Nora R. Ibargüengoytía conceived and designed the experiments, performed the experiments, authored or reviewed drafts of the paper, approved the final draft.

REFERENCES

- AGUILAR C ET AL. 2013. Integrative taxonomy and preliminary assessment of species limits in the *Liolaemus walkeri* complex (Squamata, Liolaemidae) with descriptions of three new species from Peru. *ZooKeys* 364: 47-91.
- APARICIO J AND OCAMPO M. 2010. *Liolaemus* grupo montanus Etheridge, (1995). (Iguania-Liolaemidae). *Cuad Herpetol* 24: 133-135.

- BALON E. 1990. Epigenesis of an epigeneticist: the development of some alternative concepts of the early ontogeny and evolution of fishes. *Guelph Ichthyology Reviews* 1: 1-48.
- BENNETT AF. 1980. The thermal dependence of behavioral performance in small lizards. *Anim Behav* 28: 752-762.
- BERNHEIM HA AND KLUGER MJ. 1976. Fever: effect of drug-induced antipyresis on survival. *Science* 193: 237-239.
- BONADIMAN SF, MIRANDA FJ, RIBEIRO MLS, RABELO G, LAINSON R, SILVA EO AND DAMATTA RA. 2010. Hematological parameters of *Ameiva* (Reptilia: Teiidae) naturally infected with hemogregarine: Confirmation of monocytosis. *Vet Parasitol* 171: 146-150.
- BREITMAN MF, MINOLI I, AVILA LJ, MEDINA CD, SITES JR JW AND MORANDO M. 2014. Lagartijas de la provincia de Santa Cruz, Argentina: distribución geográfica, diversidad genética y estado de conservación. *Cuad Herpetol* 28: 83-110.
- BROWN GP AND SHINE R. 2016. Maternal body size influences offspring immune configuration in an oviparous snake. *Roy Soc Open Sci* 3(3): 160041.
- BROWN GP AND SHINE R. 2018. Immune configuration in hatchling snakes is affected by incubation moisture, and is linked to subsequent growth and survival in the field. *J Exp Biol* 231(4-5): 222-229.
- BURNS G, RAMOS A AND MUCHLINSKI A. 1996. Fever response in North American snakes. *J Herpetol* 30: 133-139.
- CAHILL AE, AIELLO-LAMMENS ME, FISHER-REID MC, HUA X, KARANEWSKY CJ, RYU HY AND WIENS JJ. 2012. How does climate change cause extinction? In *Proc. R. Soc. B*, p. rspb20121890, The Royal Society.
- CAMPBELL TW. 1995. Avian hematology and cytology. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- CAMPBELL TW. 1996. Clinical pathology. Reptile medicine and surgery (ed. D.R. Mader), W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA, p. 248-257.
- CAMILLO I. 2007. Atlas de sensibilidad ambiental de la costa y mar argentino: http://atlas.ambiente.gov.ar/tematicas/mt_01/pdfs/ME_01_Introduccion.pdf.
- CAROTHERS JH, MARQUET PA AND JAKSIC FM. 1997. Thermal ecology of a *Liolaemus* lizard assemblage along an Andean altitudinal gradient in Chile. *Rev Chil Hist Nat* 71: 39-50.
- CASAL AB, CAMACHO M, LÓPEZ-JURADO LF, JUSTE C AND ORÓS J. 2009. Comparative study of hematologic and plasma biochemical variables in eastern Atlantic juvenile and adult nesting loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Vet Clin Path* 38: 213-218.
- CEBALLOS DE BRUNO S. 1995. Algunos parámetros hematológicos en *Liolaemus wiegmannii* (Sauria: Tropiduridae). *Cuad Herpetol* 9.
- CEI J. 1986. Reptiles del centro-oeste y sur de la Argentina. Herpetofauna de las zonas áridas y semiáridas, 1st edn. Museo Regionale di Scienze Naturali, Monografia IV, Torino, Italy.
- CHRISTIAN KA AND TRACY CR. 1981. The effect of the thermal environment on the ability of hatchling Galapagos Land Iguanas to avoid predation during dispersal. *Oecologia* 49: 218-223.
- CIVANTOS E, LÓPEZ P AND MARTÍN J. 2010. Non-lethal effects of predators on body growth and health state of juvenile lizards, *Psammotromus algirus*. *Physiol Behav* 100: 332-339.
- CORBALÁN V, DEBANDI G AND KUBISCH E. 2013. Thermal ecology of two sympatric saxicolous lizards of the genus *Phymaturus* from the Payunia region (Argentina). *J Therm Biol* 38: 384-389.
- CRUZ F, BELVER L, ACOSTA JC, VILLAVICENCIO HJ, BLANCO G AND CÁNOVAS MG. 2009. Thermal biology of *Phymaturus* lizards: evolutionary constraints or lack of environmental variation? *Zoology* 112: 425-432.
- DAVIS AK, COOK KC AND ALTIZER S. 2004. Leukocyte profiles in wild house finches with and without mycoplasma conjunctivitis, a recently emerged bacterial disease. *EcoHealth* 1: 362-373.
- DAVIS AK, MANEY DL AND MAERZ JC. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Funct Ecol* 22: 760-772.
- DAVIS AK, RUYLE LE AND MAERZ JC. 2011. Effect of trapping method on leukocyte profiles of black-chested spiny-tailed iguanas (*Ctenosaura melanosterna*): implications for zoologists in the field. *ISRN Zoology*.
- DAVIS AK, KEEL MK, FERREIRA AND MAERZ JC. 2010. Effects of chytridiomycosis on circulating white blood cell distributions of bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*). *Comp Clin Path* 19: 49-55.
- DEEN CM AND HUTCHISON VH. 2001. Effects of lipopolysaccharide and acclimation temperature on induced behavioral fever in juvenile *Iguana iguana*. *J Therm Biol* 26: 55-63.
- DEMAS GE. 2004. The energetics of immunity: a neuroendocrine link between energy balance and immune function. *Horm Behav* 45: 173-180.
- DO AMARAL JP, MARVIN GA AND HUTCHISON VH. 2002. The influence of bacterial lipopolysaccharide on the thermoregulation of the box turtle *Terrapene carolina*. *Physiol Biochem Zool* 75: 273-282.
- DONOSO-BARROS R. 1973. Una nueva lagartija magallánica (Reptilia, Iguanidae). *Neotropica* 19: 163-164.
- DURAN F, KUBISCH EL AND BORETTO JM. 2018. Thermal physiology of three sympatric and syntopic *Liolaemidae* lizards in cold and arid environments of Patagonia (Argentina). *J Comp Physiol B* 188: 141-152.
- ELIMAN MM. 1997. Hematology and plasma chemistry of the inland bearded dragon, *Pogona vitticeps*. *Bulletin of the Association of Reptile and Amphibian Veterinarians* 7(4).
- FERNÁNDEZ JB, SMITH J JR, SCOLARO A AND IBARGÜENGOYTÍA NR. 2011. Performance and thermal sensitivity of the southernmost lizards in the world, *Liolaemus sarmientoi* and *Liolaemus magellanicus*. *J Therm Biol* 36: 15-22.

FERNANDO DURAN et al.

ECO-IMMUNOLOGY OF *Liolaemus sarmientoi*

- FERNÁNDEZ JB, MEDINA M, KUBISCH EL, MANERO AA, SCOLARO JA AND IBARGÜENGOYTÍA NR. 2015. Female reproductive biology of the lizards *Liolaemus sarmientoi* and *L. magellanicus* from the southern end of the world. *Herpetol J* 25: 101-108.
- FERNÁNDEZ JB, MEDINA M, KUBISCH EL, SCOLARO JA AND IBARGÜENGOYTÍA NR. 2017a. Reproductive strategies in males of the world's southernmost lizards. *Integr zool* 12: 132-147.
- FERNÁNDEZ JB, KUBISCH EL AND IBARGÜENGOYTÍA NR. 2017b. Viviparity advantages in the lizard *Liolaemus sarmientoi* from the end of the world. *Evol Biol* 1-14.
- FRENCH SS AND MOORE MC. 2008. Immune function varies with reproductive stage and context in female and male tree lizards, *Urosaurus ornatus*. *Gen Comp Endocr* 155: 148-156.
- GARRIDO M AND PÉREZ-MELLADO V. 2013. Sprint speed is related to blood parasites, but not to ectoparasites, in an insular population of lacertid lizards. *Can J Zool* 92: 67-72.
- GRAHAM AL, SHUKER DM, POLLITT LC, AULDSK, WILSON AJ AND LITTLE TJ. 2011. Fitness consequences of immune responses: strengthening the empirical framework for ecoimmunology. *Funct Ecol* 25: 5-17.
- GREENWALD OE. 1974. Thermal dependence of striking and prey capture by gopher snakes. *Copeia* 141-148.
- HALLMAN GM, ORTEGA CE, TOWNER MC AND MUCHLINSKI AE. 1990. Effects of bacterial pyrogen on three lizard species. *Comp Biochem Phys A* 96: 383-386.
- IBARGÜENGOYTÍA NR, ACOSTA JC, BORETTO JM, VILLAVICENCIO HJ, MARINERO JA AND KRENZ JD. 2008. Field thermal biology in *Phymaturus* lizards: comparisons from the Andes to the Patagonian steppe in Argentina. *J Arid Environ* 72: 1620-1630.
- IBARGÜENGOYTÍA NR, MEDINA MS, FERNÁNDEZ JB AND GUTIÉRREZ JA. 2010. Thermal biology of the southernmost lizards in the world: *Liolaemus sarmientoi* and *Liolaemus magellanicus* from Patagonia, Argentina. *J Therm Biol* 35: 21-27.
- KLUGER MJ. 1977. Fever in the frog *Hyla cinerea*. *J Therm Biol* 2: 79-81.
- KLUGER MJ. 1979. Fever in ectotherms: evolutionary implications. *Am Zool* 19: 295-304.
- KLUGER MJ, RINGLER DH AND ANVER MR. 1975. Fever and survival. *Science* 188: 166-168.
- KLUGER MJ, KOZAK W, CONN CA, LEON LR AND SOSZYNSKI D. 1998. Role of fever in disease. *Ann NY Acad Sci* 856: 224-233.
- KUBISCH EL, FERNÁNDEZ JB AND IBARGÜENGOYTÍA NR. 2011. Is locomotor performance optimised at preferred body temperature? A study of *Liolaemus pictus argentinus* from northern Patagonia, Argentina. *J Therm Biol* 36: 328-333.
- LEGENDRE P. 2015. lmodel2: Model II Regression. R package version 1.7-2. URL: <<https://cran.rproject.org/web/packages/lmodel2/index.html>>
- MAINAR AND BULL CM. 2000. The impact of tick parasites on the behaviour of the lizard *Tiliqua rugosa*. *Oecologia*, 122: 574-581.
- MARTÍNEZ-SILVESTRE A, LAVÍN S AND CUENCA R. 2011. Hematología y citología sanguínea en reptiles. *Clinica veterinaria de pequeños animales: revista oficial de AVEPA, Asociación Veterinaria Española de Especialistas en Pequeños Animales* 31(3).
- MEDINA M, SCOLARO A, MÉNDEZ-DE LA CRUZ F, SINERVO B AND IBARGÜENGOYTÍA N. 2011. Thermal relationships between body temperature and environment conditions set upper distributional limits on oviparous species. *J Therm Biol* 36: 527-534.
- MERCHANT M, WILLIAMS S, TROSCLAIR PL, ELSEY RM AND MILLS K. 2007. Febrile response to infection in the american alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comp Biochem Phys A* 148: 921-925.
- MERCHANT M, FLEURY L, RUTHERFORD R AND PAULISSEN M. 2008. Effects of bacterial lipopolysaccharide on thermoregulation in green anole lizards (*Anolis carolinensis*). *Vet Immunol Immunop* 125: 176-181.
- MONAGAS WR AND GATTEN RE JR. 1983. Behavioural fever in the turtles *Terrapene carolina* and *Chrysemys picta*. *J Therm Biol* 8: 285-288.
- MORENO AZÓCAR DL, VANHOOYDONCK B, BONINO MF, PEROTTI MG, ABDALA CS, SCHULTE JA AND CRUZ FB. 2013. Chasing the Patagonian sun: comparative thermal biology of *Liolaemus* lizards. *Oecologia* 171: 773-788.
- MUCHLINSKI AE, STOUTENBURGH J AND HOGEN JM. 1989. Fever response in laboratory maintained and free ranging chuck-wallars (*Sauromalus obesus*). *Am J Physiol-Reg I* 257: R150-R155.
- NALDO JL, LIBANAN N AND SAMOUR JH. 2009. Health assessment of a spiny-tailed lizard (*Uromastix spp.*) population in Abu Dhabi, United Arab Emirates. *J Zoo Wildlife Med* 40: 445-452.
- OPPLIGER A, CELERIER ML AND CLOBERT J. 1996. Physiological and behaviour changes in common lizards parasitized by haemogregarines. *Parasitology* 113: 433-438.
- ORTEGA CE, STRANC DS, CASAL MP, HALLMAN GM AND MUCHLINSKI AE. 1991. A positive fever response in *Agama agama* and *Sceloporus orcutti* (Reptilia: Agamidae and Iguanidae). *J Comp Physiol B* 161: 377-381.
- PARANJPE DA, BASTIAANS E, PATTEN A, COOPER RD AND SINERVO B. 2013. Evidence of maternal effects on temperature preference in side-blotched lizards: implications for evolutionary response to climate change. *Ecol Evol* 3: 1977-1991.
- PEIG J AND GREEN AJ. 2009. New perspectives for estimating body condition from mass/length data: the scaled mass index as an alternative method. *Oikos* 118: 1883-1891.

- PEIG J AND GREEN AJ. 2010. The paradigm of body condition: a critical reappraisal of current methods based on mass and length. *Funct Ecol* 24: 1323-1332.
- PERPIÑÁN D, HERNANDEZ-DIVERS S.M, LATIMER KS, AKRE T, HAGEN C, BUHLMANN KA AND HERNANDEZ-DIVERS SJ. 2008. Hematology of the pascagoula map turtle (*Graptemys gibbonsi*) and the southeast asian box turtle (*Cuora amboinensis*). *J Zoo Wildlife Med* 39: 460-463.
- PIANTONI C, NAVAS CA AND IBARGÜENGOYTÍA NR. 2016. Vulnerability to climate warming of four genera of New World iguanians based on their thermal ecology. *Anim Conserv* 19: 391-400.
- PONSEN S, TALABMOOK C, NARKKONG N AND AENGWANICH W. 2008. Blood cell characteristics and some hematological values of sand lizards (*Leiolepis belliana rubritaeniata* Mertens 1961) in Northeastern Thailand. *Inter J Zool Res* 4: 119-123.
- R CORE TEAM. 2015. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org/>.
- RAKUS K, RONSMANS M AND VANDERPLASSCHEN A. 2017. Behavioral fever in ectothermic vertebrates. *Dev Comp Immunol* 66: 84-91.
- ROMANOVSKY AA AND SZEKELY M. 1998. Fever and hypothermia: two adaptive thermoregulatory responses to systemic inflammation. *Med Hypotheses* 50: 219-226.
- ROSSINI M, GARCÍA G, ROJAS J AND ZERPA H. 2011. Hematologic and serum biochemical reference values for the wild spectacled caiman, *Caiman crocodilus crocodilus*, from the Venezuelan plains. *Vet Clin Path* 40: 374-379.
- ROTHENBERG ME AND HOGAN SP. 2006. The eosinophil. *Annu Rev Immunol* 24: 147-174.
- SACCHI R, SCALI S, CAVIRANI V, PUPIN F, PELLITTERI-ROSA D AND ZUFFI MAL. 2011. Leukocyte differential counts and morphology from twelve European lizards. *Ital J Zool* 78: 418-426.
- SALAKIJ C, SALAKIJ J, APIBAL S, NARKKONG NA, CHANHOME L AND ROCHANAPAT N. 2002. Hematology, morphology, cytochemical staining, and ultrastructural characteristics of blood cells in king cobras (*Ophiophagus hannah*). *Vet Clin Path* 31: 116-126.
- SANDMEIER FC, HORN KR AND TRACY CR. 2016. Temperature-independent, seasonal fluctuations in immune function of the Mojave Desert Tortoise (*Gopherus agassizii*). *Can J Zool* 94(8): 583-590.
- SCHALL JJ, BENNETT AF AND PUTNAM RW. 1982. Lizards infected with malaria: physiological and behavioral consequences. *Science* 217: 1057-1059.
- SCHMID-HEMPEL P. 2011. *Evolutionary Parasitology: The integrated study of infections, immunology, ecology, and genetics* (Oxford Univ Press, Oxford), pp xviii, p. 516.
- SCHULTE JA, MACEY RJ, ESPINOZA RE AND LARSON A. 2000. Phylogenetic relationships in the iguanid lizard genus *Liolaemus*: multiple origins of viviparous reproduction and evidence for recurring Andean vicariance and dispersal. *Biol J Linn* 69: 75-102.
- SCOLARO JA AND CEI JM. 1997. Systematic status and relationships of *Liolaemus* species of the archeforus and kingii groups: a morphological and taxonomical approach (Reptilia: Tropiduridae). *Bollettino-Museo Regionale Di Scienze Naturali* 15: 369-406.
- SHINE R. 1995. A new hypothesis for the evolution of viviparity in reptiles. *Am Nat* 145(5): 809-823.
- SHINE R. 2004. Does viviparity evolve in cold climate reptiles because pregnant females maintain stable (not high) body temperatures? *Evolution* 58: 1809-1818.
- SINERVO B AND HUEY RB. 1990. Allometric engineering: an experimental test of the causes of interpopulational differences in performance. *Science* 248: 4.
- SINERVO B, MILES DB, FRANKINO WA, KLUKOWSKI M AND DENARDO DF. 2000. Testosterone, endurance, and darwinian fitness: natural and sexual selection on the physiological bases of alternative male behaviors in side-blotched lizards. *Horm Behav* 38: 222-233.
- SMITH GD AND FRENCH SS. 2017. Physiological trade-offs in lizards: costs for individuals and populations. *Integr Comp Biol* 57: 344-351.
- SOKAL RR AND ROHLF FJ. 1969. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*, p. 776.
- SOTO J AND VÁZQUEZ M. 2001. Las condiciones climáticas de la provincia de Santa Cruz. In: Soto J and Vázquez M (Eds), *El gran libro de la provincia de Santa Cruz*. Ed. Oriente-Alfa Centro literario. Madrid, p. 651.
- STACY BA AND WHITAKER N. 2000. Hematology and blood biochemistry of captive mugger crocodiles (*Crocodylus palustris*). *J Zoo Wildlife Med* 31: 339-347.
- STACY NI, ALLEMAN AR AND SAYLER KA. 2011. Diagnostic hematology of reptiles. *Clin Lab Med* 31: 87-108.
- SYKES JM AND KLAPHAKE E. 2008. Reptile hematology. *N. Am. Exotic Animal Practice* 11: 481-500.
- WAKELIN D AND APANIUS V. 1997. Immune defence: genetic control. In: Clayton DH, Moore J. editors. *Host-parasite evolution: General principles and avian models*. Oxford, Oxford University Press. p. 30-58.
- WANG Z, LU HL, MA L AND JI X. 2014. Viviparity in high-altitude *Phrynocephalus* lizards is adaptive because embryos cannot fully develop without maternal thermoregulation. *Oecologia* 174(3): 639-649.
- ZAMORA-CAMACHO FJ, REGUERA S, RUBIÑO-HISPÁN MV AND MORENO-RUEDA G. 2014. Eliciting an immune response reduces sprint speed in a lizard. *Behav Ecol* 26: 115-120.
- ZAMORA-CAMACHO FJ, REGUERA S AND MORENO-RUEDA G. 2016. Elevational variation in body-temperature response to immune challenge in a lizard. *PeerJ* 4: e1972.
- ZIMMERMAN LM, VOGEL LA AND BOWDEN RM. 2010. Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective. *J Exp Biol* 213: 661-671.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Thermal Biology

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/jtherbio>

Decrease in preferred temperature in response to an immune challenge in lizards from cold environments in Patagonia, Argentina

Fernando Duran^{*}, Jorgelina M. Boretto, Nora R. Ibargüengoytía

Laboratorio de Eco-fisiología e Historia de Vida de Reptiles, INIBIOMA, CONICET-Universidad Nacional del Comahue, Quintral 1250, 8400, Bariloche, Argentina

ARTICLE INFO

Keywords:

Liolaemus sarmientoi
Lipopolysaccharide
Thermoregulation
Body condition
Infection
Hypothermia

ABSTRACT

In ectotherms, the likelihood of surviving an infection is determined by the efficiency of thermoregulation, the availability of a variety of thermal microenvironments, the individual's health status, and the virulence of the infective agent. Physiological and behavioral demands related to an efficient immune response entail a series of costs that compete with other vital activities, specifically energy storage, growth, reproduction, and maintenance functions. Here, we characterize the thermal biology and health status by the presence of injuries, ectoparasites, body condition, and individual immune response capacity (using phytohemagglutinin in a skin-swelling assay) of the southernmost lizards of the world, *Liolaemus sarmientoi*, endemic to a sub-optimal, cold environment in Patagonia, Argentina. In particular, we study the effect of a bacterial endotoxin (lipopolysaccharide; LPS-treatment) on thermoregulation. We found that the field-active body temperature (T_b) was much lower than the preferred body temperature (T_p) obtained in the laboratory. All the individuals were in good body condition at the beginning of the experiments. The phytohemagglutinin test caused detectable thickening in sole-pads at 2 h and 24 h post-assay in males and non-pregnant females, indicating a significant innate immune response. In the experimental immune challenge, the individuals tended to prefer a low body temperature after LPS-treatment (2 h post-injection) and developed hypothermia, while the control individuals injected with phosphate buffered saline (PBS), maintained their body temperature throughout the trial. In both the LPS-treatment and PBS-control individuals, BC declined during the experiment. Hypothermia may allow this southernmost species to optimize the use of their energetic resources and reduce the costs of thermoregulation in a cold-temperate environment where they rarely attain the mean T_p (35.16 °C) obtained in laboratory.

1. Introduction

In ectotherms, selection of microhabitats to attain optimal body temperatures for physiological demands is relevant since it directly influences growth (Angilletta et al., 2004), reproduction (Fernández et al., 2015, 2017), digestion (Plasman et al., 2019) and the effective activation of the immune system (Kluger, 1986; Evans et al., 2015; Duran et al., 2019), among other functions. Ectothermic vertebrates regulate body temperature primarily by behavioral thermoregulation when exposed to spatial and temporal variation in ambient heat sources (Bellire and Carrascal, 1998). In particular, reptiles tend to keep their body temperature in a range close to their thermal preference (T_p) assumed to represent the body temperature that optimizes physiological performance of many enzymatic reactions (Sinervo, 1990; Hertz, 1993; Seebacher and Franklin, 2005). Nevertheless, the attainment of T_p depends mainly on the availability of a range of thermal

microenvironments for thermoregulation that narrows at higher latitudes and altitudes (Graae et al., 2012; Zamora-Camacho et al., 2015).

Maintaining body temperature to optimize physiological functions can be energetically costly (Bennett and Ruben, 1979; Alford and Lutterschmidt, 2012; Brewster et al., 2013) and partially dependent on body condition (Deen and Hutchison, 2001). In particular, the production of fever by behavioral thermoregulation in response to an infectious pathogen, functioning to minimize the impact of the infection (reviewed in Rakus et al., 2017), sometimes may be detrimental to the individual due to the high energetic requirements that it entails (Romanovsky and Szekely, 1998; Deen and Hutchison, 2001). Indeed, thermoregulation can be modelled as pathogens exerting selection pressures on their hosts (Graham et al., 2011; Zamora-Camacho et al., 2015).

The attainment of high body temperatures (T_b) entails greater time spent basking in detriment to other social functions such as territorial defense or courtship (Vicenzi et al., 2019) and results in higher energy

^{*} Corresponding author.

E-mail address: fernandoduran@comahue-conicet.gob.ar (F. Duran).

<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102706>

Received 11 May 2020; Received in revised form 20 August 2020; Accepted 21 August 2020

Available online 26 August 2020

0306-4565/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

expenditure as metabolic rates increase with T_b (Angilletta, 2001; Gillooly et al., 2001). Therefore, the costs of raising body temperature may outweigh the immunological benefits of fever prompting lizards to instead, save energy by displaying a hypothermic response to combat the pathogen (Paranjpe et al., 2014; Zamora-Camacho et al., 2016; Megía-Palma et al., 2020). However, the hypothermic response may depend on the availability of appropriate thermal microhabitats and the evolutionary history of the species investigated (e.g., Bernheim et al., 1978). Thus, hypothermia constitutes a response aimed at energy conservation and, as such, is beneficial under the conditions of a substantial energy deficit (Romanovsky and Szekely, 1998; Romanovsky et al., 2005).

Hypothermia is known to be an important adaptive response that protects vital organs during episodes of metabolic trauma caused by infections and, at the same time, decreases the physiological performance of the pathogen (Romanovsky and Szekely, 1998; Deen and Hutchison, 2001; Peterson et al., 2003). Both fever and hypothermia, therefore, can be considered as evolutionary stable strategies to fight infections that can be energy-context dependent (Romanovsky and Szekely, 1998). Experiments in which the administration of a bacterial endotoxin (lipopolysaccharide, LPS) has resulted in changes in thermoregulatory behavior and systemic inflammation have been reported for a wide variety of ectothermic vertebrates including fish (Reynolds et al., 1978), amphibians (Bicego-Nahas et al., 2000; Moretti et al., 2018), and reptiles (Merchant et al., 2008; Goessling et al., 2017).

The general health status of individuals in a population is an important factor that will directly influence the host response as fever versus hypothermia (Romanovsky and Szekely, 1998; Deen and Hutchison, 2001). Health status can be quickly evaluated by observing certain parameters such as body condition (Peig et al., 2010), ectoparasite load (e.g., skin mites; McCallum and Dobson, 1995; Hamstra and Badyaev, 2009), and the inflammation response to the Phytohemagglutinin (PHA) skin swelling assay (Tylan and Langkilde, 2017). The cellular reaction caused by PHA elicits an innate immune response (Smits et al., 1999; Svensson et al., 2001; Clulow et al., 2015) and an inflammation that is measured as a standard immunocompetence index (Zimmerman et al., 2010).

The genus *Liolaemus* is the most diversified genus of the family Liolaemidae and has a broad latitudinal and altitudinal distribution, extending from the Andes of Peru to Tierra del Fuego in Argentina and Chile (from 10°S to 54° 30'S), and from sea level to more than 5000 m above sea level (m asl) (Schulte et al., 2000; Aparicio and Ocampo, 2010; Aguilar et al., 2013). This genus has evolved behavioral and physiological mechanisms to live in a great diversity of environments and endure climatic challenges (Pearson, 1954; Pearson and Bradford, 1976; Ibarquengoytia et al., 2008; Medina et al., 2011; Moreno-Azócar et al., 2013).

The aims of this study are: 1) to characterize the thermal biology and health status of *L. sarmientoi*, and 2) to determine the effects of injection of a bacterial endotoxin (lipopolysaccharide; LPS) on thermoregulation and on body condition in adult males, non-pregnant females, and post-partum females. Results are discussed in relation to the availability of temperatures in the environment suitable to fight pathogen infections. We hypothesize that because *L. sarmientoi* inhabits low-temperature environments, they will respond to a potential experimental infection with hypothermia rather than fever. We predict that infected lizards in laboratory will select lower body temperatures than non-infected individuals and the magnitude of this effect will be enhanced by poorer initial body condition, particularly in post-partum females.

2. Materials and methods

2.1. Study area, species and active-field body and environmental temperatures

The study was carried out in southern Santa Cruz Province,

Argentina (51°S, 69°O; 109 masl) during the activity season in early January 2018. The climate is cold-temperate, semi-arid (Soto and Vázquez, 2001), dominated by sub-polar cold and humid air masses with high wind velocities, especially farther south, which contribute to aridity, a distinctive feature of the Patagonian climate (Camilloni, 2007). Winds are very strong, with a mean speed of 37 km/h during spring and summer, and a maximum speed during summer that reaches 120 km/h, which results in ever-changing weather conditions. The mean air temperature during the lizards' activity period from October to March is 12.1 ± 0.81 °C (Meteorological Station in Río Gallegos, Santa Cruz).

Liolaemus sarmientoi is a micro-endemic and specialist species (Abdala et al., 2012) that lives in small populations along rocky outcrops of glaciofluvial deposits or lava spills (from ancient volcanic craters) in the dry Patagonian Magellanic Steppe. *Liolaemus sarmientoi* is a medium-sized lizard (mean snout-vent length, SVL in females was 76.90 ± 1.21 mm and in males was 76.82 ± 2.02 mm; Ibarquengoytia et al., 2010) that is viviparous, omnivorous, and saxicolous (Cei, 1986; Scolaro and Cei, 1997). It is distributed between 48°S, 70°W and 52°S, 69°W (Breitman et al., 2014) from central Santa Cruz Province, Argentina, reaching the Strait of Magellan in the South. The distribution makes *L. sarmientoi* and its sympatric congener *Liolaemus magellanicus* the southernmost reptiles of the world (Cei, 1986; Scolaro, 2005; Breitman et al., 2014).

These lizards live in an unpredictable climate with short daily and seasonal activity periods (5 months) (Ibarquengoytia et al., 2010; Fernández and Ibarquengoytia, 2012). In nature, lizards attain a low mean body temperature of 26 °C during the activity season, even when they prefer a much higher body temperature in the laboratory (preferred body temperature, $T_p = 34.43 \pm 0.28$ °C; Ibarquengoytia et al., 2010). This species behaves as a poor thermoregulator (effectiveness of thermoregulation, *sensu* Hertz et al., 1993, $E = 0.30$; Ibarquengoytia et al., 2010), suggesting that their environment limits the attainment of higher body temperatures (T_b) and consequently the ability to develop fever to fight a potential infection. *Liolaemus sarmientoi* rarely experiences temperatures for optimal physiological performance in its natural environment (sprint and long runs, Fernández et al., 2011; embryo development, Fernández et al., 2015, 2017).

For this study, we captured 32 adults (20 males, 4 non-pregnant females, and 8 pregnant females) by hand or loop. Immediately after capture, the body temperature (T_b) was measured (TES 1303, ± 0.03 °C digital thermometer) using a thermocouple (TES TP-R01, 1.62 mm diameter) inserted approximately 10-mm inside the cloaca. The T_b was taken within 10 s of capture to prevent heat transfer from the operator's hands. Only the T_b of males and non-pregnant females were analyzed. The T_b of pregnant females were not considered because their reproductive status changed during the experiments. We also registered the substratum temperature (T_s) and the air temperature 1 cm above the ground (T_a) at each capture site, hereafter referred to as "microenvironment".

The field operative temperatures (T_e) were recorded using models to determine the availability of spatial and temporal heterogeneity of microenvironments for thermoregulation (T_e ; *sensu* Hertz, 1992; Bakken, 1992; Angilletta, 2009) as perceived by a thermoconformer lizard (Angilletta, 2009). The operative temperature (T_e) was used to analyze a lizard's potential to attain temperatures within the optimal physiological temperature range in the natural environment (Bakken, 1992; Dzialowski, 2005). We recorded T_e in the field during capture days, using 6 Gy PVC plastic models 100-mm length x 20-mm diameter connected to a data-logger (HOBO TEMP® H8, four-channel external data logger). We inserted thermocouples into the models, and sealed the ends with silicone (Fastix®). The models were distributed in the rock promontory where lizards were captured to record the temperatures every hour during the days of captures. The hourly mean T_e from all models was obtained to represent the potential availability of thermal microenvironments.

2.2. Laboratory experiments

2.2.1. Assessment of health status and reproductive state of lizards

The lizards were brought to the laboratory and they were examined to detect the presence of injuries or ectoparasites such as mites, and to determine the tail status (intact, cut, or regenerated). We recorded SVL (digital gauge ± 0.02 mm, CA-01, Lee Tools, Guangzhou, Guangdong, China), and body mass (BM, 100 g spring scale ± 0.5 g; Pesola AG, Baar, Switzerland).

To detect possible decrease in the body mass during the 7–8 days elapsed between capture and arrival to the laboratory, we regressed body mass on SVL of this study ($N = 32$) and compared those results side-by-side and by ANCOVA to that of a large sample of individuals of *L. sarmientoi* (including adult males, non-pregnant females and pregnant females; $N = 84$) measured at time of capture in previous studies (Ibargüengoytía et al., 2010; Fernández et al., 2011; Duran et al., 2019).

The sex was determined by the presence of pre-cloacal glands in males. In *L. sarmientoi* the minimum size at sexual maturity is 49.1 mm SVL in males (according to Fernández et al., 2017) and 57.22 mm SVL in females (Fernández et al., 2015). Female reproductive status (non-pregnant or pregnant) was detected by palpation. All captured pregnant females gave birth in laboratory and were studied as post-partum females for the experiments with lipopolysaccharide.

2.2.2. Lizards maintenance

The lizards were housed individually in open-top terraria (100 × 20 × 17 cm) made with fibreboard (MDF). Heat was provided daily from 0900 to 1700 h by a 75-W incandescent bulb placed over one end of each terrarium to generate a thermal gradient for thermoregulation. The lizards remained in the same terraria during all the time they were kept in the laboratory including the thermoregulation trials. Lizards were supplied with a refuge, water *ad libitum*, and were fed daily with mealworm larvae (*Tenebrio molitor*) coated with vitamins and calcium. Research permission was obtained from the Wildlife Delegation of Santa Cruz Province, Argentina (Permit # 0460/16 MP; Disposition # 11/2016). We followed the ASIH/HL/SSAR Guidelines for the Use of Live Amphibians and Reptiles as well as the regulations detailed in the Argentinean National Law # 14346.

2.2.3. Preferred body temperature (T_p)

The first of the thermoregulation trials performed in this study was executed on the first day in the laboratory, as soon we returned from the field (7–8 days after capture), and was defined as “initial- T_p ”. Thermoregulation trials were performed always in the same terraria where lizards were kept to avoid moving them during the experiments. Terraria was provided with a thermal gradient (17–40 °C) for thermoregulation using the 75-W incandescent bulb placed over one end of each terrarium. Thermoregulation trials were always performed during the hours of activity in their natural environment (0900–2000 h). The body temperature of each lizard was measured using an ultra-thin (0.08 mm) thermocouple fixed to the abdomen with hypoallergenic adhesive tape, which does not alter the locomotor abilities nor does it interfere with defecation during the experiments. Thermocouples were connected to a Data Acquisition Module (USB-TC08, OMEGA) to record body temperature every 10 s for approximately 4 h.

Mean preferred body temperatures, the lower and upper boundaries of the 50% interquartile of T_p ($T_{p\text{set}}$), and the maximum ($T_{p\text{max}}$) and minimum preferred temperature ($T_{p\text{min}}$) were estimated for each lizard (N males and non-pregnant females = 24). The means obtained for each individual were used to calculate the mean T_p and $T_{p\text{set}}$ for all individuals (following the methodology of Ibargüengoytía et al., 2010; Medina et al., 2011).

2.2.4. Assessment of cellular immunity: phytohemagglutinin (PHA) skin swelling-assay

The PHA test was performed 2 days after the initial- T_p to avoid

interfering with the thermoregulation behavior. It was measured in all males and non-pregnant females but not in pregnant females, so as not to interfere or stress them pre-parturition. The thicknesses of the right and left posterior sole-pad were measured with a digital thickness gauge (constant pressure Mitutoyo 700-118-20 CAL, ± 0.01 mm) before injections of either PHA or phosphate buffered saline (PBS) following the methodology of Huyghe et al. (2010). Immediately after these measures, 20 μ l of PHA solution (4 mg of PHA 0.1 mg L-8754 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA per ml of PBS) was injected in the posterior right sole-pad (treatment) and the same volume of PBS was injected into the left posterior sole-pad (control). The thickness of right and left posterior sole-pads were measured 2 h, 24 h and 48 h after injections. The swelling in response to PHA (treatment) or PBS (control) was estimated from the proportional increase in thickness in the posterior sole-pads before and after the injection. The PHA test does not cause any negative health effects and the reaction stimulated by the PHA disappears within 48 h after the injection, as has been previously shown in other species (Cabido, 2009; Iglesias-Carrasco et al., 2016).

2.2.5. Lipopolysaccharide immune challenge

Taking as a starting reference, the completion of the PHA test, lizards were acclimatized during 20 days in the laboratory conditions before starting the experiments with the LPS. The acclimation period was provided to offer the lizards the same environmental and feeding conditions before the experiments and to avoid possible interactions with the first thermoregulation trial (initial- T_p) and the PHA test.

After the acclimation period, we experimented with the 20 males and 4 non-pregnant females, assigned to two groups of 12 individuals each (10 males and 2 non-pregnant females). One group was injected intra-peritoneally with a solution of bacterial endotoxin from *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS, 0111:B4, L2630, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; 2.5 μ g endotoxin/g of body mass, dissolved to a concentration of 0.5 mg/ml in sterile saline, LPS-treatment). The other group was injected intra-peritoneally with phosphate buffered saline free of antigens as control (PBS-control), to account for possible effects of injections and handling. The same methodology was applied to the 8 post-partum females assigned to a treatment group ($N = 4$, LPS-treatment) and a control group ($N = 4$, PBS-control).

Based on each individual BM, we calculated the dose injected of LPS or PBS. We used LPS from the *E. coli* a component of the outer membrane of Gram-negative bacteria recognized as a potent endotoxin capable of activating the immune system. The LPS and the dose supplied used was chosen following previous studies with lizards of body sizes similar to *L. sarmientoi* (Deen and Hutchison, 2001; Uller et al., 2006; López et al., 2009).

Five thermoregulation trials were performed to determine the possible variation of T_p over time: the day before the injection (24 h before); and 2 h (2 h Post), 24 h (24 h Post), 48 h (48 h Post), and 72 h (72 h Post) post-injection. These trials were carried out with the same methodology used to obtain the initial- T_p and in the same terrariums where the lizards were located during their time in the laboratory. These thermoregulation trials lasted 6 h per day and were performed over successive days from 1000 to 1600 h to simulate part of the time in which lizards are active in their natural environment.

2.3. Statistical analyses

We used the statistical software programs Sigma Plot 11.0® and R (R Core Team, 2015; R version 3.5.1). Using BM and SVL, the body condition (BC) was estimated calculating the scaled mass index (\hat{M}_i) of each individual, an estimator of stored-fat energy (*sensu* Peig and Green, 2009, 2010), as:

$$\hat{M}_i = BM_i \times [SVL_0/SVL_i]^{b_{SMA}}$$

where BM_i and SVL_i are the mass and SVL of each individual, SVL_0 is the

arithmetic mean SVL of the population, and b^{SMA} exponent is the standardized major axis slope from the regression of $\ln(\text{BM})$ on $\ln(\text{SVL})$ for the population (Peig and Green, 2009, 2010). The b^{SMA} exponent was calculated using the package 'lmodel2' in R (Legendre, 2015; R Core Team, 2015).

The BC of males and non-pregnant females ($N = 24$) were calculated three times: 1) the first day in the laboratory (BC_1), 2) first day of the LPS experiment before the injection (BC_2); after the acclimation period that lasted 20 days, and 3) on the last day of the LPS experiment (BC_3). The BC of post-partum females ($N = 8$), was calculated twice: 1) the first day of the LPS experiment before the injection ($\text{BC}_{\text{initial}}$), and 2) at the end of LPS experiments (BC_{final} ; 72 h post-injection).

Assumptions of normality and homogeneity of variance were tested with the Shapiro-Wilk test and with the Levene test, respectively. When the assumptions of normality and/or homogeneity of variance were not met, or the sample sizes are small, we used the corresponding non-parametric test, such as Wilcoxon Signed Rank (paired samples) or the Mann-Whitney rank-sum tests (independent samples). Means are given with ± 1 standard error (SE).

The comparison between the T_b and initial- T_p were performed with Mann-Whitney test. We used a Paired t -test or Wilcoxon Signed Rank test to compare, on the same individuals, the BC between the first day in the laboratory and after acclimation period. The comparisons of the BC between the LPS-treatment and PBS-control groups before starting the experiments in the males and non-pregnant females or the post-partum females were performed using t -test or Mann-Whitney test. The dependence between the inflammatory response to PHA injection and initial body condition (BC_1) were analyzed by simple regressions. We used a One-Way Repeated Measures ANOVA to compare thickness differences of sole-pads over time in individuals injected with PHA and individuals injected with PBS, and the Holm-Sidak method as a-posteriori test for comparisons of PHA treatment over time. We used a Paired t -test to compare the thickness of the right (PHA) and left (control) sole before the injection and 2 h, 24 h and 48 h after injection.

Then we used a t -test to compare body condition and T_p before the experiments between LPS-treatment and PBS-control groups in males, non-pregnant females, and post-partum females. The changes in T_p over time and with respect to the two treatments (LPS and PBS) in the group of males and non-pregnant females, and in the group of post-partum females, were compared using a Two-Way RM ANOVA (time x treatment) and Holm-Sidak method as a-posteriori. We used a paired t -test or Wilcoxon signed rank test (same individuals) to compare BC on the first and last day of the LPS experiment. We used a t -test or Mann-Whitney tests to compare the BC between the LPS-treatment and PBS-control groups at the end the experiments in the males and non-pregnant females or the post-partum females.

3. Results

3.1. Field body temperatures (T_b), microenvironmental temperatures, and initial-preferred body temperatures (initial- T_p)

The mean T_b for males and non-pregnant females was 28.3 ± 0.63 °C and ranged from 22.6 to 35.6 °C ($N = 24$). Mean substrate temperature (T_s) was 26.00 ± 0.83 °C and ranged from 19.60 to 32.70 °C, and the air temperatures (T_a) was 24.63 ± 0.62 °C and ranged from 19.50 to 31.10 °C ($N = 24$). The hourly mean T_e from 0900 h until 2000 h when lizards were active was 25.28 ± 0.86 °C and ranged from 20.01 to 28.92 °C ($N = 6$, models). The mean of the initial- T_p was 35.16 ± 0.20 °C, with a T_{set} of 34.50–36.00 °C, and ranged from 31.79 to 38.52 °C ($N = 24$). The T_b was significantly lower than the Initial- T_p (Mann-Whitney rank sum test, $U = 15.000$, $P < 0.001$).

3.2. Health status of individuals

We observed that none of the captured individuals had lesions,

injuries, or ectoparasites (mites) in the skin and all individuals had an intact tail (except for one pregnant female with a regenerated tail). The mean values of the morphological variables such as the SVL and BM was 74.41 ± 1.61 mm and 10.90 ± 0.73 g for males ($N = 20$) and 67.72 ± 4.33 mm and 8.08 ± 1.77 g for non-pregnant females ($N = 4$), respectively. For the pregnant females ($N = 8$) the mean SVL was 74.38 ± 1.93 mm and the mean BM was 11.38 ± 0.89 g. After females gave birth were considered as post-partum females and the mean BM changed to 7.58 ± 0.48 g ($N = 8$).

Body mass upon arrival to the laboratory in this study (7–8 days after capture) was not significantly different than body mass at time of capture observed in previous studies. The comparison of results of regression of body mass on SVL in the present sample [$y = -20.11 (\pm 2.0) + 0.42 (\pm 0.02)x$; $F_{1,31} = 213.75$, $P < 0.001$, $r^2 = 0.88$] to that of the previous sample [$y = -19.14 (\pm 1.9) + 0.41 (\pm 0.02)x$; $F_{1,83} = 263.34$, $P < 0.001$, $r^2 = 0.76$] revealed the intercept and slope of the present study were within the 95% confidence intervals of the previous studies. This was corroborated by the ANCOVA showing no significant difference in body condition between the two samples ($F_{1,116} = 0.38$, $P = 0.54$).

The comparisons of mean BC_1 (measured on the first day in the laboratory) and BC_2 (after acclimation period) show that BC did not change in males (Paired t -test, $t_{19} = 1.35$, $P = 0.191$; $\text{BC}_1 = 10.05 \pm 1.01$, $\text{BC}_2 = 9.83 \pm 1.00$; $N = 20$) neither in non-pregnant females (Wilcoxon test, $W = -10.000$, $P = 0.125$; $\text{BC}_1 = 10.12 \pm 0.42$, $\text{BC}_2 = 8.68 \pm 0.87$; $N = 4$).

The comparison between the BC of males and non-pregnant females versus post-partum females before starting the experiments with LPS and PBS showed that post-partum females had lower body condition than the rest of the individuals (BC_2 vs $\text{BC}_{\text{initial}}$, t -test, $t_{30} = 4.75$, $P < 0.001$, N males and non-pregnant females = 24; N post-partum females = 8).

3.3. Phytohemagglutinin (PHA) skin swelling-assay

The inflammatory response to PHA injection did not show significant associations with body condition (BC_1) before injection (Simple Linear Regression: $F_{1,23} = 0.034$, $P = 0.855$, $N = 24$), nor 2 h after (Linear Regression: $F_{1,23} = 0.443$, $P = 0.512$), 24 h after (Linear Regression: $F_{1,23} = 0.149$, $P = 0.703$) or 48 h after injections (Linear Regression: $F_{1,23} = 0.053$, $P = 0.819$).

The comparison of the right-side treated sole-pad through time showed that with PHA the sole-pads were thicker 2 and 24 h post-injection (One-Way RM ANOVA, $F_{23, 95} = 20.539$, $P < 0.001$; Holm-Sidak method, $t_{\text{before vs 2h}} = 4.658$, $P < 0.001$, $t_{\text{before vs 24h}} = 7.323$, $P < 0.001$, $N = 24$), but did not differ 48 h post-injection (Holm-Sidak method, $t_{\text{before vs 48h}} = 1.885$, $P = 0.191$, $N = 24$; Fig. 1). The left-side sole-pad treated with PBS did not differ over time (One-Way RM ANOVA, $F_{23, 95} = 1.077$, $P = 0.365$, $N = 24$; Fig. 1).

The thickness of pads (right versus left soles) was higher in the right sole injected with PHA at 2 h (Paired t -test, $t_{23} = 3.41$, $P = 0.002$, $N = 24$) and at 24 h (Wilcoxon test, $W = -288.000$, $P < 0.001$). There were no differences prior to injections (Paired t -test, $t_{23} = -0.49$, $P = 0.622$), nor 48 h afterwards (Paired t -test, $t_{23} = 0.73$, $P = 0.469$, $N = 24$; Fig. 1) between right and left sole-pads.

3.4. Effect of LPS on T_p and BC in males and non-pregnant females

The individuals assigned to the two groups (LPS-treatment and PBS-control) did not show differences before the experiments in body condition (BC_2 , t -test, $t_{22} = -0.20$, $P = 0.840$, $N_{\text{LPS}} = 12$; $N_{\text{PBS}} = 12$) neither in the initial- T_p (t -test, $t_{22} = -0.50$, $P = 0.617$, $N_{\text{LPS}} = 12$; $N_{\text{PBS}} = 12$).

The results showed a significant interaction between the treatment factor (LPS or PBS) and the time factor (24 h before and 2 h, 24 h, 48 h and 72 h post-injection) in T_p (Two-Way Repeated Measures ANOVA, treatment x time: $F = 16.148$, $df = 4$, 119, $P < 0.001$, Table 1). The comparison of the effect of either LPS or PBS on T_p over time showed that individuals of the LPS-treatment only decreased the T_p 2 h post-

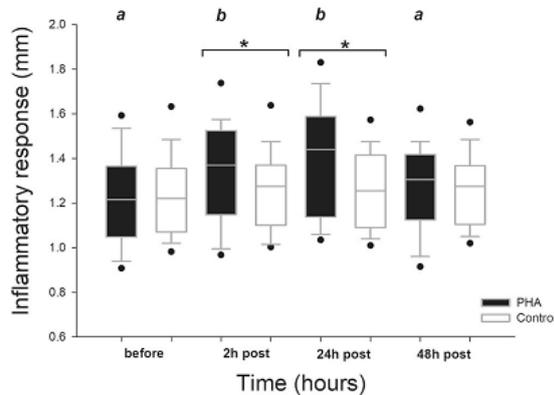


Fig. 1. Box plot of the effect of injection treatment on the right posterior sole-pad (PHA, treatment; black box) and on the left posterior sole-pad (PBS, control; white box) performed to analyze the inflammatory responses during experiment. The medians, and percentiles (5th, 25th, 75th, and 95th) of the thicknesses are indicated. Asterisks indicate significant differences between the groups PHA and control ($P < 0.05$). The letters indicate the differences among the four treatment groups: previous, 2 h, 24 h, and 48 h after the injection of PHA ($P < 0.05$).

injection (Holm-Sidak, $t_{24h\ before\ vs\ 2h\ post} = 7.290$, $P < 0.001$), and increased the T_p after 24 h (Fig. 2). In contrast, individuals of the PBS-control did not show differences and maintained their T_p over time, with the exception of T_p at 72 h after injection, which was lower compared to 24 h before injection (Holm-Sidak, $t_{24h\ before\ vs\ 72h\ post} = 3.000$, $P = 0.004$; Fig. 2). The comparisons between LPS and PBS groups showed that individuals of LPS-treatment had a lower mean T_p than individuals of PBS-control at 2 h after injection (Holm-Sidak, $t_{2h\ LPS\ vs\ PBS} = 5.302$, $P < 0.001$; Table 2). But, at 72 h post-injection the T_p was higher in the LPS-treatment than in the PBS-control (Holm-Sidak, $t_{72h\ LPS\ vs\ PBS} = 5.302$, $P < 0.001$; Table 2).

Body condition decreased during the experiment in the individuals of both groups (LPS and PBS, Table 3). On the other hand, there were no differences between the two groups (LPS-treatment vs PBS-control) in BC after the experiments ($BC_{3\ LPS}\ vs\ BC_{3\ PBS}$: t -test, $t_{22} = 0.02$, $P = 0.977$).

Table 1

Results of the comparison of the preferred body temperature (T_p) over time (24 h before and 2 h, 24 h, 48 h, and 72 h post-injection) between treatments (LPS and PBS) for males and non-pregnant females, and for post-partum females. DF = degrees of freedom, SS = sum of squares, MS = mean squares, and significant P values (*) are indicated.

	DF	SS	MS	F	P
Males and non-pregnant females					
Treatment	1	0.261	0.261	0.193	0.665
id (treatment)	22	29.695	1.350	–	–
Hours	4	8.988	2.247	6.191	<0.001*
Treatment × hours interaction	4	23.446	5.861	16.148	<0.001*
Residual	88	31.941	0.363	–	–
Total	119	94.331	0.793	–	–
Post-partum females					
Treatment	1	0.031	0.031	0.020	0.890
id (treatment)	6	9.179	1.530	–	–
Hours	4	8.213	2.053	4.953	0.005*
Treatment × hours interaction	4	9.241	2.310	5.574	0.003*
Residual	24	9.948	0.415	–	–
Total	39	36.614	0.939	–	–

3.5. Effect of LPS on T_p and BC in post-partum females

The individuals assigned to the LPS-treatment and PBS-control groups did not differ in their $BC_{initial}$ (Mann-Whitney, $U = 6.000$, $P = 0.686$, $N_{LPS} = 4$; $N_{PBS} = 4$), neither in the T_p obtained 24 h before the injections of either LPS or PBS (Mann-Whitney, $U = 5.000$, $P = 0.384$, $N_{LPS} = 4$; $N_{PBS} = 4$).

The results also showed a significant interaction between the treatment factor (LPS or PBS) and the time factor (24 h before and 2 h, 24 h, 48 h and 72 h post-injection) in T_p (Two-Way Repeated Measures ANOVA, treatment x time: $F = 5.574$, $df = 4, 39$, $P = 0.003$, Table 1). The comparison of the effect of either LPS or PBS on T_p over time evidenced that post-partum females of the LPS-treatment only decreased the T_p 2 h post-injection, (Holm-Sidak, $t_{24h\ before\ vs\ 2h\ post} = 5.036$, $P < 0.001$), and increased the T_p after 24 h (Fig. 2). In contrast, the T_p of the individuals of the PBS-control did not vary over time (Fig. 2). The comparisons between the groups showed that individuals of LPS-treatment had a lower mean T_p than individuals of PBS-control at 2 h after injection (Holm-Sidak, $t_{2h\ LPS\ vs\ PBS} = 5.302$, $P < 0.001$; Table 2).

The body condition of post-partum females injected with LPS did not show a significant difference over the time that last the experiment (LPS-treatment; Table 3), and the same happened with post-partum females injected with PBS (PBS-control; Table 3). On the other hand, there were no differences between the two groups (LPS-treatment vs PBS-control) in body condition after the experiments (BC_{final} , Mann-Whitney, $U = 6.000$, $P = 0.686$, $N_{LPS} = 4$; $N_{PBS} = 4$).

4. Discussion

Hypothermia could be effective when the body condition of the host is low or when there are ecological tradeoffs that prevent lizards from thermoregulating to combat a pathogen (Read et al., 2008; Garami et al., 2018; Johnson et al., 2019). *Liolaemus sarmientoi* presented a healthy body condition and reacted effectively against the individual immune challenge (PHA) the first days in the laboratory before starting the LPS-PBS experiments, indicating that the lizards were in a good condition to respond to an antigen. The comparison of the relationship between SVL and body mass of *L. sarmientoi* measured immediately after capture in previous studies and the sample used in this study support that lizards did not lose body mass during the 7–8 days elapsed until they were transported to the laboratory. Nevertheless, *L. sarmientoi* decreased T_p after administration of a bacterial endotoxin, developing hypothermia rather than fever or maintaining their T_{set} as the control group did, even though they had the option to choose higher temperatures in the thermal gradient. The choice of low temperatures by infected individuals suggests that this species, rather than being limited by their initial health status or body condition, as found in other lizards (Smith and French, 2017), could have expressed their ecological restrictions of their natural environment to develop fever under an immune challenge. In addition, hypothermia could help post-partum females to reduce resting energy expenditure, as observed in other ectotherms with poor BC (Romanovsky and Szekely, 1998; Deen and Hutchison, 2001).

All LPS-treatment individuals, 2 h post-injection, showed T_p (31.33 °C – 34.85 °C) lower than the mean initial- T_p registered by the same individuals a few days after capture (35.16 °C, Fig. 3). This initial- T_p was similar to the T_p values previously published for the species (34.43 °C, Ibarguengoytia et al., 2010; 34.19 °C, Duran et al., 2019) and higher than the T_b that lizards can attain in nature (Ibarguengoytia et al., 2010; Fernández et al., 2015). *Liolaemus sarmientoi* exhibited only T_p values similar to the T_b (see environmental variables T_s and T_a , T_e , Fig. 3) 2 h after being infected with LPS, and the T_p values were even lower in post-partum females, suggesting an adaptive response to the cold environment (Ferguson et al., 2018). The low preferred temperatures in post-partum females are particularly important since in this viviparous species females invest high amount of energy in their offspring and

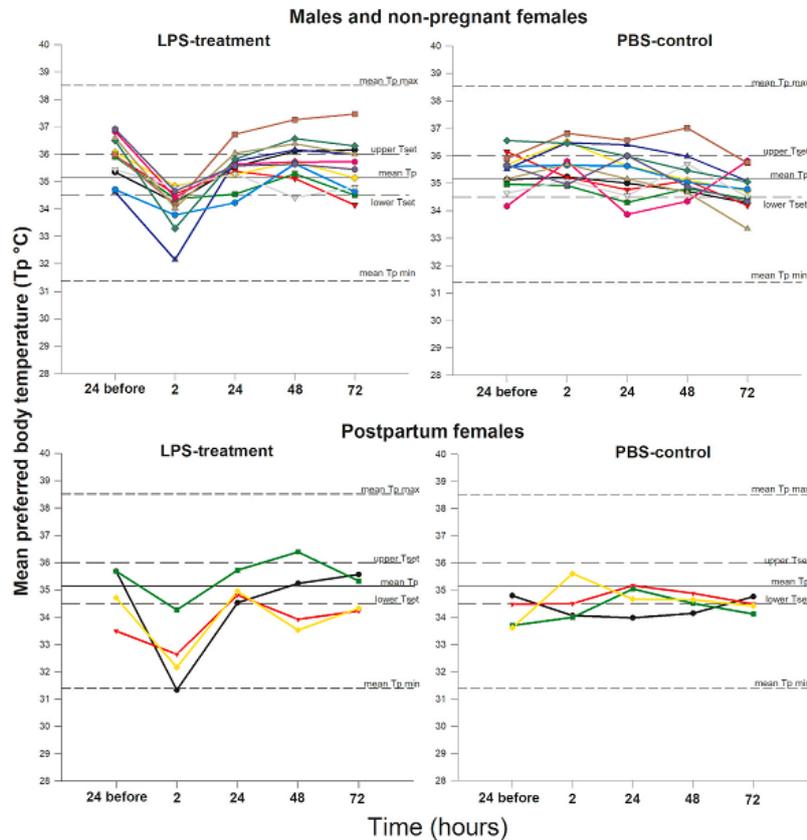


Fig. 2. Mean preferred body temperatures (T_p) of the infected individuals (LPS treatment; on the left) and control (PBS control; on the right) over time (h) for males and non-pregnant females (upper) and post-partum females (lower). The T_p mean, upper and lower T_{set} , mean $T_{p\ max}$, and mean $T_{p\ min}$ are shown.

Table 2

Descriptive data (mean \pm SD) of preferred body temperature (T_p , °C) of individuals from the LPS-treatment and PBS-control groups over time (24 h before and 2 h, 24 h, 48 h, and 72 h post-injection) for males and non-pregnant females, and post-partum females of *Liolaemus sarmientoi*. Sample sizes (N) and significant values (*) are indicated.

Time (hours)	Males and non-pregnant females (24)				Post-partum females (8)			
	LPS (N = 12) T_p °C	PBS (N = 12) T_p °C	T_p comparisons (Holm-Sidak test)	P	LPS (N = 4) T_p °C	PBS (N = 4) T_p °C	T_p comparisons (Holm-Sidak test)	P
24h before (°C)	35.90 (0.760)	35.42 (0.657)	$t_{LPS\ vs\ PBS} = 1.574$	0.120	34.89 (1.041)	34.15 (0.584)	$t_{LPS\ vs\ PBS} = 1.318$	0.202
2h (°C)	34.11 (0.758)	35.73 (0.678)	$t_{LPS\ vs\ PBS} = 5.302$	<0.001*	32.60 (1.236)	34.55 (0.743)	$t_{LPS\ vs\ PBS} = 3.444$	0.003*
24h (°C)	35.48 (0.648)	35.32 (0.853)	$t_{LPS\ vs\ PBS} = 0.537$	0.593	35.01 (0.509)	34.72 (0.533)	$t_{LPS\ vs\ PBS} = 0.510$	0.616
48h (°C)	35.83 (0.738)	35.23 (0.725)	$t_{LPS\ vs\ PBS} = 1.970$	0.053	34.77 (1.304)	34.55 (0.308)	$t_{LPS\ vs\ PBS} = 0.386$	0.703
72h (°C)	35.52 (0.937)	34.69 (0.682)	$t_{LPS\ vs\ PBS} = 2.747$	0.008*	34.86 (0.680)	34.45 (0.263)	$t_{LPS\ vs\ PBS} = 0.731$	0.473

usually show low body condition after parturition (Fernández et al., 2015) which could preclude them from spending too much energy on thermoregulation. In contrast, the individuals of the PBS-control group (males, non-pregnant, and post-partum females) maintained high and stable T_p with most values within the T_{set} of the initial- T_p , optimal for locomotor performance (Fernández et al., 2011, Fernández and Ibar-güengoytía, 2012), social activities (Fernández et al., 2018), and embryo development (Fernández et al., 2017).

The potential to survive a threat in lizards will be tightly related to the quality and availability of both sunny and shady microenvironments to maintain appropriate body temperatures (Deen and Hutchison, 2001; Zamora-Camacho et al., 2016). In high latitudes, lizards may not be able

to allocate enough energy for behavioral thermoregulation to maintain high T_p when infected with a pathogen (Paranjpe et al., 2014; Megía-Palma et al., 2020). Hence, the tendency of *L. sarmientoi* to employ hypothermia may be crucial to reduce the costs of thermoregulation since in a cold environment there is a high energy expenditure in finding warm substrates to the detriment of social, reproductive, and feeding activities (Ibar-güengoytía et al., 2010; Fernández et al., 2015, 2017) as well as an increase in the risk of predation when basking outside the shelters in the rock promontories (DeWitt, 1967; Herczeg et al., 2008). In fact, the index of the mean thermal quality of the habitat from an organism's perspective to attain T_p ($d_e = |T_e - T_{set}|$; sensu Hertz et al., 1993) in *L. sarmientoi* corresponds to a d_e value of 9.90, one of the

Table 3

Body condition (mean ± SD) of males and non-pregnant females, treated (LPS) and control (PBS), right before (BC₂) and at the end (BC₃) of the lipopolysaccharide challenge, and the body condition (mean ± SD) of post-partum females right before (BC_{initial}) and at the end (BC_{final}) of the lipopolysaccharide challenge of *Liolaemus sarmientoi* are presented and compared. Sample sizes (N) and significant values (*) are indicated.

<i>Liolaemus sarmientoi</i>	N	BC ₂	BC ₃	Paired t-test	
Males and non-pregnant females (LPS)	12	9.58 ± 0.88	9.05 ± 0.80	t ₁₁ = 6.202	P < 0.001*
Males and non-pregnant females (Control)	12	9.67 ± 1.23	9.04 ± 1.06	t ₁₁ = 8.662	P < 0.001*
		BC _{initial}	BC _{final}	Wilcoxon Signed Rank test	
Post-partum females (LPS)	4	7.34 ± 1.13	7.07 ± 1.19	W = -10.000	P = 0.125
Post-partum females (Control)	4	7.88 ± 0.93	7.58 ± 0.94	W = -10.000	P = 0.125

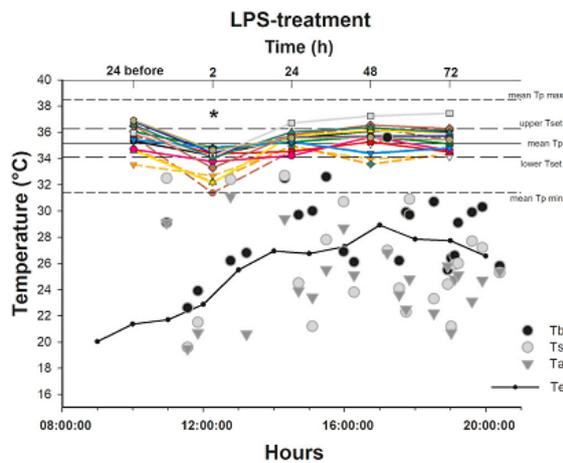


Fig. 3. Body temperature (T_b), substrate temperature (T_s), and air temperature at 1 cm (T_a) at each microenvironment where individuals were captured. Operative temperatures (T_e) were measured during sampling days per hour (lower axis). Preferred mean body temperatures (T_p) of all infected individuals (LPS treatment) over time (h, lower axis) in males and non-pregnant females (solid line, N = 12) and for post-partum females (dashed line, N = 4) are shown (upper x axis). Significant differences (P < 0.05) are indicated (*) for males and non-pregnant females, and post-partum females.

highest index values for *Liolaemus* (d_e from 5.15 to 12.60; Ibargüengoytia et al., 2020). The high value of this index for the species corroborates the notion of limited availability of thermal microenvironments for thermoregulation and, therefore, less opportunity for individuals to thermoregulate at higher temperatures in their natural environment (Ibargüengoytia et al., 2010, 2020).

The thermal shift toward lower temperatures under an immune response also helps to decrease the growth rate of a potentially pathogenic organism and consequently the negative impact on the host (Merchant et al., 2008; Medzhitov et al., 2012). Changes of just a few degrees (°C) may have a significant impact on host and pathogen survival (Kluger et al., 1975; Evans et al., 2015). Thus, behavioral hypothermia is a widespread response to immune challenges in many species of lizards from diverse environments such as those in warm environments of captive-raised juvenile green iguanas (*Iguana iguana*; Deen and Hutchison, 2001), *Anolis carolinensis* (Merchant et al., 2008), and *Sceloporus occidentalis bocourti* from western USA (Megía-Palma et al., 2020). In addition, different thermoregulation responses to an immune

challenge by LPS were observed in the lizard *Psammotromus algirus* from Sierra Nevada, Spain, that inhabits a range of elevations. The non-alpine individuals developed hypothermia in response to the immune challenge while the alpine lizards maintained their preferred body temperature as did the non-infected individuals of both alpine and non-alpine (Zamora-Camacho et al., 2016).

Thus, even when fever in response to LPS injections is a common mechanism among lizard species such as *Dipsosaurus dorsalis* (Vaughn et al., 1974), *Callisotes maculatus* (Hallman et al., 1990), *Agama agama* (Ramos et al., 1993) and *Oplurus cyclurus* (Muchlinski et al., 1995), hypothermia can be particularly suitable for species that live in poleward-latitudes. This is the case of southern Patagonia characterized by low air temperatures, strong winds, and large fluctuations in daily and seasonal temperatures (Fernández and Ibargüengoytia, 2012), an environment where the maintenance of optimal body temperatures requires great thermoregulatory effort (Carothers, 1997; Veblen et al., 2007; Stellatelli et al., 2020).

Author statement

Fernando Duran: Conceptualization, Methodology, Validation, Software, Formal analysis, Investigation, Writing – Original Draft, Visualization, Writing – Review & Editing. **Jorgelina M. Boretto:** Conceptualization, Validation, Writing – Review & Editing, Project administration. **Nora R. Ibargüengoytia:** Conceptualization, Validation, Resources, Writing – Review & Editing, Supervision, Project administration.

Declaration of competing interest

None.

Acknowledgments

We thank John D. Krenz for the English revision and comments of the manuscript. We thank to Cecchetto N. for his help with the capture of individuals and field trips. This study was conducted with research grants from Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCYT, PICT-2014-3100), and Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (PIP-11220120100676).

References

Abdala, C.S., Acosta, J.L., Acosta, J.C., Álvarez, B.B., Arias, F., Ávila, L.J., Blanco, M.G., Bonino, M., Boretto, J.M., Brancatelli, G., et al., 2012. Categorización del estado de conservación de las lagartijas y anfibenas de la República Argentina. Cuad. Herpetol. 26, 215–248.

Aguilar, C., Wood Jr., P.L., Cusi, J.C., Guzman, A., Huari, F., Lundberg, M., et al., 2013. Integrative taxonomy and preliminary assessment of species limits in the *Liolaemus walkeri* complex (Squamata, Liolaemidae) with descriptions of three new species from Peru. ZoolKeys 364, 47–91.

Alford, J.G., Lutterschmidt, W.I., 2012. Modeling energetic and theoretical costs of thermoregulatory strategy. J. Biol. Dynam. 6, 63–79.

Angilletta Jr., M.J., 2001. Variation in metabolic rate between populations of a geographically widespread lizard. Physiol. Biochem. Zool. 74 (1), 11–21.

Angilletta Jr., M.J., Steury, T.D., Sears, M.W., 2004. Temperature, growth rate, and body size in ectotherms: fitting pieces of a life-history puzzle. Integr. Comp. Biol. 44 (6), 498–509.

Angilletta, M.J., 2009. Thermal Adaptation. Oxford University Press, Oxford.

Aparicio, J., Ocampo, M., 2010. *Liolaemus* grupo montanus etheridge, 1995 (Iguania-Liolaemidae). Cuad. Herpetol. 24 (2), 133–135.

Bakken, G.S., 1992. Measurement and application of operative and standard operative temperatures in ecology. Am. Zool. 32, 194–216.

Belliure, J., Carrascal, L.M., 1998. Influence of heat transmission mode on heating rates and on the selection of patches for heating in a mediterranean lizard. Physiol. Biochem. Zool. 75, 369–376.

Bennett, A.F., Ruben, J.A., 1979. Endothermy and activity in vertebrates. Science 206, 649–654.

Bernheim, H.A., Bodel, P.T., Askenase, P.W., Atkins, E., 1978. Effects of fever on host defense mechanisms after infection in the lizard *Dipsosaurus dorsalis*. Br. J. Exp. Pathol. 59 (1), 76.

- Bicego-Nahas, K.C., Steiner, A.A., Carnio, E.C., Antunes-Rodrigues, J., Branco, L.G., 2000. Antipyretic effect of arginine vasotocin in toads. *Am. J. Phys. Regul. Integr. Comp. Phys.* 278, R1408–R1414.
- Breitman, M.F., Minoli, I., Avila, L.J., Medina, C.D., Sites Jr., J.W., Morando, M., 2014. Lagartijas de la provincia de Santa Cruz, Argentina: distribución geográfica, diversidad genética y estado de conservación. *Cuad. Herpetol.* 28, 83–110.
- Brewster, C.L., Sikes, R.S., Gifford, M.E., 2013. Quantifying the cost of thermoregulation: thermal and energetic constraints on growth rates in hatchling lizards. *Funct. Ecol.* 27, 490–497.
- Cabido, C., 2009. Evolución de las señales implicadas en los procesos de selección sexual de las lagartijas serranas ibéricas. Tesis doctoral, Universidad de A Coruña, A Coruña.
- Camilloni, I., 2007. Atlas de sensibilidad ambiental de la costa y mar argentino. http://atlas.ambiente.gov.ar/tematicas/mt_01/pdfs/ME_01_Introduccion.pdf.
- Carothers, J.H., Fox, S.F., Marquet, P.A., Jaksic, F.M., 1997. Thermal characteristics of ten Andean lizards of the genus *Liolaemus* in central Chile. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 70, 297–309.
- Cei, J., 1986. Reptiles del centro-oeste y sur de la Argentina. Herpetofauna de las zonas áridas y semiáridas, first ed. Museo Regionale di Scienze Naturali, Monografía IV, Torino, Italy.
- Culow, S., Harris, M., Mahony, M.J., 2015. Optimization, validation and efficacy of the phytohaemagglutinin inflammation assay for use in ecoimmunological studies of amphibians. *Conserv. Physiol.* 3, cov042. <https://doi.org/10.1093/conphys/cov042>.
- Deen, C.M., Hutchison, V.H., 2001. Effects of lipopolysaccharide and acclimation temperature on induced behavioral fever in juvenile *Iguana iguana*. *J. Therm. Biol.* 26, 55–63.
- DeWitt, C.B., 1967. Precision of thermoregulation and its relation to environmental factors in desert iguana *Dipsosaurus dorsalis*. *Physiol. Zool.* 40, 49–66.
- Duran, F., Boretto, J.M., Fernández, J.B., Molina, M.L., Medina, M.S., Ibarguengoytia, N.R., 2019. Impact of immunological state on eco-physiological variables in one of the southernmost lizards in the world. *Am. Acad. Bras. Cienc.* 91 (4) <https://doi.org/10.1590/0001-37652019201900055>.
- Dzialowski, E.M., 2005. Use of operative temperature and standard operative temperature models in thermal biology. *J. Therm. Biol.* 30, 317–334.
- Evans, S.S., Repasky, E.A., Fisher, D.T., 2015. Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat. *Nat. Rev. Immunol.* 15 (6), 335–349.
- Ferguson, L.V., Kortet, R., Sinclair, B.J., 2018. Eco-immunology in the cold: the role of immunity in shaping the overwintering survival of ectotherms. *J. Exp. Biol.* 221 (13).
- Fernández, J.B., Smith Jr., J., Scolari, A., Ibarguengoytia, N.R., 2011. Performance and thermal sensitivity of the southernmost lizards in the world, *Liolaemus sarmientoi* and *Liolaemus magellanicus*. *J. Therm. Biol.* 36, 15–22.
- Fernández, J., Ibarguengoytia, N., 2012. Does acclimation at higher temperatures affect the locomotor performance of one of the southernmost reptiles in the world? *Acta Herpetol.* 7 (2), 281–296.
- Fernández, J.B., Medina, M., Kubisch, E.L., Manero, A.A., Scolari, J.A., Ibarguengoytia, N.R., 2015. Female reproductive biology of the lizards *Liolaemus sarmientoi* and *L. magellanicus* from the southern end of the world. *Herpetol. J.* 25, 101–108.
- Fernández, J.B., Medina, M., Kubisch, E.L., Scolari, J.A., Ibarguengoytia, N.R., 2017. Reproductive strategies in males of the world's southernmost lizards. *Integr. Zool.* 12, 132–147.
- Fernández, J.B., Bastiaans, E., Medina, M., De la Cruz, F.R.M., Sineruo, B.R., Ibarguengoytia, N.R., 2018. Behavioral and physiological polymorphism in males of the austral lizard *Liolaemus sarmientoi*. *J. Comp. Physiol. A.* 204 (2), 219–230.
- Garami, A., Steiner, A.A., Romanovsky, A.A., 2018. Fever and hyperthermia in systemic inflammation. In: *Handbook of Clinical Neurology*, vol. 157. Elsevier, pp. 565–597.
- Gillooly, J.F., Brown, J.H., West, G.B., Savage, V.M., Charnov, E.L., 2001. Effects of size and temperature on metabolic rate. *Science* 293, 2248–2251.
- Goessling, J.M., Guyer, C., Mendonça, M.T., 2017. More than fever: thermoregulatory responses to immunological stimulation and consequences of thermoregulatory strategy on innate immunity in Gopher Tortoises (*Gopherus polyphemus*). *Physiol. Biochem. Zool.* 90 (4), 484–493.
- Graae, B.J., De Freene, P., Kolb, A., Brunet, J., Chabrier, O., Verheyen, K., Pepin, N., Heinken, T., Zobel, M., Shevtsova, A., Nijls, I., Milbau, A., 2012. On the use of weather data in ecological studies along altitudinal and latitudinal gradients. *Oikos* 121, 3–19.
- Graham, A.L., Shuker, D.M., Pollitt, L.C., Auld, S.K., Wilson, A.J., Little, T.J., 2011. Fitness consequences of immune responses: strengthening the empirical framework for ecoimmunology. *Funct. Ecol.* 25 (1), 5–17.
- Hallman, G.M., Ortega, C.E., Townner, M.C., Muchlinski, A.E., 1990. Effect of bacterial pyrogen on three lizard species. *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Physiol.* 96(3), 383–386.
- Hamstra, T.L., Badyaev, A.V., 2009. Comprehensive investigation of ectoparasite community and abundance across life history stages of avian host. *J. Zool.* 278 (2), 91–99.
- Herczeg, G., Herrero, A., Saarikivi, J., Gonda, A., Jäntti, M., Merilä, J., 2008. Experimental support for the cost-benefit model of lizard thermoregulation: the effects of predation risk and food supply. *Oecologia* 155 (1), 1–10.
- Hertz, P.E., 1992. Temperature regulation in Puerto Rican *Anolis* lizards: a field test using null hypotheses. *Ecology* 73, 1405–1417.
- Hertz, P.E., Huey, R.B., Stevenson, R.D., 1993. Evaluating temperature regulation by field-active ectotherms: the fallacy of the inappropriate question. *Am. Nat.* 142, 796–818.
- Huyghe, K., Van Oystaeyen, A., Pasmans, F., Tadić, Z., Vanhooydonck, B., Van Damme, R., 2010. Seasonal changes in parasite load and a cellular immune response in a colour polymorphic lizard. *Oecologia* 163 (4), 867–874.
- Ibarguengoytia, N.R., Acosta, J.C., Boretto, J.M., Villavicencio, H.J., Marinerio, J.A., Krenz, J.D., 2008. Field thermal biology in *Phymaturus* lizards: comparisons from the Andes to the Patagonian steppe in Argentina. *J. Arid. Environ.* 72, 1620–1630.
- Ibarguengoytia, N.R., Medina, S.M., Fernández, J.B., Gutiérrez, J.A., Tappari, F., Scolari, A., 2010. Thermal biology of the southernmost lizards in the world: *Liolaemus sarmientoi* and *Liolaemus magellanicus* from Patagonia, Argentina. *J. Therm. Biol.* 35, 21–27.
- Ibarguengoytia, N.R., Kubisch, E., Cabezas Cartes, F., Fernández, J.B., Duran, F., Piantoni, C., Medina, M., Sineruo, B., 2020. Effects of acute and chronic environmental disturbances on lizards of Patagonia. In *Lizards of Patagonia. Diversity, systematics, biogeography and biology of the reptiles at the end of the world*. In: Morando Mariana and Ávila Luciano. Springer, ISBN 978-3-030-42751-1.
- Iglesias-Carrasco, M., Head, M.L., Cabido, C., 2016. Habitat dependent effects of experimental immune challenge on lizard anti-predator responses. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 70 (11), 1931–1939.
- Johnson, N., Lymburner, A.H., Blouin-Demers, G., 2019. The impact of ectoparasitism on thermoregulation in Yarrow's Spiny Lizards (*Sceloporus jarrovi*). *Can. J. Zool.* 97 (11), 1004–1012.
- Kluger, M.J., Ringler, D.H., Anver, M.R., 1975. Fever and survival. *Science* 188, 166–168.
- Kluger, M.J., 1986. Is fever beneficial? *Yale J. Biol. Med.* 59 (2), 89.
- Legendre, P., 2015. *lmodel2: model II Regression*. R package version 1.7-2. URL: <https://cran.r-project.org/web/packages/lmodel2/index.html/>.
- López, P., Gabirot, M., Martín, J., 2009. Immune activation affects chemical sexual ornaments of male Iberian wall lizards. *Naturwissenschaften* 96 (1), 65–69.
- McCallum, H., Dobson, A., 1995. Detecting disease and parasite threats to endangered species and ecosystems. *Trends. Ecol. Evol.* 10 (5), 190–194.
- Medina, M., Scolari, A., Méndez-de la Cruz, F., Sineruo, B., Ibarguengoytia, N., 2011. Thermal relationships between body temperature and environment conditions set upper distributional limits on oviparous species. *J. Therm. Biol.* 36, 527–534.
- Medzhitov, R., Schneider, D.S., Soares, M.P., 2012. Disease tolerance as a defense strategy. *Science* 335 (6071), 936–941.
- Megía-Palma, R., Paranjpe, D., Blaimont, P., Cooper, R., Sineruo, B., 2020. To cool or not to cool? Intestinal coccidians disrupt the behavioral hypothermia of lizards in response to tick infestation. *Ticks and tick-borne diseases* 11 (1), 101275.
- Merchant, M., Fleury, L., Rutherford, R., Paulissen, M., 2008. Effects of bacterial lipopolysaccharide on thermoregulation in green anole lizards (*Anolis carolinensis*). *Vet. Immunol. Immunop.* 125 (1–2), 176–181.
- Moreno-Azócar, D.L., Vanhooydonck, B., Bonino, M.F., Perotti, M.G., Abdala, C.S., Schulte, J.A., Cruz, F.B., 2013. Chasing the Patagonian sun: comparative thermal biology of *Liolaemus* lizards. *Oecologia* 171, 773–788.
- Moretti, E.H., Chinchilla, J.E.O., Marques, F.S., Fernandes, P.A.C., Gomes, F.R., 2018. Behavioral fever decreases metabolic response to lipopolysaccharide in yellow Cururu toads (*Rhinella icterica*). *Physiol. Behav.* 191, 73–81.
- Muchlinski, A.E., Estany, A., Don, M.T., 1995. The response of *Anolis equestris* and *Oplurus cyclurus* (Reptilia: Iguanidae) to bacterial endotoxin. *J. Therm. Biol.* 20(4), 315–320.
- Paranjpe, D.A., Medina, D., Nielsen, E., Cooper, R.D., Paranjpe, S.A., Sineruo, B., 2014. Does thermal ecology influence dynamics of side-blotched lizards and their micro-parasites? *Am. Zool.* 54 (2), 108–117. <https://doi.org/10.1093/icb/icut069>.
- Pearson, O.P., 1954. Habits of the lizard *Liolaemus multififormis multififormis* at high altitudes in southern Peru. *Copeia* 1954 (2), 111–116.
- Pearson, O.P., Bradford, D.F., 1976. Thermoregulation of lizards and toads at high altitudes in Peru. *Copeia* 155–170, 1976.
- Peig, J., Green, A.J., 2009. New perspectives for estimating body condition from mass/length data: the scaled mass index as an alternative method. *Oikos* 118, 1883–1891.
- Peig, J., Green, A.J., 2010. The paradigm of body condition: a critical reappraisal of current methods based on mass and length. *Funct. Ecol.* 24, 1323–1332.
- Peterson, A.M., Gleason, T.T., Scholnick, D.A., 2003. The effects of oxygen and adenosine on lizard thermoregulation. *Physiol. Biochem. Zool.* 76, 339–347.
- Plasman, M., McCue, M.D., Reynoso, V.H., Terblanche, J.S., Clusella-Trullas, S., 2019. Environmental temperature alters the overall digestive energetics and differentially affects dietary protein and lipid use in a lizard. *J. Exp. Biol.* 222 (6), jeb194480.
- R Core Team, 2015. *R: a language and environment for statistical computing*. Vienna. R Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org/>.
- Rakus, K., Ronsmans, M., Vanderplassen, A., 2017. Behavioral fever in ectothermic vertebrates. *Dev. Comp. Immunol.* 66, 84–91.
- Ramos, A.B., Don, M.T., Muchlinski, A.E., 1993. The effect of bacteria infection on mean selected body temperature in the common Agama, *Agama agama*: a dose-response study. *Comp. Biochem. Physiol.* 105(3), 479–484.
- Read, A.F., Graham, A.L., Råberg, L., 2008. Animal defenses against infectious agents: is damage control more important than pathogen control? *PLoS Biol.* 6 (12).
- Reynolds, W.W., Covert, J.B., Casterlin, M.E., 1978. Febrile responses of goldfish *Carassius auratus* (L.) to *Aeromonas hydrophila* and to *Escherichia coli* endotoxin. *J. Fish. Dis.* 1 (3), 271–273.
- Romanovsky, A.A., Székely, M., 1998. Fever and hyperthermia: two adaptive thermoregulatory responses to systemic inflammation. *Med. Hypotheses* 50, 219–226.
- Romanovsky, A.A., Almeida, M.C., Aronoff, D.M., Ivanov, A.I., Konsman, J.P., Steiner, A., Turek, V.F., 2005. Fever and hyperthermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions. *Front. Biosci.* 10 (10), 2193–2216.
- Schulte, J.A., Macey, J.R., Espinoza, R.E., Larson, A., 2000. Phylogenetic relationships in the iguanid lizard genus *Liolaemus*: multiple origins of viviparous reproduction and evidence for recurring Andean vicariance and dispersal. *Biol. J. Linn. Soc.* 69, 75–102.

- Scolaro, J.A., Cei, J.M., 1997. Systematic status and relationships of *Liolaemus* species of the archeforus and kingii groups: a morphological and taxonomical approach (Reptilia: tropiduridae). *Boll. - Mus. Reg. Sci. Nat.* 15, 369–406.
- Scolaro, J.A., 2005. Reptiles patagónicos: Sur. Una guía de campo. Editorial Universidad Nacional de la Patagonia, Trelew.
- Seebacher, F., Franklin, C.E., 2005. Physiological mechanisms of thermoregulation in reptiles: a review. *J. Comp. Physiol. B* 175, 533–541.
- Sinervo, B., Huey, R.B., 1990. Allometric engineering: an experimental test of the causes of interpopulational differences in performance. *Science* 248, 4.
- Smith, G.D., French, S.S., 2017. Physiological trade-offs in lizards: costs for individuals and populations. *Integr. Comp. Biol.* 57 (2), 344–351.
- Smits, J.E., Bortolotti, G.R., Tella, J.L., 1999. Simplifying the phytohaemagglutinin skin-testing technique in studies of avian immunocompetence. *Funct. Ecol.* 13, 567–572. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.1999.00338.x>.
- Soto, J., Vázquez, M., 2001. Las condiciones climáticas de la provincia de Santa Cruz. In: Soto, J., Vázquez, M. (Eds.), *El gran libro de la provincia de Santa Cruz. Oriente-Alfa Centro literario*, Madrid, p. 651.
- Stellatelli, O.A., Vega, L.E., Block, C., Rocca, C., Bellagamba, P.J., Cruz, F.B., 2020. Latitudinal comparison of the thermal biology in the endemic lizard *Liolaemus multimaculatus*. *J. Therm. Biol.* 88, 102485.
- Svensson, E., Sinervo, B., Comendant, T., 2001. Density dependent competition and selection on immune function in genetic lizard morphs. *P. Natl. Acad. Sci. USA*. 98, 12561–12565. <https://doi.org/10.1073/pnas.211071298>.
- Tylan, C., Langkilde, T., 2017. Local and systemic immune responses to different types of phytohemagglutinin in the green anole: lessons for field ecoimmunologists. *J. Exp. Zool. Part A* 327 (5), 322–332.
- Uller, T., Isaksson, C., Olsson, M., 2006. Immune challenge reduces reproductive output and growth in a lizard. *Funct. Ecol.* 20 (5), 873–879.
- Vaughn, L., Bernheim, H., Kluger, M., 1974. Fever in the lizard *Dipsosaurus dorsalis*. *Nature* 252, 473–474.
- Veblen, T.T., Young, K.R., Orme, A.R., 2007. *The Physical Geography of South America*. Oxford University Press, Oxford.
- Vicenzi, N., Ibarquengoytia, N., Corbalan, V., 2019. Activity patterns and thermoregulatory behavior of the viviparous lizard *Phymaturus palluma* in Aconcagua Provincial Park, Argentine Andes. *Herpetol. Conserv. Bio.* 14 (2), 337–348.
- Zamora-Camacho, F.J., Rubiño-Hispán, M.V., Reguera, S., Moreno-Rueda, G., 2015. Thermal dependence of sprint performance in the lizard *Psammotromus algirus* along a 2200-meter elevational gradient: cold-habitat lizards do not perform better at low temperatures. *J. Therm. Biol.* 52, 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2015.06.003>.
- Zamora-Camacho, F.J., Reguera, S., Moreno-Rueda, G., 2016. Elevational variation in body-temperature response to immune challenge in a lizard. *PeerJ* 4, e1972. <https://doi.org/10.7717/peerj.1972>.
- Zimmerman, L.M., Vogel, L.A., Bowden, R.M., 2010. Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective. *J. Exp. Biol.* 213, 661–667.

16/9/21 9:32

Correo de Investigacion de la Universidad de Comahue - Annals of the Brazilian Academy of Sciences - Decision on Manuscript I...



Duran, Fernando <fernandoduran@comahue-conicet.gob.ar>

Annals of the Brazilian Academy of Sciences - Decision on Manuscript ID AABC-2020-1923.R1

Igor Luis Kaefer <onbehalf@manuscriptcentral.com>
 Responder a: kaefer@ufam.edu.br
 Para: fernandoduran@comahue-conicet.gob.ar

4 de mayo de 2021, 19:07

04-May-2021

Dear Mr. Duran:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Effects of an immune challenge on the thermal preferences of adult and newborn Liolaemus lizards from Patagonia, Argentina" in its current form for publication in the Annals of the Brazilian Academy of Sciences. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Annals of the Brazilian Academy of Sciences, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
 Dr. Igor Luis Kaefer
 Editor-in-Chief, Annals of the Brazilian Academy of Sciences
kaefer@ufam.edu.br

Associate Editor

Comments to the Author:

Dear authors,

according to the reviewer corrections have been made. Some last issues can be addressed during the proof reading stage:

- Lines 47-48 should read: "but was only identified in ectothermic animals about four decades ago (Kluger 1979).

- In line 62. Replace "incurs in a lower..." with "incurs a lower..."

In the methods. Make sure to indicate whether the residuals in the mixed-effect models were checked for normality (as this is an assumption in this type of model).

Entire Scoresheet:

Reviewer: 1

Recommendation: Accept

Comments:

Overall, a well written paper with relevant results.

Some minor comments.

- Lines 47-48 should read: "but was only identified in ectothermic animals about four decades ago (Kluger 1979).

- In line 62. Replace "incurs in a lower..." with "incurs a lower..."

In the methods. Make sure to indicate whether the residuals in the mixed-effect models were checked for normality (as this is an assumption in this type of model).

Additional Questions:

Does the manuscript contain new and significant information to justify publication?: Yes

Does the Abstract (Summary) clearly and accurately describe the content of the article?: Yes

Is the problem significant and concisely stated?: Yes

<https://mail.google.com/mail/u/0?ik=f330b0dd37&view=pt&search=all&permmsgid=msg-f%3A1698867228920196406&simpl=msg-f%3A1698867...> 1/2

16/9/21 9:32 Correo de Investigacion de la Universidad de Comahue - Annals of the Brazilian Academy of Sciences - Decision on Manuscript I

Are the methods described comprehensively?: Yes

Are the interpretations and conclusions justified by the results?: Yes

Is adequate reference made to other work in the field?: Yes

Is the language acceptable?: Yes

Please rate the priority for publishing this article (1 is the highest priority, 10 is the lowest priority): 8

Length of article is: Adequate

Number of tables is: Adequate

Number of figures is: Adequate

Please state any conflict(s) of interest that you have in relation to the review of this paper (state "none" if this is not applicable):.

Rating:

Interest: 2. Good

Quality: 2. Good

Originality: 2. Good

Overall: 2. Good

Effects of an immune challenge on the thermal preferences of adult and newborn

***Liolaemus* lizards from Patagonia, Argentina**

Fernando Duran¹, Jorgelina M. Boretto^{1*}, Leandro A. Becker² and Nora R. Ibarzüengoytía¹.

¹Laboratorio de Eco-fisiología e Historia de Vida de Reptiles, INIBIOMA, CONICET-Universidad Nacional del Comahue, Quintral 1250, 8400 Bariloche, Rio Negro, Argentina.

²Instituto de Diversidad y Evolución Austral (IDEAus-CONICET), Puerto Madryn, Chubut, Argentina.

e-mail: fernandoduran@comahue-conicet.gob.ar, orcid.org/0000-0002-7256-1478;

borettojm@comahue-conicet.gob.ar, orcid.org/0000-0002-3531-0442; [\[conicet.gob.ar\]\(mailto:conicet.gob.ar\), \[orcid.org/0000-0003-3824-8581\]\(https://orcid.org/0000-0003-3824-8581\); \[noraibarg@gmail.com\]\(mailto:noraibarg@gmail.com\), \[1959-2718\]\(https://orcid.org/0000-0002-</p></div><div data-bbox=\)](mailto:becker@cenpat-</p></div><div data-bbox=)

Key words: body condition, immune challenge, *Liolaemus kingii*, lipopolysaccharide, thermoregulation.

Running title: Immune challenge effects on thermoregulation

Academy Section: BIOLOGICAL SCIENCES

Corresponding author: *Boretto J.M. (e-mail: borettojm@comahue-conicet.gob.ar; +54 294 4428505-103).

Abstract

Body temperature has relevant effects on the immune response. Here, we characterized the thermal biology and health condition of the viviparous lizard *Liolaemus kingii* from Patagonia (Argentina), by studying field body temperatures, presence of injuries or ectoparasites, body condition (BC), and individual immune response capacity with the phytohemagglutinin (PHA) skin-swelling assay. In addition, we analyzed the effects of injections of a bacterial endotoxin (lipopolysaccharide; LPS) on the preferred temperature (T_p) and BC of adult males and newborns. The PHA treatment caused detectable thickening at 2 and 20 hours post-assay in males, indicating a significant immune response related to an increase in cellular activity. LPS-challenged lizards thermoregulated accurately and at stable body temperatures within the 50% interquartile of T_p (T_{set}) over the 72-hour period while the control group showed a more variable and lower T_p . Exposure to LPS negatively affected the BC of newborns, whereas it did not affect the BC of adult males. LPS challenges, used as a proxy of pathogen exposures to study lizard behavioral thermoregulation, constitute a practical approach to assess the immunological constraints lizards from high-latitude regions may face due to global warming and anthropogenic disturbances.

Introduction

The resilience of animal populations to novel host-pathogen interactions is governed by their physiological capacity to adjust to the new challenges (Graham et al. 2011). Apart from avoiding diseases, animals generally use two strategies to survive an infection: fever and hypothermia (Romanovsky & Székely 1998, Rakus et al. 2017). The increase in body temperature (fever) is the first and most widespread mechanism to enhance the animal immune response during disease. Fever, or febrile response (*sensu* Romanovsky et al. 2005), has been known in warm-blooded animals since Hippocratic times (Atkins 1982) but was only identified in ectothermic animals about four decades ago (Kluger 1979).

Lizards were the first ectothermic vertebrates reported to show behavioral fever (Vaughn et al. 1974, Kluger et al. 1975, Bernheim & Kluger 1976). Fever was later confirmed in fishes (Reynolds & Casterlin 1976, Covert & Reynolds 1977), amphibians (Casterlin & Reynolds 1977a, Kluger 1977), turtles (Monagas & Gatten 1983), and snakes (Burns et al. 1996). In invertebrates, it was first reported for crayfish (Casterlin & Reynolds 1977b), followed by other groups such as insects (Bronstein & Conner 1984, Stahlschmidt & Adamo 2013).

Behavioral fever amplifies the innate immune response increasing host survival (Kluger et al. 1986, Elliot et al. 2005, Boltaña et al. 2013). However, its physiological demands compete for resources with other activities such as reproduction (French & Moore 2008) and growth (Uller et al. 2006). Even though fever occurs mostly when there are no immediate threats of a substantial energy deficit (Romanovsky & Székely 1998), it may not always be beneficial to the individual as it can cause immunopathologies in host tissues (Graham et al. 2005).

A more attenuated response involving hypometabolism and hypothermia (Romanovsky & Székely 1998, Ganeshan et al. 2019) incurs in lower physiological cost, while maintaining the overall host fitness (Smith & French 2017). Hypothermia was generally thought to represent a thermoregulatory failure of the animal immune system (Steiner & Romanovsky 2019).

Hypothermia is now known in several species (Romanovsky et al. 2005), with evidence that it can be more advantageous than fever (Liu et al. 2012). Behavioral hypothermia is a widespread response to immune challenges in many lizards such as *Iguana iguana* (Deen & Hutchison 2001), *Anolis carolinensis* (Merchant et al. 2008), *Sceloporus occidentalis bocourtii* (Megía-Palma et al. 2020), and *Liolaemus sarmientoi*, one of the southernmost lizards of the world, that lives in the cold temperate environment of Patagonia, Argentina (Duran et al. 2020).

Therefore, fever and hypothermia can be seen as two thermometabolic responses to systemic inflammation, each representing a trade-off between the costs of thermoregulation (Hallman et al. 1990, Ortega et al. 1991, Merchant et al. 2008) and the benefits derived from the control of body temperature (Zamora-Camacho et al. 2015). Whereas behavioral fever ensures an active attack against the infectious agent, regulated hypothermia ensures the defense of the host's vital systems (Romanovsky et al. 2005, Bicego et al. 2007).

Moreover, animal strategies to fight diseases are generally context specific (Viney et al. 2005, Smith & French 2017), including the stage of the life cycle of the host. Although it has been known for almost a century that the immune system of newborns differs in many ways from that of adults, the impact of the life stage at the moment of infection (Fedson 2018) remains under-explored. Pioneering research of Glenny et al. (1925) in Guinea pigs, followed by work of Barr et al. (1953), Howie et al. (1953), and Kerr & Robertson (1954) on lambs and calves, demonstrated the lack of immune response to intramuscular injection of antigens in newborns. Thus, neonatal immune T-cells develop tolerance when exposed to antigens, which seems to be regulated by the environment in which T-cells develop early in life (Ridge et al. 1996), although the exact mechanism still needs to be investigated (Gensollen et al. 2016). Lipopolysaccharide (LPS), a component of the outer membrane of Gram-negative bacteria, is a potent endotoxin capable of activating the vertebrate immune system. Pre-pubertal mice challenged with LPS exhibited, along with improved survival, a higher percentage of weight

loss compared to post-pubertal mice (Joachim et al. 2017), evidencing differences according to the life stage of the host at the moment of infection.

In the present study, we characterize the thermal biology and the health status of a natural population of *Liolaemus kingii*. In addition, we explored the effects of LPS exposure on the preferred body temperature (T_p) and on the body condition of both adults and newborns in the laboratory. We hypothesize that the immune challenge will affect behavioral thermoregulation and body condition, and that the effects in newborns will differ from that in adults. We predict that in response to an LPS challenge, adults will select higher T_p than non-challenged individuals and maintain their body condition, whereas newborns would compromise their body condition at expenses of maintaining high body temperatures to enhance the innate immune response.

Materials and Methods

Species and collection area

The genus *Liolaemus* has a wide range, extending north to the Andes of Peru and south to Tierra del Fuego in Argentina and Chile (from 10°S to 54°30'S, and from sea level to 5000 m above sea level (masl); Schulte et al. 2000, Aparicio & Ocampo 2010). *Liolaemus* species show great adaptive plasticity in their physiological responses to a high diversity of environments and climates (Labra et al. 2009, Ibagüengoytía et al. 2010). *Liolaemus kingii* is abundant in southwestern Chubut Province and throughout Santa Cruz Province (Argentina; Breitman et al. 2014), and is classified as “not threatened” (Abdala et al. 2012, Breitman et al. 2014). This species is considered a robust lizard with a mean snout-vent length (SVL) of approximately 100 mm, an insectivorous diet, and a viviparous mode of reproduction (Ibagüengoytía et al. 2002, Scolaro 2005). Field work was carried out in February, 2017, in western Chubut Province (43°S, 70°W; 630 m asl), an area characterized by low mean annual temperatures, and great

daily and seasonal thermal amplitude (Paruelo et al. 1998). This site features sparse sub-bush vegetation (*Verbena*, *Nassauvia*, *Chuquiraga spp.*) and scarce pastures dominated by genera *Stipa* and *Poa* (Scolaro 2005).

A total of 28 adult individuals (21 males and 7 pregnant females) were captured by hand or loop when they were active between 1000 and 2000 h. Immediately after capture, the body temperature (T_b) was measured (TES 1303, ± 0.03 °C digital thermometer) using a thermocouple (TES TP-K01, 1.62 mm diameter) inserted approximately 10 mm inside the cloaca. Body temperatures were taken by grasping the body from the neck to the hips with three fingertips within 10-sec of capture to prevent heat transfer from the operator's hands. Lizards were kept in individual cloth bags in a thermally isolated terrarium to maintain a stable temperature and were provided with water once a day until they reached the laboratory. Captures were authorized by the Wildlife Service of the Province of Chubut (Permit # 03588/16 MP; Disposition # 48/08). We followed the Guidelines for the Use of Live Amphibians and Reptiles in Field and Laboratory Research of the American Society of Ichthyologists and Herpetologists (ASIH), the Herpetologists' League (HL), and the Society for the Study of Amphibians and Reptiles (SSAR), as well as the regulations detailed in Argentinean National Law # 14346.

Laboratory conditions and experiments

Assessment of health status and reproductive state of lizards

Lizards were brought to the laboratory (a greenhouse with natural light and automatic control of ambient temperature and ventilation) and were examined to detect injuries or ectoparasites such as mites, and to determine the tail status (intact, cut, or regenerated). We recorded SVL (digital gauge ± 0.02 mm, CA-01, Lee Tools, Guangzhou, Guangdong, China), body mass (BM, 100 g spring scale ± 0.5 g; Pesola AG, Baar, Switzerland), and sex (males were distinguished by precloacal pores). Female reproductive status (pregnant) was detected by palpation. All

pregnant females gave birth in laboratory. The SVL and BM of the neonates were measured immediately after birth. These newborns were used in the lipopolysaccharide immune challenge described below.

Lizard maintenance

Lizards were housed individually in open-top fibreboard terraria (100 × 20 × 17 cm) supplied with a refuge, water *ad libitum* and a 75-W incandescent bulb energized daily 1000h to 1700h. They were kept in the same terraria while conducting experiments in the laboratory. They were fed daily with mealworm larvae (*Tenebrio molitor*) dusted with vitamins and calcium (ReptoCal, Tetrafauna™), and were observed to ensure they were feeding.

Preferred body temperature (T_p)

The first thermoregulation trial (initial T_p) was executed on the first day in the laboratory as soon as we returned from the field (2 to 3 days after capture). A thermal gradient (17 - 40 °C) was constructed with the 75-W incandescent bulb placed over one end of each terrarium. Thermoregulation trials were performed during the hours of activity in their natural environment (1000 to 2000 h). Body temperature of each lizard was measured using an ultra-thin (0.08 mm) thermocouple fixed to the abdomen with hypoallergenic adhesive tape, which does not alter locomotory ability nor does it interfere with defecation during the experiments. Thermocouples were connected to a Data Acquisition Module (USB-TC08, OMEGA) to record body temperature every 10-sec for approximately a 4-hour period.

Mean preferred body temperatures, lower and upper boundaries of the 50% interquartile of T_p (T_{set}), and maximum ($T_{p\ max}$) and minimum preferred temperature ($T_{p\ min}$) were calculated for each lizard ($N_{\text{males}} = 21$) following the methodologies of Ibarguengoytía et al. (2010) and Medina et al. (2011).

To determine whether the thermocouple on the abdomen is a good proxy of the core temperature, we performed a calibration experiment by placing a lizard in a terrarium (15 × 20

× 20 cm) provided with an infrared 150-W lamp. We adhered a thermocouple to its abdomen and inserted another one approximately 10-mm inside its cloaca, both fixed in place with hypoallergenic adhesive tape. During a 2-hour test, the lamp was moved to different heights to generate different temperatures throughout the calibration, while body temperature was recorded every 2 min. Thermocouples placed in the abdomen and within the cloaca recorded similar T_{bs} (Simple Linear Regression, $F_{1,47} = 5440.99$, $P < 0.001$, $R^2 = 0.992$, lower 0.950 and upper 1.003 confidence interval boundaries).

Assessment of local inflammatory response: phytohemagglutinin (PHA) skin-swelling assay

The delayed-type hypersensitivity (DTH) test is a cell-mediated immune responsiveness assessment tool broadly used in animals such as birds (Smits et al. 1999), lizards (Svensson et al. 2001) and amphibians (Clulow et al. 2015). Subcutaneous injection of phytohemagglutinin (PHA) triggers a series of physiological reactions that produce local inflammation at the injection site, related to the increase in cellular activity (Chandra & Newberne 1977, Roitt et al. 1996, Clulow et al. 2015). This reaction increases the proliferation of polyclonal T-cells, causing an inflammation which is used as a standard index of immunocompetence (Zimmerman et al. 2010).

The PHA test was performed only in males 2 days after the initial- T_p trial to avoid interfering with the thermoregulation behavior. The thicknesses of the right and left posterior sole pad were measured with a digital thickness gauge (constant pressure Mitutoyo 700-118-20 CAL, ± 0.01 mm). Following the methodology of Huyghe et al. (2010), immediately after these measures, 20 μ l of PHA solution (4 mg of PHA 0.1 mg L-8754 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA per ml of PBS) was injected into the posterior right sole pad (treatment) and the same volume of phosphate buffered saline (PBS) was injected into the left posterior sole pad (control). The thickness of the right and left posterior sole pads were measured 2h, 20h and 48h after injections. The swelling in response to PHA (treatment) or PBS (control) was estimated from

the proportional increase in thickness in the posterior sole pads before and after the injection. The PHA test does not cause any negative health effects and the reaction stimulated by the PHA disappears within 48h after the injection, as has been previously shown in other lizard species (Cabido 2009, Iglesias-Carrasco et al. 2016, Duran et al. 2020).

Lipopolysaccharide (LPS) immune challenge

Following the completion of the PHA test, lizards were acclimatized for 20 days under laboratory conditions before starting the LPS immune challenge. The acclimation period offered all lizards similar environmental and feeding conditions and prevented possible interactions with the initial- T_p trial and the PHA test. During this time, six females gave birth to three offspring each, except one gave birth to two. The newborns were also supplied with a refuge and water *ad libitum*, and were fed with mealworm larvae (*Tenebrio molitor*) once a day.

After the acclimation period, three out of the 21 adult males and six out of the 20 newborns were randomly selected and set aside for another study. Thus, 18 adult males were randomly split into two groups. One group (treatment, $N = 9$) was injected intra-peritoneally with *Escherichia coli* 0111:B4 LPS (L2630, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; 2.5 μg endotoxin/g of body mass, dissolved to a concentration of 0.5 mg/ml in sterile saline). The other group (control, $N = 9$) was injected intra-peritoneally with sterile PBS to account for possible effects of either or both injections, and handling. The dose supplied was calculated based on each individual BM following previous studies on lizards with body sizes similar to *L. kingii* (Deen & Hutchison 2001, Uller et al. 2006, López et al. 2009, Duran et al. 2020). Similarly, the 14 newborns were randomly assigned to either a treatment group ($N = 7$, LPS) or a control group ($N = 7$, PBS).

Five thermoregulation trials were performed to determine the possible variation of T_p with time: the day before the injection (24h before); and 2h (2h Post), 24h (24h Post), 48h (48h Post), and 72h (72h Post) post-injection. Following the same methodology used to obtain the initial-

T_p , these trials lasted 6 hours per day and were performed over successive days from 1000 to 1600 h to simulate part of the time in which lizards are active in their natural environment. We calculated the daily mean T_{p_i} for each individual i (24h before and 2h, 24h, 48h, and 72h post-injection of LPS or PBS). Lizards were fed daily after the completion of each thermoregulation trial.

Statistical analyses

We used the statistical software programs Sigma Plot 11.0® and R (R Core Team, 2021). The body condition (BC) was estimated calculating the scaled mass index (\hat{M}_i) of each individual as an estimator of stored (fat) energy (*sensu* Peig & Green 2009, 2010) as:

$$\hat{M}_i = BM_i \times [SVL_0/SVL_i]^{b^{SMA}}$$

where BM_i and SVL_i are the mass and SVL of the individual, SVL_0 is the arithmetic mean SVL of the population, and b^{SMA} exponent is the standardized major axis slope from the regression of $\ln(BM)$ on $\ln(SVL)$ for the population (Peig & Green 2009, 2010). The b^{SMA} exponent was calculated using the package *lmodel2* (Legendre 2015) in R (R Core Team 2021). The BC of adult males was calculated on the first day in the laboratory ($BC_{1 \text{ males}}$), at the end of the acclimation period ($BC_{2 \text{ males}}$), and on the last day of the LPS challenge ($BC_{3 \text{ males}}$). The BC in newborns was calculated at birth ($BC_{1 \text{ newborns}}$), right before ($BC_{2 \text{ newborns}}$) and at the end ($BC_{3 \text{ newborns}}$) of the LPS challenge.

We used a Paired t -test and One-Way Repeated Measures Analysis of Variance (One-Way RM ANOVA) to detect changes in body condition over time in the laboratory in adult males and newborns. The dependence between the inflammatory response to PHA injection and initial body condition ($BC_{1 \text{ males}}$) were analyzed by simple regressions. We used a t -test to compare BC and T_p before the experiments between the LPS and PBS groups in adult males and also in newborns.

We applied a linear mixed modeling approach to evaluate the effects of treatment on the thickness of sole pads and T_p over time using the package *lme4* (Bates et al. 2015) and, for *post hoc* tests, the package *emmeans* (Russell 2019) in R software (R Core Team 2021). For the phytohemagglutinin skin-swelling assay, thickness was the response variable, treatment (PHA or PBS), time and their interaction were the fixed effects, and individual identity was the random variable. For the LPS immune challenge, T_p was the response variable, treatment (LPS or PBS), time, age and their interaction were the fixed effects, and individual identity was the random variable. The statistical significance of the individual identity in both analyses was assessed by likelihood ratio tests based on restricted maximum likelihood (PHA analysis: $\chi^2_{[1]} = 46.99$, $P < 0.001$; LPS analysis: $\chi^2_{[1]} = -311.04$, $P < 0.05$) using the function *rand* of the *lmerTest* package (Kuznetsova et al. 2017). In both analyses, P-values for fixed effects were obtained using type III sums of squares based on Satterthwaite approximation for denominator degrees of freedom (Kuznetsova et al. 2017). In both cases, we started our analyses with a global model that included all variables and their interactions. To avoid overfitting, because our sample size was small, model comparisons were based on the corrected Akaike Information Criterion (AICc) and were conducted with the function *dredge* of *MuMIn* package in R (Legendre and Legendre 1998; Burnham and Anderson 2002). According to this function, models are ranked according to their AICc values, and the model with the lowest AICc is considered the best, whereas those with an AICc value difference less than 2 with the AICc value of the best model are considered models with substantial support (Burnham and Anderson 2002).

Assumptions of normality and homogeneity of variance were tested with the Shapiro-Wilk's test and with the Levene test, respectively. When the assumptions of normality and/or homogeneity of variance were not met, we used the corresponding non-parametric test, such as Mann-Whitney rank-sum tests. Means are given with ± 1 standard error (SE).

Results

Field body temperatures (T_b) and initial preferred body temperatures (initial- T_p)

The mean T_b for adult males was 30.61 ± 0.54 °C (27.30 - 36.50 °C, $N = 21$). The mean initial- T_p calculated in the laboratory 2 or 3 days after capture and before the acclimation period was 34.93 ± 0.31 °C ($T_{p \text{ max}} = 39.43 \pm 0.29$ °C and $T_{p \text{ min}} = 30.41 \pm 0.57$ °C), with a set-point of T_p (T_{set}) ranging between 33.60 to 36.43 °C ($N = 21$). The T_b for adult males was significantly lower than the selected T_p in laboratory (t -test, $t_{40} = -4.551$, $P < 0.001$). Since all newborns were born in laboratory, we did not have equivalent initial- T_p data for them.

Health status of individuals

We observed no injuries or ectoparasites in the captured lizards and only 3 males had a regenerated tail. Mean values of the morphological variables (SVL and BM) in adult males, pregnant females and newborns, as well as the mean values of the body condition (BC) in adult males and newborns are presented in Table I.

The BC of adult males (used for LPS experimentation) did not change in the laboratory during acclimation ($BC_{1 \text{ males}} \text{ vs } BC_{2 \text{ males}}$; Paired t -test, $t_{17} = 0.495$, $P = 0.627$, $N = 18$). Newborns did not change their BC (post-natal compared to onset of LPS-experiment; $BC_{1 \text{ newborn}} \text{ vs } BC_{2 \text{ newborn}}$; Paired t -test, $t_{13} = 1.916$, $P = 0.078$, $N = 14$).

Phytohemagglutinin (PHA) skin-swelling assay.

The inflammatory response to PHA injection did not show significant associations with body condition ($BC_{1 \text{ males}}$) before injection (Simple Linear Regression: $F_{1,20} = 0.0002$, $P = 0.989$), nor 2h after (Linear Regression: $F_{1,20} = 0.071$, $P = 0.794$), 20h after (Linear Regression: $F_{1,20} = 0.254$, $P = 0.620$) or 48h after PHA injections (Linear Regression: $F_{1,20} = 1.315$, $P = 0.266$).

The comparison of right versus left sole pad thicknesses over time in males showed a significant effect of treatment factor (PHA vs PBS), time factor (prior injections vs 2h, 20h, and

48h post-injection) and the interaction of treatment \times time (Table II). Right and left sole pad thicknesses did not differ prior to injections (Tukey test, $t_{\text{PHA vs PBS}} = -1.225$, $P = 0.923$, $N = 21$), 2h afterwards ($t_{\text{PHA vs PBS}} = 0.895$, $P = 0.986$) or 48h after injection ($t_{\text{PHA vs PBS}} = 2.835$, $P = 0.094$; Fig. 1). However, the PHA treatment caused detectable thickening of 0.14 mm at 20h compared to the left sole pad at the same time (Tukey test, $t_{\text{PHA vs PBS}} = 3.936$, $P < 0.005$; Fig. 1). The comparison of the treated right-side sole pad over time showed they became 0.11 mm thicker at 2h and 0.13 mm thicker at 20h after injection (Tukey test, $t_{\text{before vs 2h}} = 3.110$, $P < 0.045$, $t_{\text{before vs 20h}} = 3.702$, $P < 0.005$, $N = 21$) but not at 48h after injection ($t_{\text{before vs 48h}} = 0.578$, $P = 0.999$; Fig 1).

Effect of LPS on T_p and BC in males and newborns

The body condition (BC_2 males measured before the LPS-PBS experiment) and the initial- T_p were not different between the males assigned to the treatment (LPS) and control (PBS) groups (t -test BC , $t_{16} = 0.125$, $P = 0.902$; t -test $\text{initial-}T_p$, $t_{16} = 1.188$, $P = 0.252$). The newborns assigned to the treatment (LPS) and control (PBS) groups did not differ in neither the BC_2 before the experiment (t -test, $t_{12} = 0.349$, $P = 0.733$) nor the T_p obtained 24h before the injections (Mann–Whitney test, $U = 17.000$, $P = 0.371$).

There were significant main effects of treatment (LPS vs PBS) and time (24h before and 2h, 24h, 48h, and 72h post-injection), and their interaction in T_p (Table III). Individuals in the LPS-treatment had a mean T_p 2.69 °C higher than individuals of PBS-control at 2h after injection (Tukey test, $t_{\text{2h LPS vs 2h PBS}} = -4.006$, $P < 0.005$), but at all other times they did not show differences (Tukey test, $P > 0.05$). The comparison of the effect of either LPS or PBS on T_p over time showed that individuals of the LPS-treatment did not show differences and maintained their T_p over time (Tukey test, $P > 0.05$; Fig. 2). In contrast, individuals of the PBS-control decreased 3.09 °C the T_p 2h post-injection (Tukey test, $t_{\text{24h before vs 2h post}} = -5.088$, $P < 0.001$). And then recovery their T_p values, increasing 1.99 °C T_p 24h post-injection (Tukey test,

$t_{2h\ post\ vs\ 24h\ post} = -3.279$, $P < 0.043$), and $2.48\ ^\circ\text{C}\ T_p$ 48h post-injection (Tukey test, $t_{2h\ post\ vs\ 48h\ post} = -4.006$, $P < 0.005$), and $2.89\ ^\circ\text{C}\ T_p$ 72h post-injection (Tukey test, $t_{2h\ post\ vs\ 72h\ post} = -4.635$, $P < 0.005$; Fig. 2).

The body condition did not vary with time in males injected with LPS nor PBS (Table IV). There were also no differences between the two groups (LPS vs PBS) in the body condition after experiments ($BC_3\ males$: t -test, $t_{16} = 0.211$, $P = 0.835$). On the other hand, the body condition of LPS-challenged newborns decreased with time; in particular, $BC_2\ newborn$ was higher than $BC_3\ newborn$ (Table IV). Newborns of the control group showed no change in BC during the experiments (Table IV).

Discussion

The absence of injuries or ectoparasites, as well as the homogeneous body condition observed in the captured individuals, suggest that the wild population is in good health. In addition, the PHA assay in adult males showed a temporary and localized inflammatory response related to a stimulation of T-cell proliferation (Roitt et al. 1996, Martin et al. 2006), thus confirming the immunocompetence of *L. kingii* as described in other lizards (Cabido 2009, Iglesias-Carrasco et al. 2016, Duran et al. 2020).

Our results on thermoregulation are in agreement with an early review of the topic, which considered that most physiological processes progress optimally near T_p (Dawson 1975), including immune responses for which temperatures above T_p , not only present a challenge to enzymatic function, but also were shown to reduce non-specific leukocyte activity and antibody titers in several reptile species (Dawson, 1975; Zimmerman et al. 2010). By providing controlled environments with thermal gradients, LPS-challenged *L. kingii* behaviorally thermoregulated within the set point of T_p more precisely, and at higher temperatures, than sham-challenged individuals (Fig. 3a). This included the LPS-challenged newborns which, as

observed in some juvenile iguanas (*Iguana iguana*; Deen & Hutchison 2001, < 1 yr old), were able to develop different T_p than the sham-control group. Thus, our study found that *L. kingii* newborns have the capacity to raise and maintain their temperature within a narrow range as a response to the bacterial pyrogen LPS (Fig. 3b). However, little is known about the characteristics of the immune responses in newborn reptiles (Brown & Shine 2016) or the changes in physiology and behavior in the face of an immune challenge. In mammals, for instance, newborns were unable to develop fever physiologically in response to bacterial pyrogens but did so behaviorally when they were provided with a thermal gradient (behavioral fever; Satinoff et al. 1976, Kleitman & Satinoff 1981).

Most males and some newborns of the sham-challenged group significantly decreased their T_p 2h after the PBS injection. Inflammatory processes, both sterile and infectious, occur after activation of toll-like receptors (TLRs; Beutler 2004) through the recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and damage-associated molecular patterns (DAMPs) on leukocytes (Nourshargh & Alon 2014). Neutrophils constitute the first line of defense during an infection or tissue injury by regulating the adaptive immune response through B-cell and T-cell activation (Hidalgo et al. 2019). Research on sterile tissue injury in mice has shown that accumulation of neutrophils at the damage site occurs during the first hour, with those present at the injury site forming clusters (Ng et al. 2011). On the contrary, the injection of LPS activates recognition of PAMPs by TLRs with neutrophils continuing to migrate to the infected site producing dynamic clusters showing a swarming behavior (Chtanova et al. 2008). Those studies demonstrated that DAMPs as well as PAMPs regulate inflammation controlling neutrophil infiltration (Ng et al. 2011). Therefore, in the absence of pathogens, early neutrophil infiltration can activate vasodilation mechanisms such as production of nitric oxide (Skovgaard et al. 2005), thus inducing short-term hypothermia as it was observed here in the behavioral thermoregulation of sham-challenged *L. kingii*.

Maintaining body temperature within the set point of T_p can be advantageous to avoid the costs of thermoregulation. Most importantly, metabolic costs include increasing metabolic rates about 10% every 1 °C increment (Kluger 1979, Boltaña et al. 2013), and consequently the depletion of fat bodies (Huey 1974, Adolph & Porter 1993). Other costs include greater exposure to predators as they spend more time outside shelters for thermoregulation (Herczeg et al. 2008, Zamora-Camacho et al. 2016), leaving less time to allocate to reproduction, feeding, social interactions, and other functions. Although there are examples of lizard species reaching up to 2 °C above the mean T_p in response to LPS exposures, e.g. *Dipsosaurus dorsalis* (Vaughn et al. 1974), *Callopiastes maculatus* (Hallman et al. 1990), *Agama agama* (Ramos et al. 1993), and *Oplurus cyclurus* (Muchlinski et al. 1995); other species do not increase T_b nor develop hypothermia after the injection of a pyrogen, as shown in the armadillo lizard *Cordylus cataphractus* (Laburn et al. 1981), the lizard *Anolis equestris* (Muchlinski et al. 1995), and the alpine lizard *Psammodromus algirus* (Zamora-Camacho et al. 2016). In the present study, LPS-challenged lizards raised their body temperature but maintained it within the limits of their T_{set} , avoiding maximum critical temperatures (CT_{max} ; Fig. 3). In this way, lizards under a pathogen threat may enhance their immune response, while at the same time maintaining enzymatic functions, locomotor performance and, ultimately, securing their survival (Angilletta 2009).

Changes in body temperature of a few degrees °C above normothermia as a consequence of pyrogenic infection have a significant energy cost (Sherman & Stephen 1998). Adult males did not show significant changes in BC while in captivity (from capture to 72h after the LPS experiment); nor did BC differ between control and treatment lizards. On the other hand, newborns treated with LPS (unlike controls) showed a significant decrease in BC over time. This indicates an allocation of fat reserves to the immune response, pointing out the newborns' vulnerability to pathogens and the consequent selective pressure that pathogens exert on natural populations. Present results confirm our prediction since LPS-challenged newborns seem to

have compromised their body condition at expenses of maintaining body temperatures within a narrow range of T_{set} .

Environmental constraints on thermoregulation seem to play a key role in the immune responses of *Liolaemus*. The only study that focused on thermoregulatory responses to LPS in *Liolaemus* genus, has been carried out in a phylogenetically close related species *L. sarmientoi* (Duran et al., 2020). Both *L. kingii* and *L. sarmientoi* demonstrated a large gap between the T_b they can attain in the field, and the T_p obtained in a thermal gradient in the laboratory. *Liolaemus kingii* inhabits milder environments (air temperature 10.28 °C) than the southernmost *L. sarmientoi* (8.64 °C) (mean air temperatures during the activity period of lizards, September to April, were obtained from CONICET historical data registered for studies of global warming for Argentina, 3CN database, <http://3cn.cima.fcen.uba.ar/index1.php> from 1960 to 2010). Therefore, environmental differences appear to have shaped distinct evolutionary pathways for thermal responses to immune challenges: hypothermia in *L. sarmientoi* (Duran et al. 2020) or maintenance of high and stable T_p in *L. kingii*.

Environmental changes caused by anthropogenic impact, such as the use of the land for animal production or mineral extraction, as well as climate warming could trigger niche tracking, challenging resident populations with new pathogens threats requiring an acceleration of adaptive evolution for population viability. The present study shows the capacity of lizards to cope with immune challenges by means of behavioral thermoregulation, but also points out that such thermoregulatory demands can be detrimental to the body condition of newborns.

Acknowledgments

We thank Dr. M. Medina for her help with the capture of individuals and field trips. We thank Dr. N. Vicenzi for her help with the statistical analyzes and interpretations. We thank Dr. J.D. Krenz for the English revision and review of the manuscript. This work was supported by

Universidad Nacional del Comahue (grant number 04/B196), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, PIP-11220120100676), and by Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCyT) PICT2017-0553.

Author Contributions

Fernando Duran conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, prepared figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft. Jorgelina M. Boretto conceived and designed the experiments, performed the experiments, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft. Leandro A. Becker authored or reviewed drafts of the paper, approved the final draft. Nora R. Ibargüengoytía conceived and designed the experiments, performed the experiments, authored or reviewed drafts of the paper, approved the final draft.

References

- ABDALA CS, ACOSTA JL, ACOSTA JC, ÁLVAREZ BB, ARIAS F, ÁVILA LJ, BLANCO MG, BONINO M, BORETTO JM, BRANCATELLI G, ET AL. 2012. Categorización del estado de conservación de las lagartijas y anfisbenas de la República Argentina. Cuad Herpetol 26: 215-248.
- ADOLPH SC & PORTER WP. 1993. Temperature, activity, and lizard life histories. Am Nat 142(2): 273-295.
- ANGILLETTA MJ. JR. 2009. Thermal adaptation: a theoretical and empirical synthesis. Oxford University Press, Oxford.
- APARICIO J & OCAMPO M. 2010. *Liolaemus* grupo montanus Etheridge, 1995 (Iguania–Liolaemidae). Cuad Herpetol 24(2): 133-135.

- ATKINS E. 1982. Fever: its history, cause, and function. *The Yale Journal of Biology and Medicine* 55(3-4): 283-289.
- BARR M, GLENNY AT & HOWIE JW. 1953. Active immunisation of ewes and their lambs. *J Pathol Bacteriol* 65(1): 155-168.
- BATES D, MAECHLER M, BOLKER B & WALKER S. 2015. Fitting linear mixed effects models using lme4. *J. Stat. Softw.* 67(1): 1-48.
- BERNHEIM HA & KLUGER MJ. 1976. Fever and antipyresis in the lizard *Dipsosaurus dorsalis*. *Am J Physiol* 231(1): 198-203. [doi: 10.1152/ajplegacy.1976.231.1.198](https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1976.231.1.198).
- BEUTLER B. 2004. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 430(6996): 257-263.
- BICEGO KC, BARROS RC, & BRANCO LG. 2007. Physiology of temperature regulation: comparative aspects. *Comp Biochem Physiol A: Mol Integr Physiol* 147(3): 616-639. [doi: 10.1016/j.cbpa.2006.06.032](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.06.032).
- BOLTAÑA S, REY S, ROHER N, VARGAS R, HUERTA M, HUNTINGFORD FA, GOETZ FW, MOORE J, GARCIA-VALTANEN P, ESTEPA A, ET AL. 2013. Behavioural fever is a synergic signal amplifying the innate immune response. *Proc R Soc B: Biol Sci* 280(1766): 20131381. [doi: 10.1098/rspb.2013.1381](https://doi.org/10.1098/rspb.2013.1381).
- BREITMAN MF, MINOLI I, AVILA LJ, MEDINA CD, SITES JR. JW, & MORANDO M. 2014. Lagartijas de la provincia de Santa Cruz, Argentina: distribución geográfica, diversidad genética y estado de conservación. *Cuad Herpetol* 28: 83-110.
- BROWN GP & SHINE R. 2016. Maternal body size influences offspring immune configuration in an oviparous snake. *Roy Soc Open Sci* 3(3): 160041. [doi: 10.1098/rsos.160041](https://doi.org/10.1098/rsos.160041).
- BRONSTEIN SM & CONNER WE. 1984. Endotoxin-induced behavioural fever in the Madagascar cockroach, *Gromphadorhina portentosa*. *J Insect Physiol* 30(4): 327-330. [doi: 10.1016/0022-1910\(84\)90134-3](https://doi.org/10.1016/0022-1910(84)90134-3).

- BURNHAM KP & ANDERSON DR. 2002. Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach. 2nd ed, Springer Verlag, Inc. New York, 515 p.
- BURNS G, RAMOS A & MUCHLINSKI A. 1996. Fever response in North American snakes. *J Herpetol* 30(2): 133-139. [doi: 10.2307/1565503](https://doi.org/10.2307/1565503).
- CABIDO C. 2009. Evolución de las señales implicadas en los procesos de selección sexual de las lagartijas serranas ibéricas. PhD thesis, Universidad de A Coruña, A Coruña.
- CASTERLIN ME & REYNOLDS WW. 1977a. Behavioral fever in anuran amphibian larvae. *Life Sciences* 20(4): 593-596. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(77\)90461-1](https://doi.org/10.1016/0024-3205(77)90461-1).
- CASTERLIN ME & REYNOLDS WW. 1977b. Behavioral fever in crayfish. *Hidrobiologia* 56(2): 99-101. [doi: 10.1007/BF00023345](https://doi.org/10.1007/BF00023345).
- CHANDRA RK & NEWBERNE PM. 1977. Nutrition, immunity and infection: mechanisms of interactions. Plenum, New York.
- CHTANOVA T, SCHAEFFER M, HAN SJ, VAN DOOREN GG, NOLLMANN M, HERZMARK P, WEICHAN S, SATIJA H, CAMFIELD K, AARON H, ET AL. 2008. Dynamics of neutrophil migration in lymph nodes during infection. *Immunity* 29(3): 487-496. [doi: 10.1016/j.immuni.2008.07.012](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.07.012).
- CLULOW S, HARRIS M & MAHONY MJ. 2015. Optimization, validation and efficacy of the phytohaemagglutinin inflammation assay for use in ecoimmunological studies of amphibians. *Conserv Physiol* 3:cov042. [doi: 10.1093/conphys/cov042](https://doi.org/10.1093/conphys/cov042).
- COVERT JB & REYNOLDS WW. 1977. Survival value of fever in fish. *Nature* 267(5606): 43.
- DAWSON WR. 1975. On the physiological significance of the preferred body temperatures of reptiles. In *Perspectives of biophysical ecology* (pp. 443-473). Springer, Berlin, Heidelberg. [doi: 10.1007/978-3-642-87810-7_25](https://doi.org/10.1007/978-3-642-87810-7_25).

- DEEN CM & HUTCHISON VH. 2001. Effects of lipopolysaccharide and acclimation temperature on induced behavioral fever in juvenile *Iguana iguana*. *J Therm Biol* 26: 55-63. [doi: 10.1016/S0306-4565\(00\)00026-7](https://doi.org/10.1016/S0306-4565(00)00026-7).
- DURAN F, BORETTO JM & IBARGÜENGOYTÍA NR. 2020. Decrease in preferred temperature in response to an immune challenge in lizards from cold environments in Patagonia, Argentina. *J Therm Biol* 102706. doi: 10.1016/j.jtherbio.2020.102706.
- ELLIOT SL, HORTON CM, BLANFORD S & THOMAS MB. 2005. Impacts of fever on locust life-history traits: costs or benefits?. *Biol. Letters* 1(2): 181-184. [doi: 10.1098/rsbl.2004.0279](https://doi.org/10.1098/rsbl.2004.0279).
- FEDSON DS. 2018. Influenza, evolution, and the next pandemic. *Evolution, medicine, and public health*, 2018(1): 260-269. [doi: 10.1093/emph/eoy027](https://doi.org/10.1093/emph/eoy027).
- FRENCH SS & MOORE MC. 2008. Immune function varies with reproductive stage and context in female and male tree lizards, *Urosaurus ornatus*. *Gen Comp Endocr* 155(1): 148-156. [doi: 10.1016/j.ygcen.2007.04.007](https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2007.04.007).
- GANESHAN K, NIKKANEN J, MAN K, LEONG YA, SOGAWA Y, MASCHEK JA, RY TV, CHAGWEDERA DN, COX JE & CHAWLA A. 2019. Energetic trade-offs and hypometabolic states promote disease tolerance. *Cell* 177(2): 399-413. [doi: 10.1016/j.cell.2019.01.050](https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.050).
- GENSOLLEN T, IYER SS, KASPER DL & BLUMBERG RS. 2016. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science* 352(6285): 539-544. [doi: 10.1126/science.aad9378](https://doi.org/10.1126/science.aad9378).
- GLENNY AT, POPE CG, WADDINGTON H & WALLACE U. 1925. Immunological notes. I.-VII. *J Pathol Bacteriol* 28(2): 333-344. [doi: 10.1002/path.1700280221](https://doi.org/10.1002/path.1700280221).

- GRAHAM AL, ALLEN JE & READ AF. 2005. Evolutionary causes and consequences of immunopathology. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 36: 373-397. [doi:10.1146/annurev.ecolsys.36.102003.152622](https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.36.102003.152622).
- GRAHAM AL, SHUKER DM, POLLITT LC, AULD SK, WILSON AJ & LITTLE TJ. 2011. Fitness consequences of immune responses: strengthening the empirical framework for ecoimmunology. *Funct Ecol* 25(1): 5-17. [doi: 10.1111/j.1365-2435.2010.01777.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01777.x).
- HALLMAN GM, ORTEGA CE, TOWNER MC & MUCHLINSKI AE. 1990. Effects of bacterial pyrogen on three lizard species. *Comp Biochem Phys A*. 96: 383-386.
- HERCZEG G, HERRERO A, SAARIKIVI J, GONDA A, JÄNTTI M & MERILÄ J. 2008. Experimental support for the cost–benefit model of lizard thermoregulation: the effects of predation risk and food supply. *Oecologia* 155(1): 1-10. [doi: 10.1007/s00442-007-0886-9](https://doi.org/10.1007/s00442-007-0886-9).
- HIDALGO A, CHILVERS ER, SUMMERS C & KOENDERMAN L. 2019. The neutrophil life cycle. *Trends in immunology*. [doi: 10.1016/j.it.2019.04.013](https://doi.org/10.1016/j.it.2019.04.013).
- HOWIE JW, BARR M & GLENNY AT. 1953. The effect of diet and of the interval between toxoid injections upon diphtheria-antitoxin levels in blackface ewes and their lambs. *J Pathol Bacteriol* 65(1): 143-154.
- HUEY RB. 1974. Behavioral thermoregulation in lizards: importance of associated costs. *Science* 184: 1001-1003. [doi: 10.1126/science.184.4140.1001](https://doi.org/10.1126/science.184.4140.1001).
- HUYGHE K, VAN OYSTAEYEN A, PASMANS F, TADIĆ Z, VANHOOYDONCK B & VAN DAMME R. 2010. Seasonal changes in parasite load and a cellular immune response in a colour polymorphic lizard. *Oecologia* 163(4): 867-874. [doi: 10.1007/s00442-010-1646-9](https://doi.org/10.1007/s00442-010-1646-9).
- IBARGÜENGOYTÍA NR, HALLOY M & CROCCO M. 2002. El parto en el lagarto *Liolaemus kingii* (Sauria: Liolaemidae): observaciones etológicas. *Cuad Herpetol* 16: 129-135.

- IBARGÜENGOYTÍA NR, MEDINA SM, FERNÁNDEZ JB, GUTIÉRREZ JA, TAPPARI F & SCOLARO A. 2010. Thermal biology of the southernmost lizards in the world: *Liolaemus sarmientoi* and *Liolaemus magellanicus* from Patagonia, Argentina. *J Therm Biol* 35: 21-27. [doi: 10.1016/j.jtherbio.2009.10.003](https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2009.10.003).
- IGLESIAS-CARRASCO M, HEAD M & CABIDO C. 2016. Habitat dependent effects of experimental immune challenge on lizard anti-predator responses. *Behav Ecol Sociobiol* 70(11): 1931-1939. [doi: 10.1007/s00265-016-2199-7](https://doi.org/10.1007/s00265-016-2199-7).
- JOACHIM R, SUBER F & KOBZIK L. 2017. Characterising pre-pubertal resistance to death from endotoxemia. *Scientific reports* 7(1): 1-13. [doi: 10.1038/s41598-017-16743-1](https://doi.org/10.1038/s41598-017-16743-1).
- KERR WR & ROBERTSON M. 1954. Passively and actively acquired antibodies for *Trichomonas foetus* in very young calves. *J Hyg-Cambridge* 52(2): 253-263. [doi: 10.1017/S0022172400027455](https://doi.org/10.1017/S0022172400027455).
- KLEITMAN N & SATINOFF E. 1981. Behavioral responses to pyrogen in cold-stressed and starved newborn rabbits. *Am J Physiol-Reg I* 241(3): R167-R172. [doi: 10.1152/ajpregu.1981.241.3.R167](https://doi.org/10.1152/ajpregu.1981.241.3.R167).
- KLUGER MJ. 1977. Fever in the frog *Hyla Cinerea*. *J Therm Biol* 2: 79-81. [doi: 10.1016/0306-4565\(77\)90042-0](https://doi.org/10.1016/0306-4565(77)90042-0).
- KLUGER MJ. 1979. Fever in ectotherms: evolutionary implications. *Am Zool* 19(1): 295-304. [doi: 10.1093/icb/19.1.295](https://doi.org/10.1093/icb/19.1.295).
- KLUGER MJ. 1986. Is fever beneficial?. *The Yale Journal of Biology and Medicine* 59: 89-95.
- KLUGER MJ, RINGLER DH & ANVER MR. 1975. Fever and survival. *Science* 188(4184): 166-168. [doi: 10.1126/science.188.4184.166](https://doi.org/10.1126/science.188.4184.166).
- KUZNETSOVA A, BROCKHOFF PB & CHRISTENSEN RHB. 2017. lmerTest package: test in linear mixed effects models. *J Stat Softw.* 82(13): 1-26.

- LABRA A, PIENAAR J & HANSEN TF. 2009. Evolution of thermal physiology in *Liolaemus* lizards: adaptation, phylogenetic inertia, and niche tracking. *Am Nat* 174(2): 204-220.
- LABURN HP, MITCHELL D, KENEDIE & LOUW GN. 1981. Pyrogens fail to produce fever in a cordylid lizard. *Am J Physiol-Reg I* 241(3): R198-R202. [doi: 10.1152/ajpregu.1981.241.3.R198](https://doi.org/10.1152/ajpregu.1981.241.3.R198).
- LEGENDRE P & LEGENDRE L. 1998. *Numerical Ecology*. 2nd edn. Elsevier Science, Amsterdam.
- LIU E, LEWIS K, AL-SAFFAR H, KRALL CM, SINGH A, KULCHITSKY VA, CORRIGAN JJ, SIMONS CT, PETERSEN SR, MUSTEATA FM, ET AL. 2012. Naturally occurring hypothermia is more advantageous than fever in severe forms of lipopolysaccharide-and *Escherichia coli*-induced systemic inflammation. *Am J Physiol-Reg I* 302(12): R1372-R1383. [doi: 10.1152/ajpregu.00023.2012](https://doi.org/10.1152/ajpregu.00023.2012).
- LÓPEZ P, GABIROT M & MARTÍN J. 2009. Immune activation affects chemical sexual ornaments of male Iberian wall lizards. *Naturwissenschaften* 96(1): 65-69. [doi: 10.1007/s00114-008-0451-3](https://doi.org/10.1007/s00114-008-0451-3).
- MARTIN LB, HAN P, LEWITTES J, KUHLMAN JR, KLASING KC & WIKELSKI M. 2006. Phytohemagglutinin- induced skin swelling in birds: histological support for a classic immunoecological technique. *Funct Ecol* 20(2): 290-299. [doi: 10.1111/j.1365-2435.2006.01094.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2006.01094.x).
- MEGÍA-PALMA R, PARANJPE D, BLAIMONT P, COOPER R & SINERVO B. 2020. To cool or not to cool? Intestinal coccidians disrupt the behavioral hypothermia of lizards in response to tick infestation. *Ticks tick-borne-dis* 11(1), 101275. [doi: 10.1016/j.ttbdis.2019.101275](https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101275).

- MERCHANT M, FLEURY L, RUTHERFORD R & PAULISSEN M. 2008. Effects of bacterial lipopolysaccharide on thermoregulation in green anole lizards (*Anolis carolinensis*). *Vet. Immunol. Immunop* 125(1-2): 176-181. [doi: 10.1016/j.vetimm.2008.04.014](https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.04.014).
- MONAGAS WR & GATTEN RE. 1983. Behavioural fever in the turtles *Terrapene carolina* and *Chrysemys picta*. *J Therm Biol* 8(3): 285-288. [doi: 10.1016/0306-4565\(83\)90010-4](https://doi.org/10.1016/0306-4565(83)90010-4).
- MUCHLINSKI AE, ESTANY A & DON MT. 1995. The response of *Anolis equestris* and *Oplurus cyclurus* (Reptilia: Iguanidae) to bacterial endotoxin. *J Therm Biol* 20(4): 315-320.
- NG LG, QIN JS, ROEDIGER B, WANG Y, JAIN R, CAVANAGH LL, SMITH LA, JONES CA, VEER M, GRIMBALDESTON MA, ET AL. 2011. Visualizing the neutrophil response to sterile tissue injury in mouse dermis reveals a three-phase cascade of events. *J Invest Dermatol* 131(10): 2058-2068. [doi: 10.1038/jid.2011.179](https://doi.org/10.1038/jid.2011.179).
- NOURSHARGH S & ALON R. 2014. Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity* 41(5): 694-707. [doi: 10.1016/j.immuni.2014.10.008](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.008).
- ORTEGA CE, STRANC DS, CASAL MP, HALLMAN GM & MUCHLINSKI AE. 1991. A positive fever response in *Agama agama* and *Sceloporus orcutti* (Reptilia: Agamidae and Iguanidae). *J Comp Physiol B* 161: 377-381. [doi: 10.1007/BF00260796](https://doi.org/10.1007/BF00260796).
- PARUELO JM, BELTRAN A, JOBBAGY E, SALA OE & GOLLUSCIO RA. 1998. The climate of Patagonia: general patterns and controls on biotic. *Ecol Austral* 8: 85-101.
- PEIG J & GREEN AJ. 2009. New perspectives for estimating body condition from mass/length data: the scaled mass index as an alternative method. *Oikos* 118(12): 1883-1891. [doi: 10.1111/j.1600-0706.2009.17643.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2009.17643.x).
- PEIG J & GREEN AJ. 2010. The paradigm of body condition: a critical reappraisal of current methods based on mass and length. *Func Ecol* 24(6): 1323-1332. [doi: 10.1111/j.1365-2435.2010.01751.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01751.x).

[R CORE TEAM. 2021. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org/>](#)

RAKUS K, RONSMANS M & VANDERPLASSCHEN A. 2017. Behavioral fever in ectothermic vertebrates. *Dev Comp Immunol* 66: 84-91. [doi: 10.1016/j.dci.2016.06.027](https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.06.027).

RAMOS AB, DON MT & MUCHLINSKI AE. 1993. The effect of bacteria infection on mean selected body temperature in the common Agama, *agama agama*: a dose-response study. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol* 105(3): 479-484. [doi: 10.1016/0300-9629\(93\)90423-2](https://doi.org/10.1016/0300-9629(93)90423-2).

REYNOLDS WW, CASTERLIN ME & COVERT JB. 1976. Behavioural fever in teleost fishes. *Nature* 259(5538): 41-42.

RIDGE JP, FUCHS EJ & MATZINGER P. 1996. Neonatal Tolerance Revisited: Turning on Newborn T Cells with Dendritic Cells. *Science* 271(5256): 1723-1726. [doi: 10.1126/science.271.5256.1723](https://doi.org/10.1126/science.271.5256.1723).

ROITT I, BROSTOFF J & MALE D. 1996. *Immunology*. Mosby, London.

ROMANOVSKY AA & SZÉKELY M. 1998. Fever and hypothermia: Two adaptive thermoregulatory responses to systemic inflammation. *Med Hypotheses* 50: 219-226.

ROMANOVSKY AA, ALMEIDA MC, ARONOFF DM, IVANOV AI, KONSMAN JP, STEINER AA & TUREK VF. 2005. Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions. *Front Biosci* 10(10): 2193-2216.

RUSSELL L. 2019. emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R package version 1.3.5.1. <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>.

SATINOFF E, MCEWEN GN & WILLIAMS BA. 1976. Behavioral fever in newborn rabbits. *Science* 193(4258): 1139-1140. [doi: 10.1126/science.959829](https://doi.org/10.1126/science.959829).

SCHULTE JA, MACEY RJ, ESPINOZA RE & LARSON A. 2000. Phylogenetic relationships in the iguanid lizard genus *Liolaemus*: multiple origins of viviparous reproduction and

- evidence for recurring Andean vicariance and dispersal. *Biol J Linn Soc* 69(1): 75-102. [doi: 10.1111/j.1095-8312.2000.tb01670.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2000.tb01670.x).
- SCOLARO JA. 2005. Reptiles Patagónicos Sur: una guía de campo. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Trelew.
- SHERMAN E & STEPHENS A. 1998. Fever and metabolic rate in the toad *Bufo marinus*. *J Therm Biol* 23: 49-52.
- SKOVGAARD N, GALLI G, ABE A, TAYLOR EW & WANG T. 2005. The role of nitric oxide in regulation of the cardiovascular system in reptiles. *Comp Biochem Phys A* 142(2): 205-214. [doi: 10.1016/j.cbpb.2005.05.049](https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.05.049).
- SMITH GD & FRENCH SS. 2017. Physiological trade-offs in lizards: costs for individuals and populations. *Integr Comp Biol* 57(2): 344-351. [doi: 10.1093/icb/ix062](https://doi.org/10.1093/icb/ix062).
- SMITS JE, BORTOLOTTI GR & TELLA JL. 1999. Simplifying the phytohaemagglutinin skin-testing technique in studies of avian immunocompetence. *Funct Ecol* 13: 567-572. [doi: 10.1046/j.1365-2435.1999.00338.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.1999.00338.x).
- STAHLSCHMIDT ZR & ADAMO SA. 2013. Context dependency and generality of fever in insects. *Naturwissenschaften* 100: 691-696. [doi: 10.1007/s00114-013-1057-y](https://doi.org/10.1007/s00114-013-1057-y).
- STEINER AA & ROMANOVSKY AA. 2019. Energy Trade-offs in Host Defense: Immunology Meets Physiology. *Trends Endocrin Met* 30(12): 875-878. [doi: 10.1016/j.tem.2019.08.012](https://doi.org/10.1016/j.tem.2019.08.012).
- SVENSSON E, SINERVO B & COMENDANT T. 2001. Density dependent competition and selection on immune function in genetic lizard morphs. *P Natl Acad Sci USA*. 98: 12561-12565. [doi: 10.1073/pnas.211071298](https://doi.org/10.1073/pnas.211071298).
- ULLER T, ISAKSSON C & OLSSON M. 2006. Immune challenge reduces reproductive output and growth in a lizard. *Funct Ecol* 20(5): 873-879. [doi: 10.2307/3806596](https://doi.org/10.2307/3806596).

- VAUGHN LK, BERNHEIM HA & KLUGER MJ. 1974. Fever in the lizard *Dipsosaurus dorsalis*. *Nature* 252(5483): 473-474. [doi: 10.1038/252473a0](https://doi.org/10.1038/252473a0).
- VINEY ME, RILEY EM & BUCHANAN KL. 2005. Optimal immune responses: Immunocompetence revisited. *Trends Ecol Evol* 20: 665-669. [doi: 10.1016/j.tree.2005.10.003](https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.10.003).
- ZAMORA-CAMACHO FJ, REGUERA S, RUBIÑO-HISPÁN MV & MORENO-RUEDA G. 2015. Eliciting an immune response reduces sprint speed in a lizard. *Behav Ecol* 26(1): 115-120. [doi: 10.1093/beheco/aru170](https://doi.org/10.1093/beheco/aru170).
- ZAMORA-CAMACHO FJ, REGUERA S & MORENO-RUEDA G. 2016. Elevational variation in body-temperature response to immune challenge in a lizard. *PeerJ* 4: e1972. [doi: 10.7717/peerj.1972/supp-1](https://doi.org/10.7717/peerj.1972/supp-1).
- ZIMMERMAN LM, VOGEL LA & BOWDEN RM. 2010. Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective. *J Exp Biol* 213(5): 661-667. [doi: 10.1242/jeb.038315](https://doi.org/10.1242/jeb.038315).

Figure Captions

Figure 1. Box plot of the effect of the injection on the right posterior sole pad (PHA, treatment; black box) and on the left posterior sole pad (PBS, control; white box) in adult males of *Liolaemus kingii* performed to analyze the inflammatory responses during the experiment. The medians, 5%, 25%, 75% and 95% percentiles of the frequencies are indicated. Asterisks indicate significant differences between the treatment and control groups ($P < 0.05$). The letters indicate the differences among the four treatment groups: previous, 2h, 20h, and 48h after the injection of PHA ($P < 0.05$).

Figure 2. Mean preferred body temperatures (T_p) and their standard deviations during LPS-treatment or PBS-control over time (24h before and 2h, 24h, 48h, and 72h post-injection) for individuals of *Liolaemus kingii*. Dashed line indicates the mean T_p before injection.

Figure 3. Mean preferred body temperatures (T_p) of each of the treated individuals (LPS, treatment; on the left) and control individuals (PBS, control; on the right) over time (h) for males (a) and newborns (b) of *Liolaemus kingii*. The mean T_p , upper T_{set} , lower T_{set} , mean $T_{p\ max}$, and mean $T_{p\ min}$ recorded before the trials are shown.