



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL  
EFECTO DEL PROCESO REPRODUCTIVO SOBRE LA CONDUCTA  
TERRITORIAL, EL SISTEMA INMUNOLÓGICO Y DE HORMONAS SEXUALES  
ESTEROIDES EN EL ORDEN CROCODYLIA

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE**  
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

**PRESENTA**

MVZ. ANA BELEM ARIAS GARCÍA

**DIRECTOR DE TESIS**

DR. CARLOS GONZÁLEZ-REBELES ISLAS (FMVZ, UNAM)

**COMITÉ TUTOR**

DR. ISAAC GONZÁLEZ SANTOYO (Facultad de Psicología, UNAM)  
DR. ALEJANDRO VILLEGAS CASTILLO (Facultad de Ciencias, UNAM)  
**ACADÉMICO INVITADO:** DRA. ANA DELIA RODRÍGUEZ CORTEZ (FMVZ, UNAM)

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, ENERO 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIA

A mi papá y mamá, por su amor, trabajo, paciencia y sacrificio en todos estos años, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí.

A todas las personas que me han apoyado y ayudado para que mi trabajo se realizara con éxito, en especial a aquellos que me abrieron las puertas y compartieron sus conocimientos.

A Haku por su cariño y apoyo incondicional

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi gratitud a la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por abrirme las puertas y permitirme realizar mi investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su programa de becas, apoyo que fue esencial para mi proyecto.

Me gustaría agradecer la ayuda del personal de la UMA “CICEA” en Tabasco. Muchas gracias Dr. Marco López Luna por abrirme las puertas, brindarme su conocimiento y apoyo. A la Dra. Judith por todo su apoyo. Muchas gracias a Carito, Jeremy, Adrián, Alex, Batman, Armando, David, Mafer, Luis, Yael, Pollo, Mau, Benji, Pame, Gato, Richard, Leo, Jocelin y a todos, muchas gracias por su apoyo y ayuda, sin ustedes jamás hubiera logrado concluir mi trabajo, les estaré eternamente agradecida.

A la UMA “El Caimán” por abrirme sus puertas y permitirme realizar parte de mi investigación en sus instalaciones. Gracias a la Bióloga Angela, a la MMVZ Athena Miranda y a todas las personas que me ayudaron en el manejo de los ejemplares.

A todas las personas y amigos que me brindaron apoyo y palabras de aliento.

A los Doctores que leyeron mi escrito y me brindaron su valiosa retroalimentación y conocimiento. En especial a mi tutor el Dr. Rebeles y a los miembros de mi Comité Tutorial el Dr. Isaac y Villegas.

A la Dra. Anita por rescatarme y hacer viable gran parte de mi proyecto, fue mi salvación.

Al Dr. Issac por brindarme gran parte de la idea, resolver todas mis dudas y apoyarme en los análisis estadísticos. Sin usted no hubiera sido posible.

A la Dra. Araceli Lima Melo por brindarme capacitación para realizar los hemogramas de muestras de crocodilianos.

A los cocodrilos, caimanes y todos los animales que han sido parte fundamental en mi formación académica.

## ÍNDICE

<b>Lista de cuadros</b> .....	<b>V</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>VI</b>
<b>Abreviaturas y siglas</b> .....	<b>VII</b>
<b>1.- Resumen</b> .....	<b>VIII</b>
<b>2.- Abstract</b> .....	<b>X</b>
<b>I.- Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>I.I.- Hipótesis</b> .....	<b>10</b>
<b>I.II.- Objetivo General</b> .....	<b>10</b>
<b>I.III.- Objetivos Específicos</b> .....	<b>10</b>
<b>II.-Revisión bibliográfica</b> .....	<b>11</b>
<b>III.- Métodos</b> .....	<b>17</b>
Manejo de ejemplares.....	17
Obtención de muestras.....	20
Análisis de muestras.....	20
Análisis estadísticos.....	25
<b>IV.- Resultados</b> .....	<b>26</b>
Hormona esteroide: Testosterona.....	30
Sistema inmune innato: Leucocitos totales.....	31
Diferencial de células leucocitarias.....	32
Eritrocitos.....	36
Medidas morfométricas.....	37
<b>V.- Discusión</b> .....	<b>43</b>
<b>VI.- Conclusiones</b> .....	<b>52</b>
<b>VII.- Referencias</b> .....	<b>54</b>

## Lista de cuadros

- Cuadro 1.** Condiciones óptimas para la estandarización de un ELISA competitivo para la medición de testosterona en suero de crocodilianos.....**26**
- Cuadro 2.** Porcentajes de recuperación obtenidos en la validación de una prueba de ELISA en cada uno de los puntos de la curva estándar para la cuantificación de testosterona sérica en crocodilianos.....**27**
- Cuadro 3.** Porcentajes de recuperación obtenidos, promedio de las repeticiones, desviación estándar y porcentaje de coeficiente de variación intraensayo para las muestras control alta, media y baja en la validación de una prueba de ELISA para medición de testosterona. ....**28**
- Cuadro 4.** Promedio de las repeticiones, desviación estándar (D.E) y porcentaje de coeficiente de variación interensayo (% CV) para las muestras control alta, media y baja en la validación de una prueba de ELISA para medición de testosterona.....**28**
- Cuadro 5.** Porcentajes de recuperación, desviación estándar (D.E) y porcentaje de coeficiente de variación (% CV) para las diluciones realizadas a partir de una muestra con concentración de 35 ng/ml de testosterona.....**28**
- Cuadro 6.** Porcentajes de unión obtenidas con diferentes hormonas esteroides, analizadas con los parámetros y reactivos obtenidos en la estandarización de una prueba de ELISA para prueba de especificidad en la medición de testosterona en suero de crocodilianos.....**29**
- Cuadro 7.** Resultados de los estimados y significancia de las variables dependientes en función de las medidas morfométricas LHC: largo hocico-cloaca, LH: Largo hocico y CC: circunferencia de cola .....**38**

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Ejemplar de cocodrilo de pantano ( <i>Crocodylus moreletii</i> ), localizado en la UMA “CICEA”, Tabasco.....	<b>18</b>
<b>Figura 2.</b> Ejemplar de Caimán de anteojos ( <i>Caiman crocodilus</i> ), localizado en la UMA “El Caimán”, Chiapas.....	<b>19</b>
<b>Figura 3.</b> Curva de calibración para la medición de hormona testosterona en suero de crocodilianos con concentraciones de 30 ng/ml hasta 0.058 ng/ml.....	<b>27</b>
<b>Figura 4.</b> Medias Estimadas de los niveles séricos de testosterona (ng/ml) en función de las diferentes épocas y especies de crocodilianos.....	<b>31</b>
<b>Figura 5.</b> Medias Estimadas de los valores de leucocitos totales ( $\times 10^9/L$ ) en función de las diferentes épocas y especies de crocodilianos.....	<b>32</b>
<b>Figura 6.</b> Medias Estimadas de los valores de heterófilos totales ( $\times 10^9/L$ ) en función de las diferentes épocas y especies de crocodilianos.....	<b>33</b>
<b>Figura 7.</b> Medias Estimadas de los valores de linfocitos totales ( $\times 10^9/L$ ) en función de las diferentes épocas y especies de crocodilianos.....	<b>35</b>
<b>Figura 8.</b> Medias Estimadas de los valores de monocitos totales ( $\times 10^9/L$ ) en función de las diferentes épocas y especies de crocodilianos.....	<b>36</b>
<b>Figura 9.</b> Medias Estimadas de los valores de eritrocitos totales ( $\times 10^{12}/L$ ) en función de las diferentes épocas y especies de crocodilianos.....	<b>37</b>
<b>Figura 10.</b> Media estimada de testosterona sérica (ng/ml) en época no reproductiva en función de la medida morfométrica largo hocico-cloaca.....	<b>39</b>
<b>Figura 11.</b> Media estimada de testosterona sérica (ng/ml) en época no reproductiva en función de la medida morfométrica largo hocico.....	<b>40</b>
<b>Figura 12.</b> Media estimada de testosterona sérica (ng/ml) en época no reproductiva en función de la medida morfométrica circunferencia de la cola.....	<b>40</b>
<b>Figura 13.</b> Media estimada de leucocitos totales ( $\times 10^9/L$ ) en época no reproductiva en función de la medida morfométrica Largo Hocico-cloaca.....	<b>41</b>
<b>Figura 14.</b> Media estimada de linfocitos totales ( $\times 10^9/L$ ) en época no reproductiva en función de la medida morfométrica Largo Hocico-cloaca.....	<b>42</b>

## Abreviaturas y siglas

°C.....	Grados centígrados
<b>AMPs</b> .....	Proteínas antimicrobianas
<b>CC</b> .....	Circunferencia de la cola, medición del perímetro de la base de la cola
<b>CICEA</b> .....	Centro de Investigación para la Conservación de Especies Amenazadas
<b>CONABIO</b> .....	Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad
<b>% CV</b> .....	Porcentaje de coeficiente de variación
<b>D.E</b> .....	Desviación estándar
<b>DMSO</b> .....	Dimetilsulfóxido
<b>ej.</b> .....	Ejemplo
<b>ELISA</b> .....	Inmunoensayo ligado a enzimas
<b>Etc.</b> .....	Etcétera
<b>G</b> .....	Gauge
<b>GALT</b> .....	Tejido linfoide asociado al intestino
<b>HRP</b> .....	Peroxidasa de rábano picante
<b>Hrs.</b> .....	Horas
<b>ID</b> .....	Identificación del individuo
<b>IC</b> .....	Intervalo de confianza
<b>L</b> .....	Litro
<b>LH</b> .....	Largo total del hocico
<b>LHC</b> .....	Longitud hocico–cloaca
<b>LIC</b> .....	Límite inferior de cuantificación
<b>m</b> .....	Metros
<b>M</b> .....	Molar
<b>MCA</b> .....	Muestra control alta
<b>MCM</b> .....	Muestra control media
<b>MCB</b> .....	Muestra control baja
<b>mg</b> .....	Miligramo
<b>µg</b> .....	Microgramo
<b>ml</b> .....	mililitro
<b>µl</b> .....	Microlitro
<b>mm</b> .....	Milímetro
<b>ng</b> .....	Nanogramo
<b>pH</b> .....	Potencial de hidrógeno
<b>PHA</b> .....	Fitohemaglutinina
<b>rpm</b> .....	Revoluciones por minuto
<b>TMB</b> .....	Tetrametilbencidina
<b>UMA</b> ...	Unidades para la Conservación, Manejo y Aprovechamiento Sustentable de la Vida Silvestre
<b>UNE</b> .....	Unión no específica

## 1.- RESUMEN

Existen procesos fisiológicos claves en la vida de un organismo que requieren de una gran inversión de recursos metabólicos, los cuales son de carácter limitado, por lo que resulta difícil para un organismo optimizar sus sistemas fisiológicos de manera simultánea. La optimización de uno de estos procesos fisiológicos a menudo se produce a costa de otro. Entre estos sistemas se encuentran el sistema inmune y el sistema reproductivo, los cuales generan procesos críticos en los ciclos de vida de los organismos, que afectan su éxito reproductivo o su supervivencia. Dentro de los mecanismos mediadores por los cuales los individuos hacen frente a las diferentes demandas competitivas entre estos dos sistemas, se encuentra la hormona esteroide testosterona, la cual se conoce que produce, induce y facilita los ajustes necesarios para regular tanto la cantidad de recursos energéticos que se invierten en las estrategias reproductivas, como también en las respuestas inmunitarias de la especie.

El objetivo de la presente investigación fue analizar el efecto de la época reproductiva y tamaño de los ejemplares sobre los niveles séricos de testosterona y su relación con un componente del sistema inmune innato celular (células leucocitarias) y células eritrocitarias en machos de crocodilianos, para ello se utilizó como modelo de investigación a dos especies del Orden Crocodylia: el cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*) y el caimán de anteojos (*Caiman crocodilus*). La toma de muestras de sangre y medidas morfométricas de los ejemplares se llevo a cabo en Unidades para la Conservación, Manejo y Aprovechamiento Sustentable de la Vida Silvestre localizadas en los estados de Tabasco y Chiapas, durante las épocas reproductiva y no reproductiva. El análisis de testosterona se realizó mediante un ensayo de ELISA casero competitivo, mientras que para el análisis de un componente del sistema inmune se llevó a cabo el conteo total y diferencial leucocitario, así mismo, se realizó el conteo eritrocitario de las muestras sanguíneas recolectadas. Para el análisis estadístico se utilizó el lenguaje de programación R y el paquete lme4 para modelos lineales generales.

En época reproductiva se encontraron diferencias estadísticamente significativas, comparadas con la época no reproductiva en el aumento de testosterona en las dos especies de crocodilianos (Estimado= 5.007,  $p < 0.01$ ), así mismo, se encontró una disminución en el total de leucocitos (Estimado= 1.01,  $p < 0.01$ ) en ambas especies. En cuanto al diferencial leucocitario se demostraron diferencias estadísticamente significativas en la disminución de la media de heterófilos (Estimado= 0.72,  $p < 0.01$ ), linfocitos (Estimado= 0.18,  $p < 0.01$ ) y monocitos (Estimado= 0.1,  $p < 0.05$ ) durante la época reproductiva. Respecto a los análisis de medidas morfométricas se determinó que en época no reproductiva animales con mayor longitud hocico-cloaca (Estimado=0.4,  $p < 0.05$ ), longitud de hocico (Estimado= 0.21,  $p < 0.05$ ) y circunferencia de cola (Estimado= 0.07,  $p < 0.05$ ) son los que presentan mayores niveles séricos de testosterona. Así mismo, animales con mayor longitud hocico-cloaca son aquellos que presentan mayores niveles de leucocitos totales (Estimado= 0.02,  $p < 0.05$ ) y de linfocitos (Estimado= 0.002,  $p < 0.05$ ).

Con la información recabada se puede concluir que existe un efecto de la época en los niveles de testosterona, donde se observa un aumento de la hormona en la época reproductiva, posiblemente debido a que los crocodilianos durante esta época invierten sus recursos energéticos en comportamientos y caracteres sexuales secundarios, necesarios para obtener su éxito reproductivo, lo que a su vez coincide con una disminución en la concentración de leucocitos circulantes, posiblemente mediada por una menor inversión de recursos hacia el sistema inmune. Mientras que en la época no reproductiva al ya no existir la necesidad de manifestar estos caracteres sexuales disminuye la media de testosterona con un aumento de la inversión energética hacia el sistema inmune y el subsecuente aumento de leucocitos.

**Palabras clave:** testosterona, leucocitos, época reproductiva, época no reproductiva, crocodilianos.

## 2.- ABSTRACT

There are key physiological processes in the life of an organism that require a large investment of metabolic resources, which are limited in nature, making it difficult for an organism to optimize these physiological systems simultaneously. The optimization of one of these physiological processes often comes at the expense of another. These systems include the immune system and the reproductive system, both of them generate critical processes in the life cycles of organisms that affect their reproductive success or survival. Apparently, testosterone is a steroid hormone that mediates the interactions between these two systems. Testosterone produces, induces and facilitates the adjustments to regulate the amount of energetic resources invested in the reproductive strategies of the species as well as their immune responses.

The aim of this study was to analyse the effect of the reproductive season and size of the specimens on the serum levels of testosterone and its relationship with a component of the innate cellular immune system (leukocyte cells) and erythrocyte cells in male crocodylians, for which two species of the Order Crocodylia were used as research models: Morelet's crocodile (*Crocodylus moreletii*) and the spectacled caiman (*Caiman crocodilus*). Blood sampling and morphometric measurements of the specimens were carried out in Units for Conservation, Management and Sustainable Use of Wildlife, located in the states of Tabasco and Chiapas respectively, during the reproductive and non-reproductive seasons. Testosterone analysis was performed using a competitive ELISA in house assay, while for the analysis of a component of the immune system, total and differential leukocyte count was performed, as well as erythrocyte counts of the blood samples collected. For statistical analysis, the R programming language and the lme4 package were used to perform general linear models.

In the reproductive season, statistically significant differences were found compared to the non-reproductive season in the increase of testosterone in the two crocodylian species (Estimated= 5.007,  $p < 0.01$ ), as well as a decrease in the total leukocyte count (Estimated= 1.01,  $p < 0.01$ ) in both species. As for the leukocyte differential,

statistically significant differences were demonstrated in the decrease of the mean number of heterophils (Estimated= 0.72,  $p < 0.01$ ), lymphocytes (Estimated= 0.18,  $p < 0.01$ ) and monocytes (Estimated= 0.1,  $p < 0.05$ ) during the reproductive period. Regarding the analysis of morphometric measurements, it was determined that in the non-reproductive season, animals with greater snout length (Estimated=0.4,  $p < 0.05$ ), snout-vent length (Estimated= 0.21,  $p < 0.05$ ) and tail circumference (Estimated= 0.07,  $p < 0.05$ ), are those that present higher serum testosterone levels. Likewise, animals with greater snout-vent length are those that present higher levels of leukocytes (Estimated= 0.02,  $p < 0.05$ ) and lymphocytes (Estimated= 0.002,  $p < 0.05$ ).

With the information collected, it can be concluded that there is an effect of the season on testosterone levels, where an increase of testosterone is observed in the reproductive season, possibly due to the fact that crocodilians during this season prefer to invest their energetic resources in behaviors and secondary sexual characteristics necessary to obtain their reproductive success, which in turn leads to a decrease in the investment of resources into the immune system resulting in a decrease in the mean circulating leukocytes counts. While in the non-reproductive season, since there is no longer the need to manifest these sexual characteristics, the mean testosterone level decreases with an increase in the energetic investment in the immune system and the subsequent increase in leukocytes count.

**KEYWORDS:** testosterone, leukocytes, reproductive season, non-reproductive season, crocodilians.

## I.- Introducción

Los seres vivos están conformados por sistemas fisiológicos que tienen comunicación entre ellos por medio de diferentes vías, tales como moléculas de señalización y receptores intracelulares y de membrana, para poder coordinar sus interacciones y controlar su correcto funcionamiento dentro del organismo (Segner *et al.*, 2017; Hall y Hall, 2020). Aunado a esta red de comunicaciones, existen asociaciones y variaciones en los sistemas de retroalimentación de los diferentes sistemas fisiológicos dependientes de las etapas de vida y épocas del ciclo anual que comprenden parte de las historias de vida de un organismo, en las cuales se incluyen su desarrollo, épocas reproductivas, cambios morfológicos, migraciones, senectud, por mencionar algunas (Demas y Nelson, 2012).

Para poder mantener el correcto funcionamiento de estos sistemas fisiológicos, los organismos requieren un continuo aporte de recursos metabólicos y energía. Sin embargo, estos recursos son de carácter limitado y deben de ser distribuidos a una amplia variedad de funciones fisiológicas (Demas y Nelson, 2012). Como resultado de las limitaciones en la disponibilidad de estos recursos metabólicos, los individuos determinan una serie de compensaciones (*“trade-offs”*), en donde los recursos energéticos que se invierten en una función fisiológica no pueden ser invertidos en otra. Algunas de estas funciones fisiológicas requieren de una mayor inversión de recursos, por lo que resulta difícil para un organismo optimizarlas de manera simultánea, razón por la cual a menudo el completo funcionamiento de una de ellas se produce a costa de otra (Hau, 2007; Flatt y Heyland, 2011; O’Neal y Ketterson, 2012).

La distribución, asignación e inversión de recursos energéticos dentro de un organismo exhibe fluctuaciones tanto en disponibilidad como en el gasto de estos, dependiendo de las condiciones fisiológicas del individuo. De manera que, es necesario comprender mejor los mecanismos por los cuales los individuos hacen frente a las diferentes demandas competitivas a lo largo de diferentes etapas de su vida (Beger *et al.*, 2005; French *et al.*, 2007; Hudson *et al.*, 2020).

El sistema inmune, cuyo objetivo es la protección del organismo en contra de antígenos, agentes patógenos o componentes celulares anormales, está conformado por células y moléculas especializadas, las cuales requieren un continuo aporte de recursos energéticos para tener un funcionamiento óptimo (Nicholson, 2016). Es de carácter dicotómico, por lo que se clasifica de manera general, en sistema inmune innato y sistema inmune adaptativo, los cuales se diferencian por la velocidad y especificidad de su respuesta contra patógenos, aunque es importante mencionar que existe una estrecha interacción entre ambos. Estudiar el sistema inmune es de suma importancia para poder comprender desde un punto fisiológico como ecológico, los cambios presentes dentro de un organismo que pueden afectar su susceptibilidad a enfermedades, por consiguiente, su supervivencia en el ambiente (Delves y Riott, 2000; Parkin y Cohen, 2001; Gómez-Lucía *et al.*, 2007; Ashley y Winfield, 2012).

La inmunidad innata está conformada por barreras físicas, químicas y microbiológicas, células fagocíticas, células mediadoras de la inflamación y células inmunes denominadas "*Natural killer*". También por componentes moleculares que forman parte del sistema del complemento, proteínas y citocinas. Mientras que, la inmunidad adaptativa, se puede dividir en: celular (mediada por linfocitos T) e inmunidad humoral (mediada por anticuerpos derivados de los linfocitos B). La principal diferencia que existe entre ambas categorías es la alta especificidad y memoria que presenta la respuesta inmune adaptativa comparada con la respuesta innata, la cual es inespecífica (Delves y Riott, 2000; Parkin y Cohen, 2001; Gómez-Lucía *et al.*, 2007).

Las respuestas inmunológicas favorecen la mitigación y neutralización de los desafíos continuos en contra de una gran variedad de patógenos. Por lo que, la necesidad de aporte y distribución de recursos energéticos para estas respuestas inmunes es dependiente del riesgo de enfermedad o muerte presente en el ambiente, por ejemplo, existe un aumento en la demanda de recursos energéticos durante los periodos de infección, con un mayor gasto energético (Childs *et al.*, 2009). Así, se presenta un mayor riesgo en la susceptibilidad del organismo hacia

patógenos cuando no hay suficientes reservas energéticas disponibles para mantener una óptima inmunidad debido a que las células inmunológicas requieren de un aporte constante de recursos, algunas veces, de carácter muy específico (ej. la arginina es esencial para la generación de óxido nítrico por parte de los macrófagos), los cuales, les permitan iniciar respuestas eficaces y rápidas contra patógenos cuando es necesario (Childs *et al.*, 2009). En consecuencia, una predicción de la compensación de los costos inmunológicos del organismo es que este adapte mecanismos para aumentar la resistencia a estos patógenos a expensas de la competencia fisiológica de otros procesos como el reproductivo (Casto *et al.*, 2001; Oppliger *et al.*, 2004; French y Moore, 2008; Huyghe *et al.*, 2009; Demas y Nelson, 2012).

Por otra parte, el sistema reproductivo es un sistema altamente costoso energéticamente, tiene una gran demanda de recursos hacia la producción de caracteres sexuales secundarios y tácticas reproductivas. En la mayoría de las especies, es durante las épocas reproductivas en donde los machos generan mayores gastos energéticos debido a la exhibición de comportamientos característicos del cortejo, agresiones intraespecíficas y síntesis de hormonas sexuales, específicamente testosterona, la cual es el andrógeno más importante involucrado en la reproducción de individuos machos (Casto *et al.*, 2001; Oppliger *et al.*, 2004; French y Moore, 2008; Huyghe *et al.*, 2009; Demas y Nelson, 2012).

La testosterona es una hormona esteroidea, producida principalmente por las células de Leydig. En los machos, su función es promover la espermatogénesis y el funcionamiento de los órganos reproductivos, es necesaria para que el macho manifieste conductas sexuales, aumente la expresión de caracteres sexuales secundarios, también provee cambios físicos y conductuales, cuyo objetivo es poder atraer y copular con las hembras. El aumento de esta hormona en sangre puede proveer al macho de ciertas ventajas, por ejemplo, un incremento en el comportamiento agresivo podrá elevar su estatus jerárquico de dominancia dentro del grupo, sin embargo, mantener estos niveles elevados de testosterona resulta

costoso para los organismos (Galina y Valencia, 2008; Huyghe *et al.*, 2009; Demas y Nelson, 2012).

Los caracteres sexuales secundarios son características morfológicas y de comportamiento, dependientes de altas concentraciones de testosterona. Su función consiste en ser indicadores para las hembras de la condición y calidad genética de los machos, para de esta manera obtener los beneficios genéticos de sobrevivencia en la descendencia (Zahavi, 1975).

Como ejemplo de estos caracteres sexuales secundarios se mencionan: 1) cambios de coloración anatómicos durante el cortejo, por ejemplo, el color del pico del macho de gorrión común (*Passer domesticus*) cambia entre temporadas, de un color pálido en la época no reproductiva a un color oscuro negruzco en la temporada reproductiva (Laucht *et al.*, 2010); 2) cambios anatomo-fisiológicos con efectos que modifican el rendimiento de un animal durante la reproducción, como el aumento de la masa muscular y de la actividad enzimática de músculos y neuronas; 3) los tamaños morfológicos de individuos, por ejemplo, un mayor ancho de cráneo y diámetro de poros femorales está correlacionado con un factor dominante en la iguana verde (*Iguana iguana*) (Pratt *et al.*, 1992), 4) la exhibición de señales como las danzas o vocalizaciones, y 5) el aumento de comportamientos dominantes como la agresión, por ejemplo, en el cocodrilo de Nilo (*Crocodylus niloticus*), las vocalizaciones y agresiones intraespecíficas aumentan durante la época reproductiva (Kofron, 1991). Algunas de estas características, como los factores de coloración en algunas aves, han sido relacionadas con factores que demuestran la inmunocompetencia de los individuos, por ejemplo, mayor resistencia a parásitos o mayor producción de anticuerpos (Oppliger *et al.*, 2004; Huyghe *et al.*, 2009).

Como se mencionó anteriormente, la reproducción es una etapa costosa de la historia de vida de los organismos y, por lo tanto, los beneficios asociados con un incremento en la inversión energética para la reproducción pueden compensarse con reducciones en los recursos destinados a la supervivencia de los organismos y viceversa. El sistema inmune y el sistema reproductivo generan procesos críticos

en los organismos que afectan su éxito reproductivo o supervivencia. Ambos sistemas están interconectados directa y bidireccionalmente, para de esta manera, favorecer el correcto cumplimiento de sus funciones específicas (Demas y Nelson, 2012).

El sistema inmune activa los mecanismos necesarios para combatir diversos patógenos, aunque esto pueda resultar en serias desventajas durante la temporada de reproducción. Los machos pueden llegar a perder oportunidades importantes de reproducirse si disminuyen su nivel de energía y actividad reproductiva como resultado de alguna herida o de algún patógeno. En algunos casos, resulta una estrategia el suprimir algunos componentes del sistema inmune con la finalidad de continuar con las actividades de búsqueda y defensa de pareja reproductiva, así como de territorio, aunque esto conlleve a poner en riesgo la supervivencia del organismo, con el beneficio de una reproducción exitosa (Ashley y Wingfield, 2012).

Aparentemente, parte de la regulación y asignación de recursos entre estos dos sistemas fisiológicos está mediada por interacciones de hormonas esteroides, específicamente en machos la hormona testosterona. La testosterona produce, induce y facilita los ajustes necesarios para regular tanto la cantidad de recursos que se invierte en las estrategias reproductivas de la especie, como también en las respuestas inmunitarias de la misma. Puede controlar la distribución de la energía por medio de un efecto estimulante o un efecto supresor, dependiente del estadio reproductivo en que se encuentre algún ejemplar, aunado a los cambios en las condiciones ambientales, interacciones sociales y calidad del hábitat (Muehlenbein y Bribiescas, 2005; De-León-Nava *et al.*, 2009; Hudson *et al.*, 2020). La presencia de receptores intracelulares o de membrana para esteroides en células del sistema inmune es un indicador que estas hormonas ejercen efectos al unirse a estos receptores, la testosterona de esta manera puede influir en las funciones de las células inmunes, con efectos desde su activación, maduración, selección, proliferación y producción (Da Silva, 1999; De-León-Nava *et al.*, 2009; Camacho *et al.*, 2011).

La Investigación entre la relación de la función inmune y reproductiva tuvo sus inicios con Zahavi (1975), quien sugirió que la selección sexual, por medio de los caracteres sexuales, mejora la capacidad de los individuos (generalmente hembras) de detectar la calidad de sus posibles parejas reproductivas; debido a que estos caracteres requieren de una inversión de tiempo, energía, recursos y probablemente confieren una desventaja en la supervivencia del individuo ("*Handicap*"), por lo que, los machos de mejor calidad serían aquellos capaces de producir y mantener estos caracteres, demostrando así su calidad genética y de esta manera poder adquirir más o mejores parejas reproductivas.

Posteriormente Hamilton y Zuk (1982), propusieron que los caracteres sexuales secundarios, permiten a las hembras evaluar la calidad de los machos por medio de su habilidad para resistir parásitos. Las hembras elegirían a sus parejas por su resistencia genética a las enfermedades mediante el escrutinio de caracteres cuya plena expresión depende de la salud y el vigor del macho.

Más adelante, en 1992, Folstad y Karter publicaron su teoría "*Immunocompetence handicap hypothesis*", donde se implica un componente endocrinológico, formaliza el concepto de una asociación entre una estrategia de apareamiento y la reducción de la inmunocompetencia de un individuo, mediante un doble efecto de la testosterona en el organismo. La testosterona tendría un efecto estimulante en el desarrollo y mantenimiento de las características sexuales secundarias de los machos y, al mismo tiempo, un efecto supresor en la inmunocompetencia de los mismos, por lo tanto, sólo los machos de mejor calidad genética pueden permitirse mostrar las características sexuales sin sufrir grandes cargas de parásitos. Posteriormente Wedekind y Folstad (1994) agregarían que una supresión al sistema inmunológico por parte de la testosterona permitiría la reasignación de energía a la producción de características sexuales secundarias.

La mediación entre la función del sistema inmune y el sistema reproductivo ha sido documentada en diversas investigaciones, mediante diferentes enfoques de estudio. En donde se consideran los siguientes aspectos: a) la correlación directa o indirecta de un elemento del sistema inmune con la testosterona en diferentes

estadios reproductivos; b) desafío experimental del sistema inmune mediante la aplicación de antígenos con diferentes concentraciones de testosterona y c) la alteración de los niveles plasmáticos de testosterona en el organismo para el estudio de la respuesta inmune (Olsson *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 2004; Finger Jr *et al.*, 2013).

Entre las investigaciones realizadas entre la correlación existente de testosterona en diferentes estadios reproductivos con el sistema inmune de los individuos machos, se mencionan aquellas donde se realizan análisis de los niveles hormonales de testosterona a lo largo de diferentes épocas, con el subsecuente análisis de la respuesta indirecta o directa del sistema inmune de los organismos. Entre los estudios en donde se analizan las respuestas inmunes indirectas, se encuentran aquellos en donde se ha demostrado que, en algunas especies de aves y reptiles, ejemplares con niveles más elevados de testosterona en épocas reproductivas, mostraron una mayor parasitosis, comparados con aquellos con menores niveles de testosterona. Esta relación, se debe a que los machos para poder desarrollar y mantener los caracteres sexuales secundarios propios de la especie, aumentan sus niveles de testosterona y en consecuencia reducen su capacidad inmunitaria. Solo los machos con mayor calidad genética son aquellos que pueden resistir a esta infección parasitaria, mantener los caracteres sexuales y aun así sobrevivir. Cabe mencionar, que esta relación no se ha detectado en todas las especies de animales estudiadas, en algunas especies se han encontrado efectos contradictorios, donde no se ha observado la correlación entre los niveles de testosterona y cargas parasitarias (Weatherhead *et al.*, 1993; Saino *et al.*, 1995; Salvador *et al.*, 1996; Roberts *et al.*, 2004; Halliday *et al.*, 2014).

Investigaciones relacionadas con el análisis directo de la respuesta inmune en diferentes estadios reproductivos, estudian los conteos relativos o absolutos de leucocitos, anticuerpos u otros componentes del sistema inmune en ejemplares con diferentes niveles sanguíneos de testosterona, en donde, en algunas ocasiones se han observado efectos inmunosupresores de la misma (Salvador *et al.*, 1996;

Buchanan *et al.*, 2003; Roberts *et al.*, 2004). Por ejemplo, en la especie de reptil skink de cinco líneas (*Plestiodon inexpectatus*), aquellos machos que durante el cortejo producen una mayor saturación rojiza de la coloración presente en su cabeza, la cual es dependiente de altos niveles de testosterona y a su vez es una señal de calidad del macho para las hembras, presentan menor cantidad de leucocitos circulantes, con lo que se demuestra una relación negativa entre la testosterona y el sistema inmune innato (Seddon y Klukowski, 2013).

Otro enfoque de investigación es la aplicación de antígenos a diferentes grupos experimentales, para realizar un análisis y comparación entre los niveles de testosterona y algún componente del sistema inmune, por ejemplo, la producción de anticuerpos o la proliferación celular linfocitaria. De este modo, se han realizado estudios en la especie de gorrión común macho (*Passer domesticus*), la cual presenta una serie de plumas negras en la zona del pecho, indicador del estatus social dominante entre las interacciones de machos durante época reproductiva y que es mediado por los niveles séricos de testosterona; se demostró que aquellos gorriones con mayor tamaño de estas insignias, después de realizar una inoculación con el antígeno de fitohemaglutinina (PHA), fueron los que presentaron menor proliferación de respuesta inmune mediada por linfocitos T (Gonzalez *et al.*, 1999). Otra especie que ha demostrado este mismo patrón de asociación es la lagartija mediterránea (*Psammodromus algirus*) (Belluire *et al.* 2004), con lo que se demuestra que existe un posible costo y beneficio de los caracteres sexuales a costa del sistema inmune.

Por último, se encuentran las investigaciones con enfoque en la manipulación hormonal de los individuos machos, ya sea mediante esterilización o colocación de implantes de testosterona, para el subsecuente análisis de la respuesta inmune. Entre los resultados obtenidos de la respuesta inmune en donde se realizó la aplicación de implantes de testosterona se encuentran: 1) disminución en la inmunidad humoral y celular en época no reproductiva en especies como el gorrión (*Melospiza melodía*) y la golondrina común (*Hirunda rustica*) (Duffy *et al.*, 2000; Owen-Ashley *et al.*, 2004); 2) disminución en la respuesta inmune celular mediada

por linfocitos T, en especies como la lagartija roquera (*Podarcis muralis*) (Oppliger *et al.*, 2004); 3) disminución en el título de anticuerpos como en el caso de ejemplares de maluro soberbio (*Malurus cyaneus*) y junco ojioscuro (*Junco hyemalis*) (Saino *et al.*, 1995; Peters, 2000; Casto *et al.*, 2001); 4) mayor viremia en el curso de la infección tardía después de la inoculación de patógenos (Lindrtom *et al.*, 2001).

Finalmente, para ejemplificar aquellas investigaciones en donde se realiza la manipulación hormonal por medio de la castración en machos, se puede mencionar que experimentalmente en ejemplares de gecko (*Hemidactylus flaviviridis*) se observa una disminución de los niveles de testosterona en suero, además de observarse una elevación en la capacidad fagocitaria de los macrófagos, con lo que se demostró el posible efecto inmunosupresor de la actividad fagocitaria de la hormona (Mondal y Rai, 1999).

En el presente estudio se utilizó como modelo de investigación a dos especies de crocodilianos, con diversas interacciones sociales relacionadas al comportamiento reproductivo, competencia territorial y búsqueda de alimento, con las que se establecen jerarquías dentro de la población, donde los individuos con mayor talla morfométrica son probablemente los más dominantes. Las interacciones agonistas intraespecíficas de dominancia entre ejemplares machos se presentan más durante las actividades de la época reproductiva, probablemente por efectos de la testosterona. Su comportamiento sexual consiste en exhibiciones de cortejo, apareamiento y defensa del 'harem', comportamientos que requieren de una gran inversión energética por parte del individuo (Lang, 1987; Huchzermeyer, 2003; Merchant *et al.*, 2006; Milnes, 2011). Por otra parte, el estudio de su sistema inmune es importante para descubrir los mecanismos y capacidades inmunes potentes que poseen, principalmente por parte de su inmunidad innata (Merchant *et al.*, 2006; Finger e Iseberg., 2012). Debido a que la Clase Reptilia, es el grupo de vertebrados, en donde mayor apoyo se ha encontrado acerca de un efecto inmunosupresor por efecto de la testosterona (Roberts *et al.*, 2004), así como la evidencia de que la

protección innata puede resultar costosa, se exploró si la hormona testosterona favorece la asignación de recursos a la reproducción a costa de la respuesta inmune en machos, de dos especies del Orden Crocodylia: el cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*) y el caimán de anteojos (*Caiman crocodilus chiapasius*). Por medio de un estudio observacional prospectivo, de tipo longitudinal, donde se realizó la medición por unidad a través de la época reproductiva y no reproductiva de las variables cuantitativas continuas, en consideración de los factores: testosterona, células inmunitarias (leucocitos), medidas morfométricas (factor de dominancia) y eritrocitos.

### **I.I.- Hipótesis**

Los niveles séricos de testosterona se incrementarán en machos de crocodilianos con la subsecuente disminución de eritrocitos y leucocitos, dependientes de la época reproductiva y la talla morfométrica de los ejemplares.

### **I.II.- Objetivo General**

Analizar el efecto de la época reproductiva y tamaño de los ejemplares sobre los niveles séricos de testosterona y su relación con un componente del sistema inmune innato celular (células leucocitarias) y células eritrocitarias en machos de cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*) y caimán de anteojos (*Caiman crocodilus chiapasius*).

### **I.III.- Objetivos específicos**

- Determinar los niveles séricos de testosterona a lo largo del ciclo reproductivo de los machos de cocodrilo de pantano y caimán.
- Determinar los niveles leucocitarios como evaluación del sistema inmune innato celular a lo largo del ciclo reproductivo de los machos de cocodrilo de pantano y caimán.
- Determinar las células eritrocitarias a lo largo del ciclo reproductivo de los machos de cocodrilo de pantano y caimán.

- Determinar las medidas morfométricas de los machos de cocodrilo de pantano y caimán.
- Identificar las relaciones entre la secreción sérica de testosterona y las medidas morfométricas de los machos de cocodrilo de pantano y caimán.
- Identificar las relaciones entre los niveles de leucocitos y las medidas morfométricas de los machos de cocodrilo de pantano y caimán.
- Identificar las relaciones entre los niveles de eritrocitos y las medidas morfométricas de los machos de cocodrilo de pantano y caimán.

## II.- Revisión bibliográfica

A nivel mundial, actualmente se han reconocido un total de 27 especies de crocodilianos en el mundo, divididos en 9 géneros y tres familias (Gavialidae, Crocodylidae y Alligatoridae), sin embargo, este número puede variar según la literatura citada, por lo que es necesario realizar mayor cantidad de estudios moleculares y morfológicos para establecer la cantidad de especies exactas que a la fecha habitan en la Tierra (Grigg, 2015). Del total de especies reconocidas, en México se distribuyen tres: el cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*), distribuida en los estados de Tamaulipas, San Luis Potosí, Veracruz, Tabasco, Campeche, Yucatán, Quintana Roo, Querétaro, Nuevo León, Chiapas y Oaxaca (Domínguez–Laso, 2006); el cocodrilo de río (*Crocodylus acutus*) y el caimán de anteojos (*Caiman crocodilus chiapasius*), con distribución en el estado de Chiapas (Velasco et al., 2010; CONABIO, 2020).

### Características del sistema inmune en crocodilianos

El sistema inmune de los reptiles comprende un conjunto de células, moléculas, órganos y tejidos especializados. Los órganos en donde se generan, almacenan y maduran las células responsables del sistema inmune se dividen principalmente en dos categorías: los órganos principales, centrales o primarios, donde se han descrito la médula ósea y el timo; y los órganos secundarios periféricos correspondientes al bazo y al tejido linfoide asociado al intestino (GALT). Debido a que son animales

ectotermos, el correcto funcionamiento de su sistema inmune está muy relacionado con variaciones referentes a la temperatura ambiental, así como también a estados fisiológicos y sexo (Gómez-Lucía *et al.*, 2007; Finger e Isberg, 2012; Rios y Zimmerman, 2015; Ghoral y Priyam, 2018).

De manera general, de acuerdo con la especificidad del reconocimiento hacia los antígenos, presentan dos tipos de mecanismos de defensa: la inmunidad innata y la inmunidad adquirida o adaptativa (Gómez-Lucía *et al.*, 2007; Medzhitov y Janeway, 2010; Finger e Isberg, 2012).

El sistema inmune innato es la línea de defensa primaria, no es específica, no presenta la capacidad de “memoria inmunológica”, produce señales junto al antígeno que estimulan a la respuesta inmune adaptativa. Entre los principales componentes de la respuesta inmune innata se encuentran: las barreras anatómicas (como la piel, osteodermos), las barreras fisicoquímicas y biológicas (como la microbiota autóctona), células fagocitarias (heterófilos, monocitos), mediadores de la inflamación (ej. Basófilos), entre otros componentes (Gómez-Lucía *et al.*, 2007; Shaw *et al.*, 2010; Ghoral y Priyam, 2018).

Los crocodilianos presentan una serie de leucocitos o células blancas no específicas, que se originan de células madre pluripotenciales hematopoyéticas, en donde se dan origen a dos tipos de células progenitoras: la línea mielocítica y la línea linfocítica. Las células mieloides incluyen a los eritrocitos, trombocitos, granulocitos y monocitos. En cuanto a células linfoides tenemos a los linfocitos B y T (Gómez-Lucía *et al.*, 2007; Zimmerman *et al.*, 2010; Finger e Isberg, 2012; Rios y Zimmerman, 2015). Estudios acerca de valores hematológicos se han realizado en varias especies de crocodilianos, sin embargo, estos estudios presentan diferentes rangos de valores, atribuidos a localización, sexo, edad, dinámica de la población y condiciones del ambiente (Zayas *et al.*, 2011).

Dentro de los leucocitos presentes en crocodilianos se encuentran los heterófilos, basófilos, eosinófilos, monocitos y linfocitos. A continuación, se hace un breve resumen de la morfología y función de estos:

Heterófilos: Son las células equivalentes a los neutrófilos en mamíferos, cuya función principal es la fagocitosis y la producción de proteínas antimicrobianas (AMPs), así mismo, tienen un papel importante en la respuesta de varios estímulos inflamatorios en reptiles (Rios y Zimmerman, 2015). Son células redondas con núcleo oval, no nucleado y presentan gránulos citoplasmáticos de coloración eosinofílica de forma fusiforme y abundante, el cual se localiza en la periferia del citoplasma. Comprenden aproximadamente el 50% de los leucocitos presentes en circulación (Zimmerman *et al.*, 2010; Stacy *et al.*, 2011; Finger e Isberg, 2012; Arikan y Cicek, 2014; Eatwell *et al.*, 2014).

Eosinófilos: Representan aproximadamente del 7% al 10% de leucocitos presentes en crocodilianos, se relaciona su presencia a infecciones parasitarias, aunque es muy poco conocida la función que llegan a presentar en reptiles. Parecidos a los heterófilos en forma y tamaño, los gránulos citoplasmáticos en su núcleo son de forma esférica y de un mayor tamaño (Sykes y Klaphake, 2008; Zimmerman *et al.*, 2010; Stacy *et al.*, 2011; Finger e Isberg, 2012; Arikan y Cicek, 2014).

Basófilos: Equivalen aproximadamente al 12% de leucocitos presentes en crocodilianos, son mediadores proinflamatorios (Rios y Zimmerman, 2015). Tienen un núcleo central, no lobulado, con gránulos metacromáticos azul oscuro a morado. Presentan un citoplasma de coloración morado pálido claro, cubierto por gránulos de coloración metacromática (Zimmerman *et al.*, 2010; Stacy *et al.*, 2011; Finger e Isberg, 2013; Arikan y Cicek, 2014; Eatwell *et al.*, 2014).

Monocitos: Derivan de progenitores mieloides (monoblastos), que se diferencian primero en promonocitos y posteriormente en monocitos circulantes, los cuales son los que se encuentran en el torrente sanguíneo, antes de convertirse en macrófagos en el tejido. Junto con los macrófagos una de sus funciones es la presentación de antígenos al sistema adaptativo y liberación de citocinas y óxido nítrico. Presentan un núcleo con forma de riñón, en la mayoría de las especies de reptiles, con excepción de lagartijas y serpientes, presentan gránulos de coloración azurófila, son

de mayor tamaño que los linfocitos y representan aproximadamente el 10% del total de leucocitos (Gómez-Lucía *et al.*, 2007; Arikan y Cicek, 2014; Eatwell *et al.*, 2014).

Linfocitos: Son de tamaño pequeño, con un núcleo cromofílico que ocupa casi el total de la célula desplazando al citoplasma a una pequeña zona en la periferia, su citoplasma es ligeramente basófilo (Sykes y Klaphake, 2008; Arikan y Cicek, 2014; Eatwell *et al.*, 2014).

La inmunidad adaptativa se desarrolla posterior a la inmunidad innata, es específica, dividida en inmunidad adaptativa celular (mediada por células Linfocitos T) e inmunidad adaptativa humoral (mediada por anticuerpos) (Gómez-Lucía *et al.*, 2007; Iwasak y Medzhitov, 2010).

Las investigaciones acerca del sistema inmune en crocodilianos han sido enfocadas en: a) características celulares del sistema inmune (Zayas *et al.*, 2001; Finger Jr. e Isberg; 2012); b) actividad antimicrobiana del suero de crocodilianos (Merchant *et al.*, 2006; Preecharram *et al.*, 2008; Kommanee *et al.*, 2012); c) respuesta inmune contra un estímulo antigénico (Finger Jr. *et al.*, 2016); d) inmunidad humoral: aislamiento de anticuerpos de suero de cocodrilo y detección de anticuerpos a diferentes patógenos, entre los que se encuentran *Trichinella papuae*, *T. zimbabwensis*, *Mycoplasma alligatoris* (Brown *et al.*, 2001; Ludovisi *et al.*, 2013; Abdool *et al.*, 2020).

Es de importancia recalcar que la mayoría de los estudios realizados se han enfocado en el entendimiento de la inmunidad innata, sin embargo, aún existen muy pocos estudios en el tópico, por lo que hace falta una mayor investigación acerca de la inmunidad en crocodilianos.

### **Generalidades reproductivas en machos de crocodilianos**

Los crocodilianos son animales estacionales que presentan un marcado comportamiento reproductivo, el cual consiste en la exhibición de conductas de cortejo (vocalizaciones y movimientos corporales de interacción entre machos y

hembras), apareamiento y comportamientos agonistas intraespecíficos para la defensa de parejas reproductivas y de territorio, lo cual les genera un costo de energía durante la época reproductiva (Lang, 1987; Huchzermeyer, 2003). En algunas especies se ha observado que presentan dimorfismo sexual en medidas y formas craneales. Los machos presentan un órgano copulador “*phallus*”, con el cual realizan la deposición de semen en el tracto reproductivo de la hembra (Grigg, 2015; Moore *et al.*, 2019).

La edad en que alcanzan la madurez sexual es dependiente de factores como la longitud del animal, disponibilidad de recursos y factores abióticos como es la temperatura. También es específica de especie, por ejemplo: en el caso del cocodrilo de pantano (*C. moreletii*), en vida libre se ha reportado que alcanza la madurez sexual con una longitud corporal promedio de 1.5 m y en cautiverio con una longitud corporal promedio de 1.3 m (Domínguez–Laso, 2006; Platt *et al.*, 2010); mientras que en el caso del caimán de anteojos (*Caiman crocodilus*) se ha descrito un tamaño promedio de 1.2 m (Velasco *et al.*, 2010), para la subespecie *C. crocodilus fuscus* se ha mencionado una talla de 1.08 m (Staton y Dixon, 1977).

El ciclo reproductivo de los crocodilianos se divide en los eventos de la época reproductiva, que consisten en: el cortejo y la cópula; y los eventos de la época no reproductiva, donde no existen comportamientos reproductivos (Balaguera-Reina *et al.*, 2015). Estudios realizados en diferentes especies indican que los meses en donde se desarrollan los eventos reproductivos pueden ser ligeramente asincrónicos, dependientes de diversas condiciones del hábitat como las climatológicas. En México, específicamente en el caso del cocodrilo de pantano (*C. moreletii*), existen registros donde los comportamientos de cortejo y apareamiento comienzan en el mes de enero hasta el mes de abril. Mientras que los eventos anidatorios inician a finales del mes de abril y principios de mayo, junio y julio (Escobedo-Galván *et al.*, 2009; Platt *et al.*, 2010; Casas-Andreu, Barrios-Quiroz y Macip-Ríos, 2011; López-Luna *et al.*, 2011; Barrios y Cremieux, 2018).

Respecto al caimán de anteojos (*Caiman c. chiapasius*), en México, se han realizado pocos estudios acerca de los meses en que esta especie comienza con los eventos reproductivos, se ha documentado que comienzan en el mes de marzo, con el cortejo y el apareamiento, mientras que la construcción de sus nidos se realiza en los meses de abril a septiembre (Casas-Andreu y Guzmán-Arroyo, 1970; González-Desales *et al.*, 2016).

El esfuerzo reproductivo presente en machos consiste en cambios en el comportamiento como la atracción de parejas, por medio de vocalizaciones y movimientos corporales, como el golpeteo del agua con la cabeza, competencia intraespecífica y gastos fisiológicos referentes a la espermatogénesis y tejidos somáticos (Álvarez del Toro, 1974; Huchzermeyer, 2003; Hernández-Hurtado *et al.* 2006). Ciertos caracteres sexuales secundarios, tales como la masa muscular, pueden favorecer su probabilidad de éxito reproductivo, si se tiene como base que estos caracteres son indicadores honestos que reflejan la salud y bienestar del individuo, así como su capacidad de supervivencia a patógenos (Muehlenbein y Bribiescas, 2005).

Los crocodilianos presentan una dominancia social entre machos, la cual se encuentra más acentuada durante el periodo de actividades reproductivas. En donde la longitud total y la agresividad del individuo son los rasgos más notables acerca de la dominancia de un animal.

Pocos estudios se han realizado con relación a las concentraciones plasmáticas de testosterona en crocodilianos, los cuales se han concentrado principalmente en el caimán americano (*Alligator mississippiensis*), con un rango de concentración plasmática promedio desde 2 ng/ml a 100 ng/ml durante todo el ciclo anual (Lance 1989, 2003). Es necesario realizar mayores estudios en la descripción de concentraciones hormonales a través de los ciclos reproductivos de los machos para conocer mejor el proceso reproductivo, aunado a la necesidad de tener datos base (Huchzermeyer, 2003; Detoef-Boulade, 2006).

### III.- Métodos

#### Manejo de los ejemplares

Para el caso del cocodrilo de pantano (*C. moreletii*), se realizó el muestreo de once ejemplares de machos reproductores, los cuales fueron sexados mediante palpación cloacal. El criterio de inclusión fue su selección con base en el tamaño mínimo reportado de madurez sexual para la especie de 1.3 m en cautiverio (Platt *et al.*, 2010). Los ejemplares se encuentran en la UMA– “Centro de Investigación para la Conservación de Especies Amenazadas” (CICEA), localizada en el campus de la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, en la carretera Villahermosa-Cárdenas, entronque Bosque de Saloya, Villahermosa, Tabasco.

La toma de muestras sanguíneas de los cocodrilos de pantano (*Crocodylus moreletii*) (Figura 1) se realizó a partir de las fechas registradas de inicio de los eventos de cortejo en machos durante la época reproductiva en el mes de enero, procediendo con los muestreos durante los primeros 15 días de cada mes hasta el mes de abril, donde los comportamientos reproductivos en machos están próximos a concluir.

Se continuó con la toma de muestras en época no reproductiva en los meses de mayo, agosto, septiembre y octubre.

Se realizaron diversos planes de manejo para el muestreo y recaptura de los individuos, utilizando la siguiente metodología y estrategias:

1. Localización de cocodrilos (a simple vista, atracción por medio de señuelos y cebos, localización de zonas de refugio).
2. Determinación de método de captura (Captura con lazo de acero y pértiga ó con cuerda).
3. Contención e inmovilización física de los ejemplares para el muestreo.
4. Toma de muestras: Mediciones morfométricas (primera captura), toma de muestras sanguíneas.

5. Realización de marcaje: El método para la identificación de los individuos es por medio del sistema de marcaje de corte de quillas, reportado en el Protocolo de Monitorio del Cocodrilo de Pantano (*Crocodylus moreletii*), (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad [CONABIO], 2011). Para dar un correcto seguimiento, siempre se utilizaron los mismos ejemplares y para poder reconocer a distancia los individuos muestreados para su posterior recaptura se utilizaron cinchos de plástico color naranja fluorescente, los cuales se colocaron perforando el primer osteodermo cervical. Durante los muestreos para evitar recapturar al mismo ejemplar se realizó la marcación con un pequeño distintivo realizado con pintura fluorescente.
6. Finalmente se procedió a la liberación de los ejemplares.



Figura 1. Ejemplar de cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*), localizado en la UMA “CICEA”, Tabasco.

Para el caso del caimán de anteojos (*Caiman c. chiapasius*), se seleccionaron seis ejemplares machos (Figura 2), sexados mediante palpación cloacal y con el fundamento de que la especie alcanza la madurez sexual alrededor de 1.2 m (Velasco *et al.*, 2010). Los individuos pertenecen a la UMA “El Caimán”, Puerto Arista, Chiapas.

La toma de muestras sanguíneas y medidas de época reproductiva se realizó a finales del mes de marzo, continuando a finales de los meses de abril, mayo y junio; posteriormente se prosiguió con los muestreos en época no reproductiva en agosto, septiembre, octubre y diciembre. De acuerdo con los datos registrados en la UMA.

La metodología del manejo e identificación de los caimanes fue similar a la presentada anteriormente con los ejemplares de cocodrilo de pantano.



Figura 2. Ejemplar de Caimán de anteojos (*Caiman crocodilus*), localizado en la UMA “El Caimán”, Chiapas.

## **Obtención de muestras**

1.- Muestras sanguíneas: La toma de muestra sanguínea se realizó inmediatamente después de la captura del ejemplar (2-5 min después de la sujeción del ejemplar), por medio de venopunción del seno post occipital. Se utilizaron jeringas de 5 ml con aguja 21 G, para obtener un volumen mínimo de 3 ml, las muestras obtenidas se colocaron en tubos vacutainer estériles con anticoagulante de heparina y sin anticoagulante, para posteriormente dejarlas aclimatar a temperatura ambiente.

Las muestras colocadas en los tubos vacutainer sin anticoagulante se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos para la obtención de suero sanguíneo, el cual se congeló a -20°C, para que una vez obtenidas todas las muestras se realizara la determinación hormonal.

Con las muestras que se colocaron en los tubos vacutainer con anticoagulante de heparina se realizó el conteo total leucocitario y eritrocitario, así como el diferencial leucocitario en un periodo menor de 6 horas.

2.- Medidas morfométricas: Para el análisis de las medidas morfeométricas de los crocodilianos se realizaron las siguientes mediciones con cinta métrica (Truper):

- a) Dimensiones generales del cuerpo (longitudes en mm): Longitud total (LT), longitud hocico – cloaca (LHC), longitud de la cola (LC).
- b) Mediciones del cráneo: Longitud total del hocico (LH), ancho del hocico (AH).
- c) Medición de la circunferencia de la base de la cola (CC).

## **Análisis de muestras**

- 1) Conteo total y diferencial leucocitario:

Para el conteo total y estimar el diferencial de leucocitos y eritrocitos se utilizó la sangre colectada en tubos vacutainer con anticoagulante heparina. Se procedió a homogenizar e introducir la muestra en una pipeta Thoma (Pipeta Thoma para glóbulos rojos) hasta llegar a la marca de 0.5, la sangre restante de la punta y el

exterior se limpió. Como diluyente se utilizó la solución de Natt-Herricks hasta la marca de 10l por encima del bulbo para obtener una dilución final de 1:200. La pipeta se agitó manualmente por un periodo de cinco minutos, previo el cubrimiento de ambos extremos con papel parafilm. Una vez concluido el tiempo de agitación, la pipeta se dejó reposar horizontalmente durante veinte minutos para después volver a agitar durante otros cinco minutos. Finalmente, se descartaron cinco gotas de la pipeta y se colocó una gota de la muestra en la cámara de Neubauer para poder determinar el número de células por microlitro. Se realizó la observación al microscopio con el cuadrante central para el conteo de eritrocitos (5 cuadros) y el total de cuadrantes para el conteo de leucocitos (Mondragón, 2007; Núñez, 2007; Sykes *et al.*, 2008; Sirois, 2014).

Se realizó un frotis sanguíneo con láminas de portaobjetos de microscopio con otra fracción de cada muestra sanguínea presente en los tubos vacutainer con heparina, para realizar el diferencial leucocitario por medio de su fijación con metanol durante un periodo de 20 segundos. Posteriormente, el portaobjetos se colocó en una solución de eosina amortiguada durante 30 segundos y finalmente en una solución de policromo amortiguada durante otros 30 segundos. Una vez que concluyó el tiempo requerido, la lámina se enjuagó con agua destilada y se dejó secar al aire.

El diferencial leucocitario se realizó mediante la observación y conteo de 100 células leucocitarias por cada una de las muestras obtenidas, mediante la fórmula:  
*Célula de interés = (Leucocitos totales x Valor relativo de la célula)/100*  
(Mondragón, 2007; Núñez, 2007; Sykes *et al.*, 2008; Eatwell *et al.*, 2014; Sirois, 2014).

## 2) Medición hormonal de Testosterona:

### a) Estandarización de la técnica de Inmunoensayo ligado a enzimas competitivo (ELISA)

Con el fin de obtener las condiciones adecuadas para poder realizar el ensayo, se procedió con la estandarización de la prueba, donde se utilizaron anticuerpos

policlonales Anti-Testosterona producidos en conejos previamente inmunizados, con una concentración de 14.78 mg/ml. En el ensayo ELISA de tipo competitivo se utilizaron placas MaxiSorp™ de 96 pozos y se probaron concentraciones de 0.5 µg, 1 µg, 2.5 µg y 5 µg/ pozo (50 µl) en la fase de sensibilización, usando solución *buffer* de carbonatos (0.05 M, pH 9.6). Se incluyeron pozos sin contenido de anticuerpos para obtener las uniones no específicas (UNE's) como control de ensayo. Las placas se incubaron durante 18 h a 4°C. Concluido el tiempo de incubación, se descartó el contenido en un recipiente de plástico y se realizaron cuatro lavados con solución de lavado PBS Tween 20 1x, depositando 300 µl de solución en cada uno de los pozos. Las placas se decantaron y se secaron completamente. Para la determinación del esteroide, se utilizó testosterona HRP (producto comercial HRP-Testosterona (Testosterone-3(E)-CMO HRP, Cosmo Bio Co)), donde se probaron las concentraciones correspondientes de 1/5000, 1/10000 y 1/20000 en 50 µl de solución buffer de fosfatos (0.1 M, pH 7). La hormona conjugada se colocó en el mismo momento que los estándares, las muestras o las muestras control, dicha inmunoreacción incubó por dos horas y se probaron diferentes gradientes de temperatura (26°, 27°, 28°, 29° y 30° C). Cuando finalizó la incubación, se realizó el lavado de las placas con solución de lavado como se menciona previamente y se agregaron 100 µl por pozo de la solución de revelado Tetrametilbenzidina (TMB/DMSO en solución de citratos, pH 6.0). Se probaron diferentes periodos de tiempo de incubación correspondientes a 15, 20, 30 y 40 minutos en diferentes grados de temperatura (26°, 27°, 28°, 29° y 30° C), correspondientes al ensayo realizado. Para finalizar, se adicionaron 50 µl a cada uno de los pozos de solución de paro de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N) y se procedió a su lectura con el lector Biotech a una longitud de onda de 450 nm. Con base al procedimiento anterior, se definió la combinación de variables correspondientes a diluciones de anticuerpo, conjugado y temperatura donde la lectura fuera superior a una densidad óptica (Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013).

b) Validación de la técnica de Inmunoensayo ligado a enzimas competitivo (ELISA) para la hormona Testosterona

Para confirmar que el método es apto y confiable para medir testosterona en suero de crocodilianos, se procedió a realizar la validación de la prueba utilizando los siguientes parámetros (Food and drug administration [FDA], 2018):

1.- Curva de calibración: La curva de calibración se realizó con concentraciones conocidas de testosterona, donde se colocaron diez concentraciones por triplicado, correspondientes al rango esperado en el que se cuantifica la hormona en crocodilianos (30 ng/ml-0.117ng/ml). Una vez obtenidas las densidades ópticas (D.O) del ensayo, se realizó la interpolación de datos con el programa AssayZap® mediante un modelo de curva sigmoidea de cuatro parámetros, con lo cual las densidades ópticas obtenidas se transformaron en concentraciones de la hormona (ng/ml). Se calculó el valor de la pendiente, la unión máxima, unión mínima, porcentajes de unión al 20, 50 y 80 % (ED20, ED50 y ED80), así como el coeficiente de correlación para determinar la calidad de la curva y las concentraciones de recuperación de cada uno de los puntos de la curva estándar. La curva fue tomada como válida cuando la pendiente fuera superior a 0.8, la unión máxima mayor a 0.8, unión mínima menor a 0.1, el coeficiente de correlación de la curva superior a 0.9 y el porcentaje de desviación con respecto a las concentraciones recuperadas fuera 20 % de la concentración esperada. Mientras que el % CV de cada punto de la curva fuera menor o igual al 20 %.

2.- Elaboración de muestras control: Se generaron muestras control para la validación del ensayo correspondiente a los valores de unión ED80, ED50 y ED20 de la curva de testosterona realizada con valores de referencia. Se identificaron como muestra control alta (MCA), muestra control media (MCM) y muestra control baja (MCB).

3.- Repetibilidad (r): Para medir la variación intraensayo de las muestras de forma repetida bajo las mismas condiciones de ensayo, se utilizaron los controles MCA, MCM y MCB, los cuales se colocaron en una placa por sextuplicado. Las

concentraciones de las muestras se obtuvieron por medio del programa AssayZap con la curva de calibración. Se consideraron válidas cuando el coeficiente de variación no fuera mayor al 15%.

4.- Reproducibilidad (R): Para medir la variación interensayo de las muestras de forma repetida bajo las mismas condiciones de ensayo, se utilizaron los controles MCA, MCM y MCB, los cuales se analizaron por sextuplicado en tres ensayos diferentes, en tres días distintos. Se calculó la concentración obtenida en cada ensayo y se consideraron como válidas cuando el coeficiente de variación no fuera mayor al 15%.

5.- Exactitud: Para analizar los valores de recuperación de las muestras control obtenidos, se calculó la exactitud, dividiendo la concentración obtenida menos la adicionada entre la concentración esperada. Se consideró como método de aceptación cuando los porcentajes de recuperación estuvieran entre el 80% y 120%.

6.-Integridad de la dilución: Se realizaron diluciones de una muestra de concentración conocida con el diluyente *buffer* fosfatos. En las diluciones correspondientes a 1/2, 1/4, 1/10, 1/50 y 1/60, que se realizaron por triplicado. Se consideraron validas cuando el coeficiente de variación de los porcentajes de recuperación se encontrará entre el 80% y 120% del valor nominal de la muestra adicionada y con un %CV menor al 20%.

7.- Especificidad: La prueba de especificidad se realizó para verificar que no existiera reactividad cruzada con otras hormonas estrechamente relacionadas. Las hormonas que se utilizaron fueron: estradiol (E2), progesterona (P4), cortisol y prolactina, con los parámetros previamente establecidos en la estandarización. Donde el criterio de aceptación fue que para testosterona se obtuvieran densidades ópticas superiores a 1, mientras que con las otras hormonas se obtuvieran densidades ópticas similares a las obtenidas con los UNE.

Una vez concluida las pruebas de estandarización y validación se procedió a realizar los inmunoensayos ligados a enzimas competitivos correspondientes a las muestras

de suero sanguíneo obtenidos de los ejemplares de cocodrilo de pantano y caimán de anteojos en las diferentes épocas, con base en los lineamientos previamente mencionados.

### Análisis estadísticos

Para realizar el análisis de la relación entre los resultados de las variables estudiadas se emplearon modelos lineales generales. Para su estimación se utilizó el lenguaje de programación R y el paquete lme4 (Bates *et al.* 2015). Se evaluó cada una de las variables dependientes: “Testosterona (ng/ml)”, “Leucocitos ( $\times 10^9/L$ )”, “Eritrocitos ( $\times 10^{12}/L$ )”, “Heterófilos ( $\times 10^9/L$ )”, “Basófilos ( $\times 10^9/L$ )”, “Eosinófilos ( $\times 10^9/L$ )”, “Linfocitos ( $\times 10^9/L$ )” y “Monocitos ( $\times 10^9/L$ )” como funciones de las variables independientes: a) Época (reproductiva y no reproductiva) y b) Especie: cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*) y caimán de anteojos (*Caiman crocodylus*). Así mismo, se evaluó cada una de las variables dependientes, en cada una de las épocas como funciones de las medidas morfométricas (LHC: largo hocico-cloaca, LH: largo hocico y CC: circunferencia de la cola). Se incluyó el efecto aleatorio “Identificación del individuo (ID)” para reducir los efectos de pseudoréplica, así como para cuantificar los efectos aleatorios de cada individuo. Se realizó la selección de modelos para cada variable dependiente con base en el criterio de información de Akaike, donde se seleccionó aquel que tuviera el menor valor de Akaike, entre los modelos: modelo aditivo ( $y \sim \text{época} + \text{especie} + (1|ID)$ ), uno con interacción ( $y \sim \text{época} \times \text{especie} + (1|ID)$ ) y un modelo nulo ( $y \sim (1|ID)$ ). Se verificó que los modelos cumplieran con los supuestos de homocedasticidad, normalidad de los residuales y evaluación de valores de influencia (i.e. distancia de cook >1). En caso de ser necesario se realizó la transformación logarítmica de las variables para el cumplimiento de los supuestos de los modelos.

#### IV.- Resultados

Estandarización de la prueba de ELISA para la cuantificación de testosterona

En el cuadro 1 se muestra los resultados obtenidos en la estandarización y las mejores condiciones para la realización de un ELISA competitivo para la cuantificación de testosterona en suero de crocodilianos.

*Cuadro 1. Condiciones óptimas para la estandarización de un ELISA competitivo para la medición de testosterona en suero de crocodilianos.*

<b>Estandarización ELISA competitivo</b>	
Concentración del anticuerpo Anti-Testosterona	2.5 µg / pozo en 50 µl de solución de carbonatos
Primera incubación	18 h a 4°C
Dilución del conjugado HRP-Testosterona	1/5000
Segunda incubación	30°C durante 2 horas
Tiempo de incubación con TMB/DMSO	20 minutos a 30°C
Solución de paro	50 µl /pozo
Longitud de onda para lectura	450 nm

Validación de la prueba de ELISA competitivo

Curva de calibración: La curva de calibración se realizó con concentraciones desde 30 ng/ml hasta 0.058ng/ml, con una interpolación de los resultados en el programa AssayZap®, con lo que se evaluó la calidad de la curva con un resultado de 0.9997, como se puede observar en la figura 3. Se realizaron los cálculos para obtener los porcentajes de recuperación de cada uno de los puntos de la curva, los cuales se encontraron dentro del 80% y 120% del valor nominal, como se muestra en el cuadro 2.

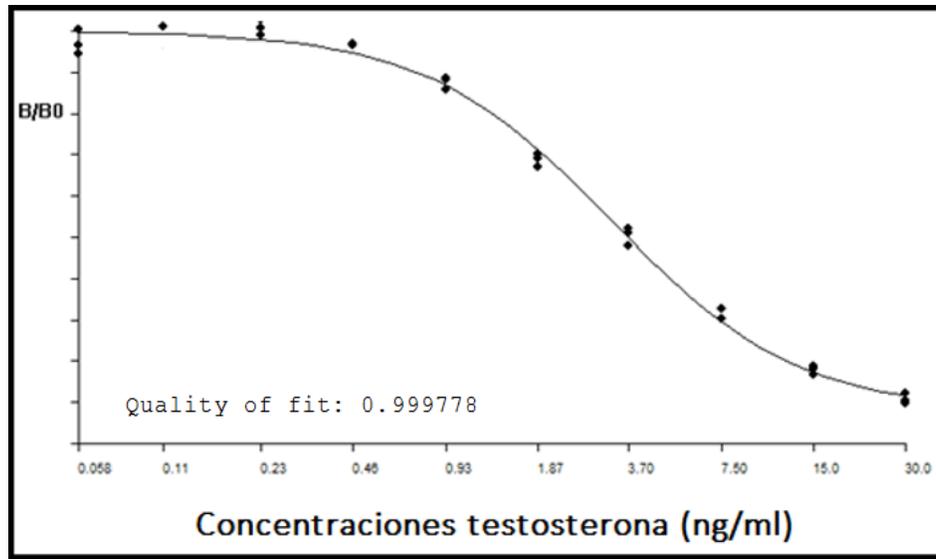


Figura 3. Curva de calibración para la medición de hormona testosterona en suero de crocodilianos con concentraciones de 30 ng/ml hasta 0.058 ng/ml

Cuadro 2. Porcentajes de recuperación obtenidos en la validación de una prueba de ELISA en cada uno de los puntos de la curva estándar para la cuantificación de testosterona sérica en crocodilianos.

Concentración testosterona (ng/ml)	% recuperación	Concentración testosterona (ng/ml)	% recuperación
30	90.43	0.937	94.62
15	96.13	0.468	104.35
7.5	93.73	0.234	104.35
3.75	98.38	0.117	118.18
1.875	109.09	0.058	No cuantificable

Repetibilidad: Se realizó la determinación de repetibilidad para medir la variación intraensayo de las muestras control. En el cuadro 3 se muestra el promedio, desviación estándar (D.E.), porcentaje de coeficiente de variación (% CV) y porcentaje de recuperación de estas, se obtuvieron resultados dentro de los parámetros de aceptación previamente mencionados.

*Cuadro 3. Porcentajes de recuperación obtenidos, promedio de las repeticiones, desviación estándar y porcentaje de coeficiente de variación intraensayo para las muestras control alta, media y baja en la validación de una prueba de ELISA para medición de testosterona.*

<b>Muestra</b>	<b>Repeticiones</b>	<b>Promedio</b>	<b>% Recuperación</b>	<b>D.E</b>	<b>% CV</b>
<b>MCA</b>	6	11.37	94.8	0.3	2.6
<b>MCM</b>	6	7.24	96.5	0.4	5.5
<b>MCB</b>	6	3.64	96.97	0.27	7.4

Reproducibilidad: Se realizó la determinación de reproducibilidad para medir la variación interensayo de las muestras control con tres ensayos independientes. En el cuadro 4 se muestra el promedio, desviación estándar (D.E.) y porcentaje de coeficiente de variación (% CV), los cuales están dentro de los parámetros de aceptación previamente mencionados.

*Cuadro 4. Promedio de las repeticiones, desviación estándar (D.E) y porcentaje de coeficiente de variación interensayo (% CV) para las muestras control alta, media y baja en la validación de una prueba de ELISA para medición de testosterona.*

<b>Muestra</b>	<b>Repeticiones</b>	<b>Promedio</b>	<b>D.E</b>	<b>% CV</b>
<b>MCA</b>	18	11.68	0.5	4.28
<b>MCM</b>	18	7.4	0.14	1.89
<b>MCB</b>	18	3.58	0.27	7.5

Integridad de la dilución: A partir de una muestra con concentración conocida de 35 ng/ml se realizaron 5 diluciones, en donde se obtuvieron porcentajes de recuperación entre el 80% y 120%, los cuales quedan dentro de los parámetros de aceptación, como se demuestra en el cuadro 5.

*Cuadro 5. Porcentajes de recuperación, desviación estándar (D.E) y porcentaje de coeficiente de variación (% CV) para las diluciones realizadas a partir de una muestra con concentración de 35 ng/ml de testosterona.*

<b>Dilución</b>	<b>% Recuperación</b>	<b>Promedio</b>	<b>D.E</b>	<b>% CV</b>
<b>1/2</b>	99.8	17.48	0.08	0.45
<b>1/3</b>	97.70	11.3	0.15	1.32
<b>1/4</b>	98.43	8.61	0.15	1.7
<b>1/10</b>	103.3	3.6	0.14	3.8
<b>1/50</b>	104.7	0.73	0.06	8.2

Especificidad: Para testosterona se obtuvieron densidades ópticas superiores a 1, mientras que con las otras hormonas se obtuvieron densidades ópticas similares a las obtenidas con los UNE, con lo que se concuerda el criterio de aceptación (Cuadro 6).

*Cuadro 6. Porcentajes de unión obtenidas con diferentes hormonas esteroides, analizadas con los parámetros y reactivos obtenidos en la estandarización de una prueba de ELISA para prueba de especificidad en la medición de testosterona en suero de crocodilianos*

<b>Hormona</b>	<b>Repeticiones</b>	<b>% De Unión</b>	<b>D.E</b>	<b>% CV</b>
<b>Testosterona</b>	6	100	0.04	2.84
<b>Estradiol</b>	6	3.44	0.003	6.11
<b>Progesterona</b>	6	5.5	0.005	7.14
<b>Cortisol</b>	6	6.85	0.004	4.01
<b>Prolactina</b>	6	4.13	0.01	18.4
<b>UNE</b>	6	2.75	0.0005	1.35

Con los resultados obtenidos se verificó que la metodología analítica es válida para la determinación de testosterona sérica en sueros de cocodrilos, ya que demostró ser exacta, precisa y específica, con lo que se procedió al análisis de las muestras.

## Modelos lineales generales de efectos mixtos

### Hormona esteroide: Testosterona

El modelo de testosterona seleccionado correspondió al aditivo ( $Testosterona \sim \acute{E}poca + Especie + (1|ID)$ ), en el que se encontró que estadísticamente, en ambas especies de crocodilianos, los valores séricos de testosterona son mayores en época reproductiva comparados con los encontrados en época no reproductiva (Estimado= 5.007,  $t = 3.72$ ,  $p < 0.01$ , Intervalo de Confianza (IC)= 95%). Es la especie de cocodrilo de pantano la que presenta mayores niveles séricos cotejada con el caimán de anteojos (Estimado= 9.82,  $t = 2.48$ ,  $p < 0.05$ , IC 95%). La media estimada de testosterona del cocodrilo de pantano (*C. moreletii*) fue de 15.9 ng/ml en época no reproductiva siendo significativamente menor a la obtenida en época reproductiva de 20.9 ng/ml (Estimado= -5.01,  $t = 3.7$ ,  $p < 0.01$ , IC 95%). En tanto que la media estimada en época no reproductiva para el caimán de anteojos (*C.c.chiapasius*) presentó un valor de 6.1 ng/ml, la cual es significativamente menor a la obtenida en época reproductiva de 11.1 ng/ml (Estimado= -5.01,  $t = 3.7$ ,  $p < 0.0$ , IC 95%), como se muestra en la figura 4.

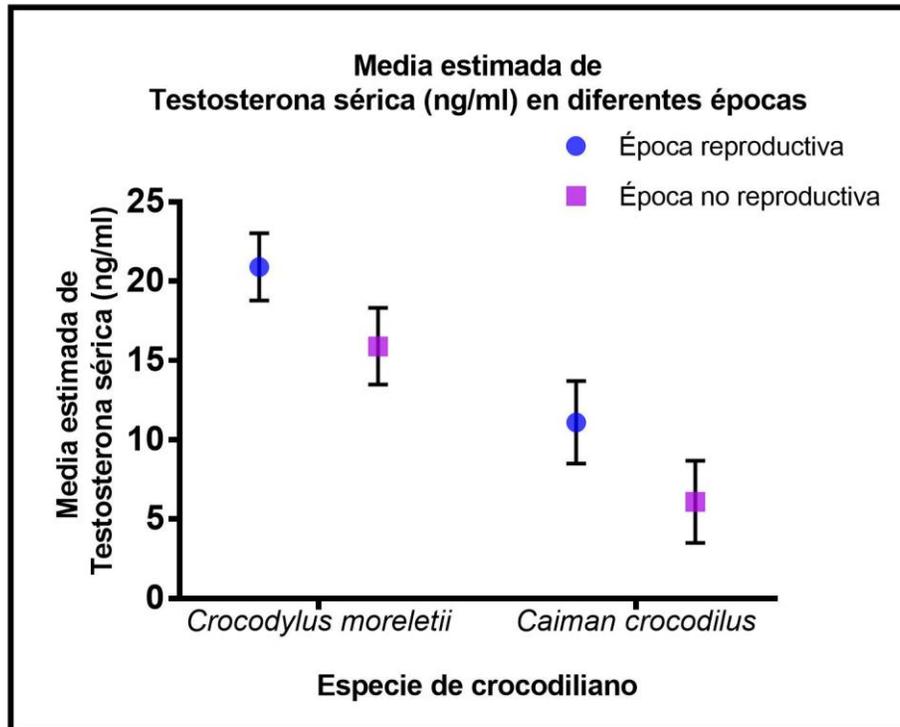


Figura 4. Medias Estimadas de los niveles séricos de testosterona (ng/ml) en función de las diferentes épocas y especies de crocodilianos. Se representan los intervalos de confianza  $\pm 95\%$ .

### Sistema inmune innato: Leucocitos totales

El análisis de leucocitos totales fue mediante un modelo aditivo ( $Leucocitos\ totales \sim \acute{E}poca + Especie + (1|ID)$ ), en el cual, como se puede observar en la figura 5, se obtuvieron en época reproductiva significativamente valores menores de leucocitos en las dos especies de crocodilianos (Estimado= -1.01,  $t = -3.51$ ,  $p < 0.01$ , IC 95%). En el cocodrilo de pantano (*C. moreletii*) se obtuvo una media estimada de  $3.37 \times 10^9/L$  en época no reproductiva, significativamente mayor a la obtenida en época reproductiva de  $2.36 \times 10^9/L$  (Estimado= 1.016,  $t = 3.45$ ,  $p < 0.01$ , IC 95%). Con relación al caimán (*C.c.chiapasius*) en época no reproductiva la media estimada fue de  $3.15 \times 10^9/L$ , la cual es significativamente mayor a la obtenida en época reproductiva de  $2.14 \times 10^9/L$  (Estimado= 1.01,  $t = 3.45$ ,  $p < 0.01$ , IC 95%). No se mostraron diferencias entre los valores de leucocitos totales

encontrados entre las dos especies de crocodilianos en ninguna de las épocas (Estimado= 0.22,  $t= 0.72$ ,  $p>0.05$ , IC 95%).

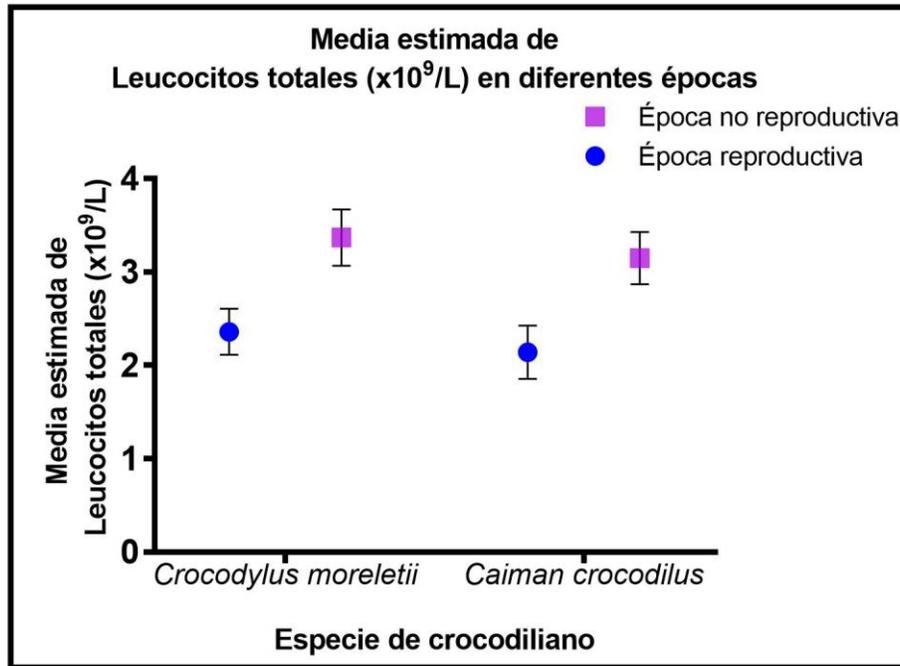


Figura 5. Medias Estimadas de los valores de leucocitos totales ( $\times 10^9/L$ ) en función de las diferentes épocas y especies de crocodilianos. Se representan los estimados de confianza  $\pm 95$

### Diferencial de células leucocitarias

#### Heterófilos

El análisis de heterófilos totales se realizó mediante un modelo aditivo ( $Heterófilos \sim \acute{E}poca + Especie + (1|ID)$ ), en el cual se observa que en época reproductiva los valores obtenidos de heterófilos fueron significativamente menores comparados con los de época no reproductiva (Estimado= -0.72,  $t= -3.51$ ,  $p<0.01$ , IC 95%) (Figura 6). Las medias estimadas para el cocodrilo de pantano en época no reproductiva y reproductiva presentaron valores de  $2.09 \times 10^9/L$  y  $1.3 \times 10^9/L$  respectivamente (Estimado= 0.72,  $t= 3.45$ ,  $p<0.01$ , IC 95%). En tanto la obtenida

para caimán de anteojos en época no reproductiva fue de  $2.07 \times 10^9/L$  significativamente mayor a la obtenida en época reproductiva de  $1.35 \times 10^9/L$  (Estimado= 0.72,  $t= 3.45$ ,  $p < 0.01$ , IC 95%). No se obtuvieron diferencias significativas entre los niveles de heterófilos totales encontrados entre las dos especies de crocodilianos en ninguna de las épocas (Estimado= 0.02,  $t= 0.52$ ,  $p > 0.05$ , IC 95%).

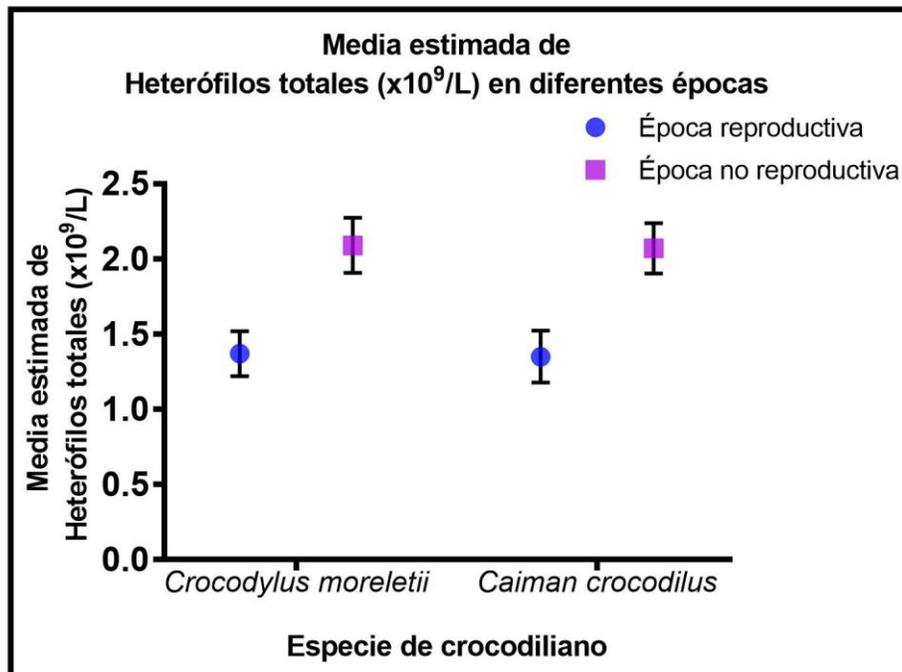


Figura 6. Medias Estimadas de los valores de heterófilos totales ( $\times 10^9/L$ ) en función de las diferentes épocas y especies de crocodilianos. Se representan los estimados de confianza  $\pm 95$

### **Basófilos**

Respecto al conteo de basófilos totales, el modelo nulo ( $Basófilos \sim + (1|ID)$ ), fue el seleccionado, en donde ni la época ni la especie explican los niveles de basófilos séricos.

### **Eosinófilos**

El modelo seleccionado de eosinófilos corresponde al modelo aditivo ( $Eosinófilos \sim \acute{E}poca + Especie + (1|ID)$ ), no se encontraron diferencias

significativas para los niveles totales de eosinófilos entre época reproductiva y no reproductiva en ninguna de las dos especies de crocodilianos (Estimado= 0.001,  $t= 0.19$ ,  $p>0.05$ , IC 95%). Tampoco existen diferencias significativas entre los niveles totales de eosinófilos entre las dos especies de crocodilianos (Estimado=0.01,  $t= 1.6$ ,  $p>0.05$ , IC 95%).

### **Linfocitos**

Para realizar el análisis de los linfocitos totales se utilizó un modelo aditivo ((*Linfocitos*~*Época* + *Especie* + (1|*ID*)), en el que se encontraron diferencias significativas para los niveles totales de linfocitos entre época reproductiva y no reproductiva en las dos especies de crocodilianos, con valores menores en época reproductiva (Estimado= -0.18,  $t= -2.81$ ,  $p <0.01$ , IC 95%). En el caso de cocodrilo de pantano se obtuvo una media estimada de  $0.871 \times 10^9/L$  en época no reproductiva, la cual fue significativamente mayor a la obtenida en época reproductiva con una media estimada de  $0.691 \times 10^9/L$  (Estimado= 0.18,  $t= 2.77$ ,  $p<0.05$ , IC 95%). La diferencia de linfocitos totales para caimán en época no reproductiva tuvo una media estimada de  $0.702 \times 10^9/L$ , significativamente mayor a la obtenida en época reproductiva de  $0.523 \times 10^9/L$  (Estimado= 0.18,  $t= 2.77$ ,  $p<0.05$ , IC 95%) (Figura 7). No se obtuvieron diferencias significativas entre los niveles de linfocitos totales encontrados entre las dos especies de crocodilianos en ninguna de las épocas (Estimado= 0.16,  $t= 1.85$ ,  $p>0.05$ , IC 95%).

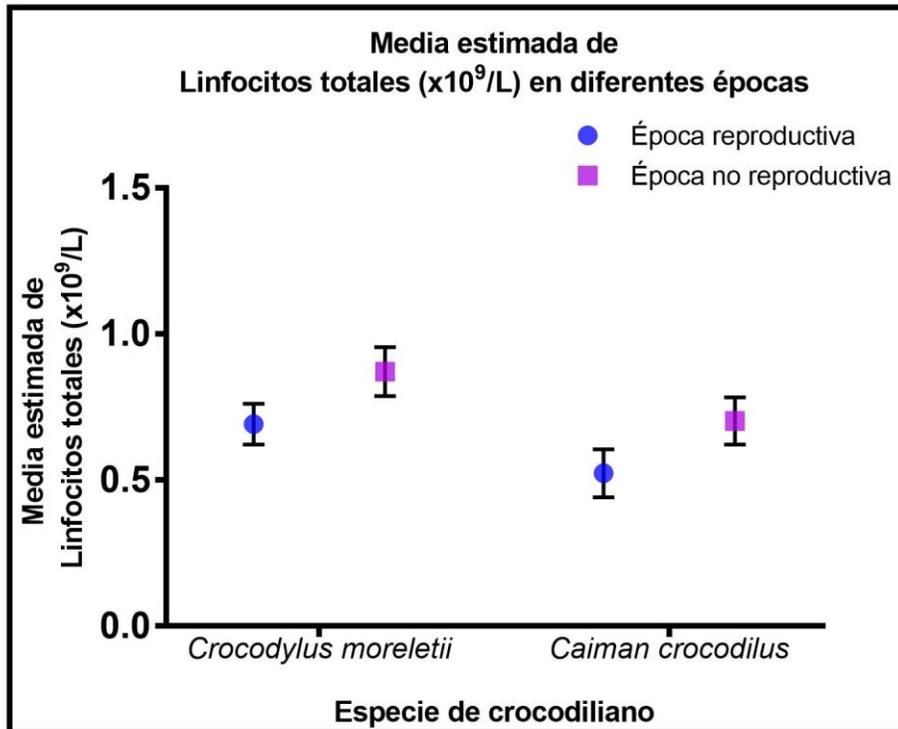


Figura 7. Medias Estimadas de los valores de linfocitos totales ( $\times 10^9/L$ ) en función de las diferentes épocas y especies de crocodilianos. Se representan los estimados de confianza  $\pm 95$

### Monocitos

Estadísticamente en el modelo de monocitos seleccionado correspondiente al aditivo ( $Monocitos \sim \acute{E}poca + Especie + (1|ID)$ ) se encontraron diferencias significativas, con valores menores en época reproductiva en las dos especies de crocodilianos (Estimado= -0.1,  $t = 3.13$ ,  $p < 0.01$ ). Respecto a la media estimada obtenida en la especie de cocodrilo de pantano de  $0.26 \times 10^9/L$  en época no reproductiva fue significativamente mayor a la obtenida en época reproductiva con una media estimada de  $0.16 \times 10^9/L$  (Estimado= 0.1,  $t = 3.08$ ,  $p < 0.05$ , IC 95%), como se muestra en la Figura 8. En el caso del conteo total de monocitos para caimán en época no reproductiva se obtuvo una media estimada de  $0.29 \times 10^9/L$ , significativamente mayor a la obtenida en época reproductiva de  $0.19 \times 10^9/L$  (Estimado= 0.1,  $t = 3.08$ ,  $p < 0.05$ , IC 95%). No se obtuvieron diferencias significativas

entre los niveles de monocitos totales encontrados entre las dos especies de crocodilianos en ninguna de las épocas (Estimado= 0.03,  $t= 1.2$ ,  $p>0.05$ , IC 95%).

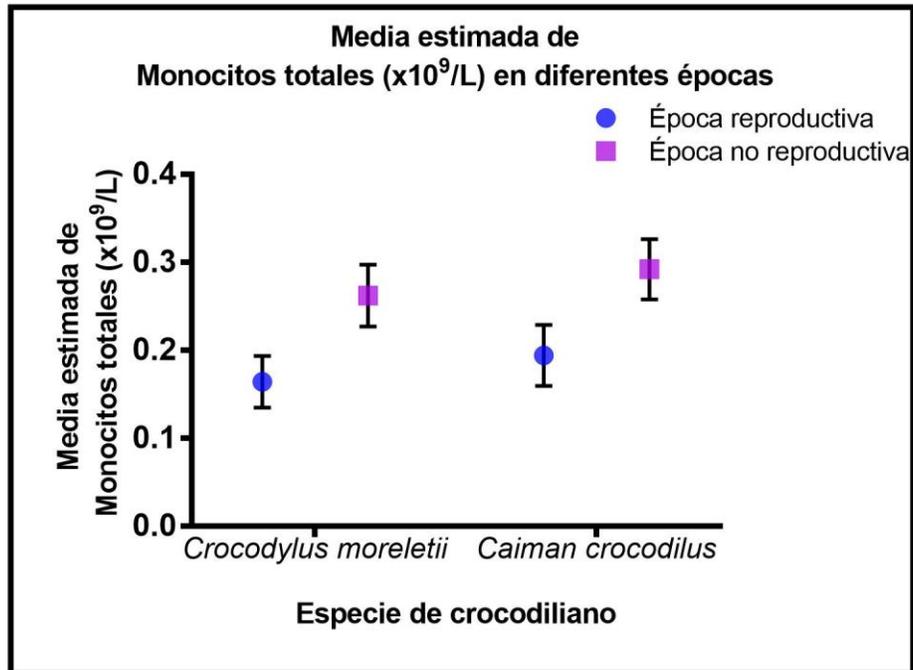


Figura 8. Medias Estimadas de los valores de monocitos totales ( $\times 10^9/L$ ) en función de las diferentes épocas y especies de crocodilianos. Se representan los estimados de confianza  $\pm 95$

### Eritrocitos

Para el análisis de eritrocitos totales se utilizó un modelo aditivo ( $Eritrocitos \sim \acute{E}poca + Especie + (1|ID)$ ), en el cual no se encontraron diferencias significativas entre época reproductiva y no reproductiva en ninguna de las dos especies de crocodilianos (Estimado= 0.09,  $t= -1.15$ ,  $p>0.05$ , IC 95%). Sin embargo, existen diferencias significativas entre los niveles totales de eritrocitos entre las dos especies, en donde el cocodrilo de pantano presenta mayores niveles de eritrocitos con una media estimada de  $1.12 \times 10^{12}/L$ , comparado con los niveles obtenidos de caimán con una media estimada de  $0.89 \times 10^{12}/L$  (Estimado= 0.22,  $t= 2.68$ ,  $p<0.05$ , IC 95%), como se muestra en la figura 9.

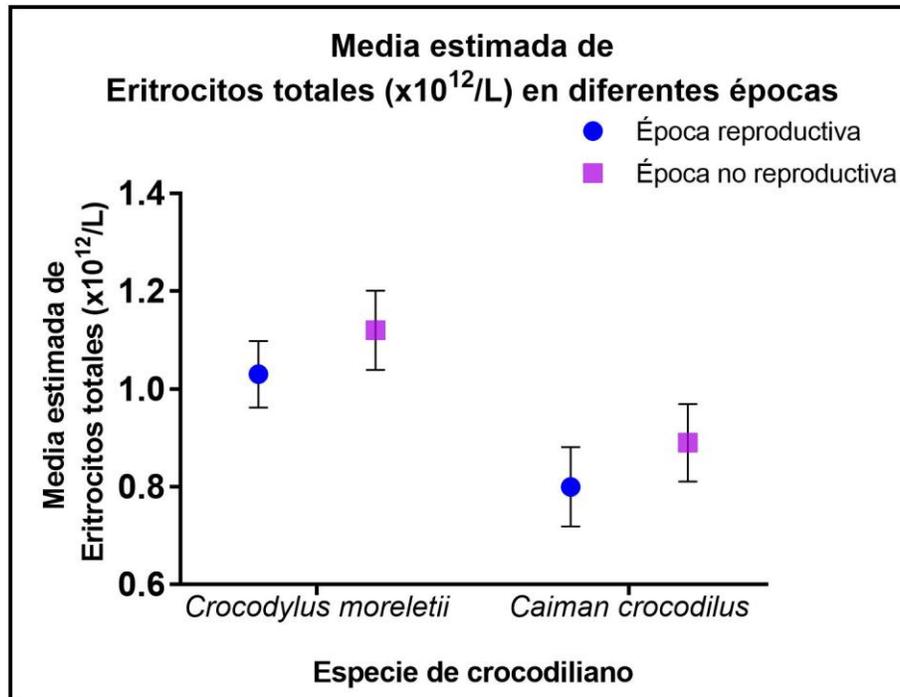


Figura 9. Medias Estimadas de los valores de eritrocitos totales ( $x10^{12}/L$ ) en función de las diferentes épocas y especies de crocodilianos. Se representan los estimados de confianza  $\pm 95$

### **Medidas morfométricas**

Se analizaron las variables dependientes previamente descritas (testosterona, células leucocitarias y eritrocitos) en función de tres medidas morfométricas: longitud hocico-cloaca (LHC), largo del hocico (LH) y circunferencia de la base de la cola (CC), esta última se incluyó debido a que se ha observado que es una zona de almacenamiento tisular de reserva energética.

### **Largo hocico-cloaca, circunferencia cola, largo hocico**

Se realizaron cada uno de modelos lineales generales (aditivo, interacción y nulo) de las variables dependientes en función de las medidas morfométricas LHC, LH y CC, en donde se obtuvo diferencias significativas con los modelos de Testosterona en función de LHC, LH y CC en época no reproductiva. Así como también se encontraron diferencias estadísticamente significativas de leucocitos en función de LHC, como se observa en el cuadro 7.

Cuadro 7. Resultados de los estimados y significancia de las variables dependientes en función de las medidas morfométricas LHC: largo hocico-cloaca, LH: Largo hocico y CC: circunferencia de cola. \*Valores estadísticamente significativos

	LHC						LH						CC					
	Reproductiva			No reproductiva			Reproductiva			No reproductiva			Reproductiva			No reproductiva		
	Estimado	t	Sig.	Estimado	t	Sig.	Estimado	t	Sig.	Estimado	t	Sig.	Estimado	t	Sig.	Estimado	t	Sig.
<b>Testosterona (ng/ml)</b>	0.005	0.24	p > 0.05	0.4	2.7	p < 0.05 *	0.11	0.42	p > 0.05	0.21	2.61	p < 0.05 *	0.003	0.21	p > 0.05	0.07	2.7	p < 0.05 *
<b>Leucocitos (X10<sup>9</sup>)</b>	0.002	1.58	p > 0.05	0.02	2.07	p < 0.05 *	0.002	0.49	p > 0.05	0.01	0.73	p > 0.05	0.0006	0.2	p > 0.05	0.003	0.62	p > 0.05
<b>Heterófilos (X10<sup>9</sup>)</b>	0.001	1.73	p > 0.05	0.002	1.81	p > 0.05	0.001	0.64	p > 0.05	0.01	0.87	p > 0.05	0.0006	0.4	p > 0.05	0.002	0.7	p > 0.05
<b>Basófilos (X10<sup>9</sup>)</b>	0.00008	1.13	p > 0.05	0.0009	0.3	p > 0.05	0.003	0.27	p > 0.05	0.004	0.26	p > 0.05	0.0004	0.22	p > 0.05	0.001	0.38	p > 0.05
<b>Eosinófilos (X10<sup>9</sup>)</b>	0.00001	0.49	p > 0.05	0.0004	0.4	p > 0.05	0.001	0.26	p > 0.05	0.003	0.55	p > 0.05	0.00002	0.41	p > 0.05	0.00005	0.6	p > 0.05
<b>Linfocitos (X10<sup>9</sup>)</b>	0.0007	1.26	p > 0.05	0.002	2.33	p < 0.05 *	0.0009	0.36	p > 0.05	0.002	0.44	p > 0.05	0.00002	0.2	p > 0.05	0.0007	0.42	p > 0.05
<b>Monocitos (X10<sup>9</sup>)</b>	0.0001	1.25	p > 0.05	0.0006	1.3	p > 0.05	0.0003	0.42	p > 0.05	0.0007	0.13	p > 0.05	0.0001	0.27	p > 0.05	0.0002	0.27	p > 0.05
<b>Eritrocitos (X10<sup>12</sup>)</b>	0.00005	0.19	p > 0.05	0.001	1.03	p > 0.05	0.003	1.17	p > 0.05	0.006	2.5	p > 0.05	0.0004	0.62	p > 0.05	0.001	1.63	p > 0.05

Como se puede observar no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las medidas morfométricas y los niveles de testosterona en época reproductiva. Sin embargo, en época no reproductiva existen diferencias significativas con los niveles de testosterona obtenidos. Los animales con mayor longitud hocico-cloaca son los que presentan mayores niveles séricos de testosterona en las dos especies (Estimado=0.4,  $t= 2.7$ ,  $p<0.05$ , IC 95%), como se muestra en la figura 10.

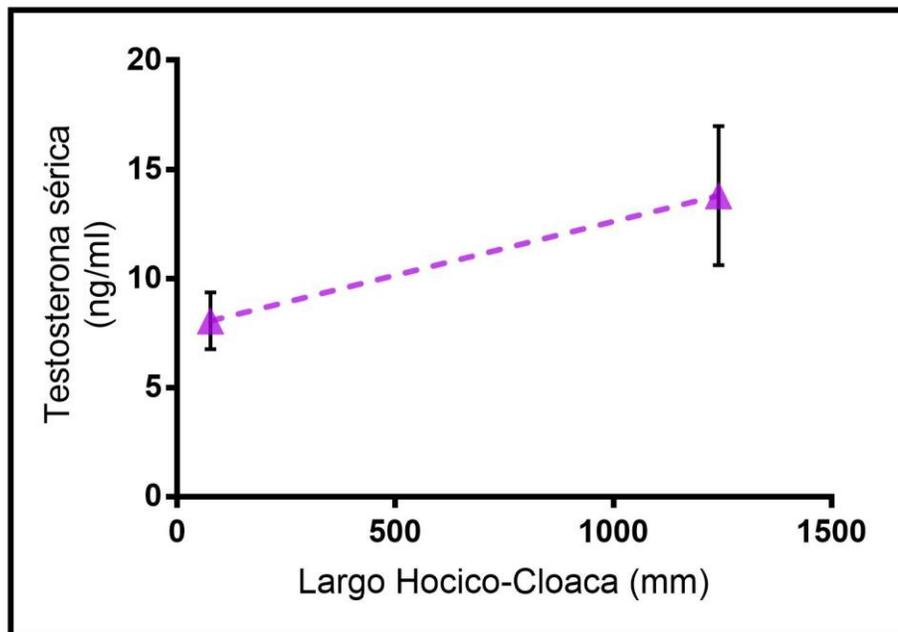


Figura 10. Media estimada de testosterona sérica (ng/ml) en época no reproductiva en función de la medida morfométrica largo hocico-cloaca. Se representan los estimados de confianza  $\pm 95$

Así mismo, con los modelos aditivos: ( $Testosterona \sim LH + Especie + (1|ID)$ ) y ( $Testosterona \sim CC + Especie + (1|ID)$ ), se encontraron diferencias estadísticamente significativas en donde animales con mayor longitud de hocico (Estimado= 0.21,  $t= 2.6$ ,  $p<0.05$ , IC 95%) (Figura 11) y circunferencia de la cola (Estimado= 0.07,  $t= 2.7$ ,  $p<0.05$ , IC 95%) (Figura 12) presentaron mayores niveles de testosterona.

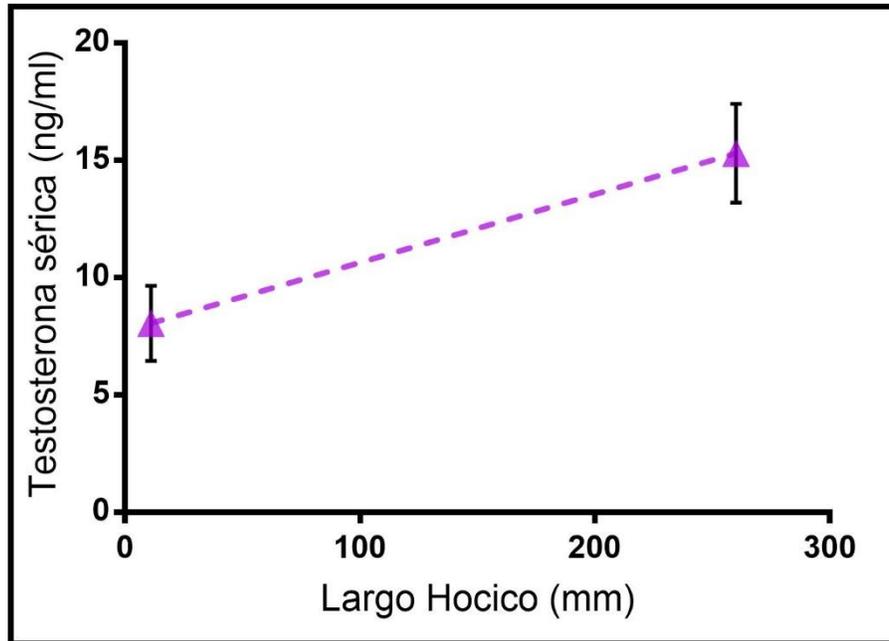


Figura 11. Media estimada de testosterona sérica (ng/ml) en época no reproductiva en función de la medida morfométrica largo hocico. Se representan los estimados de confianza  $\pm 95$

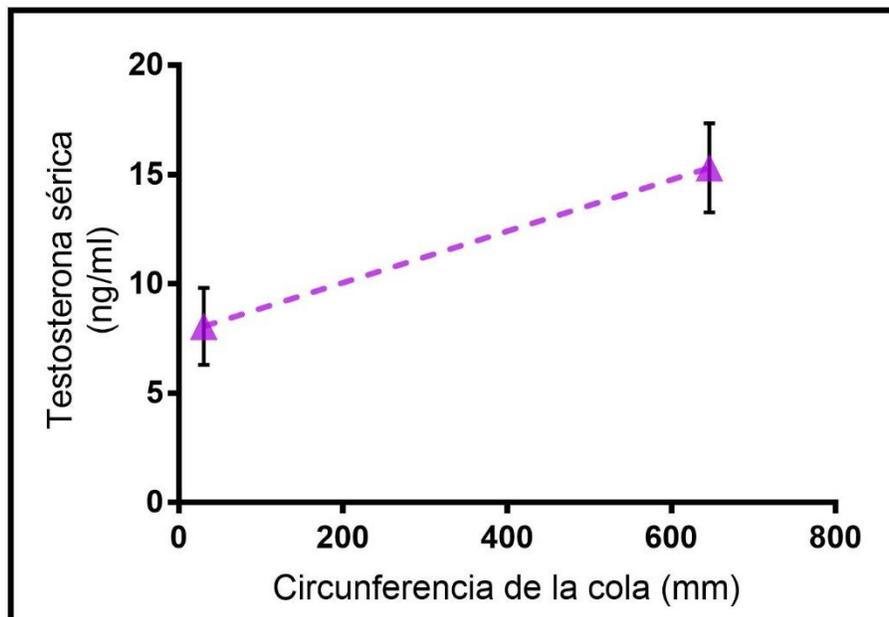


Figura 12. Media estimada de testosterona sérica (ng/ml) en época no reproductiva en función de la medida morfométrica circunferencia de la cola. Se representan los estimados de confianza  $\pm 95$

Con los modelos para la variable de leucocitos en época reproductiva no se encontraron diferencias significativas con ninguna de las tres medidas morfométricas. Mientras que en época no reproductiva con el modelo aditivo ( $Leucocitos \sim LHC + Especie + (1|ID)$ ), se encontraron diferencias significativas con los niveles obtenidos de leucocitos, donde los animales con mayor longitud hocico-cloaca son los que presentan mayores niveles de leucocitos totales (Estimado= 0.02,  $t = 2.07$ ,  $p < 0.05$ , IC 95%), como se muestra en la figura 13.

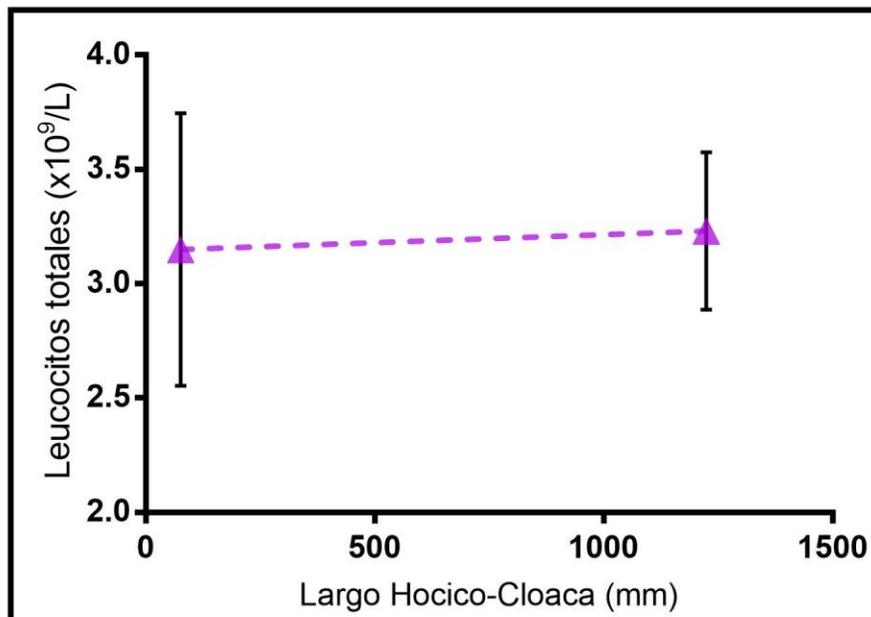


Figura 13. Media estimada de leucocitos totales ( $\times 10^9/L$ ) en época no reproductiva en función de la medida morfométrica Largo Hocico-cloaca. Se representan los estimados de confianza  $\pm 95$

Para los niveles de leucocitos en función de las medidas largo-hocico y circunferencia de la cola no existen diferencias significativas en ninguna de las especies.

En época reproductiva, con los modelos de la variable linfocitos en función de las tres medidas morfométricas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, en el modelo aditivo ( $Linfocitos \sim LHC + Especie + (1|ID)$ ), en época no reproductiva, se encontraron estadísticamente diferencias

significativas con los niveles obtenidos de linfocitos, donde los animales con mayor longitud hocico-cloaca son los que presentan mayores niveles de linfocitos totales (Estimado= 0.002,  $t= 2.33$ ,  $p<0.05$ , IC 95%) (Figura 14). No existen diferencias significativas para los valores de linfocitos obtenidos en función de las medidas de largo-hocico y circunferencia de la cola.

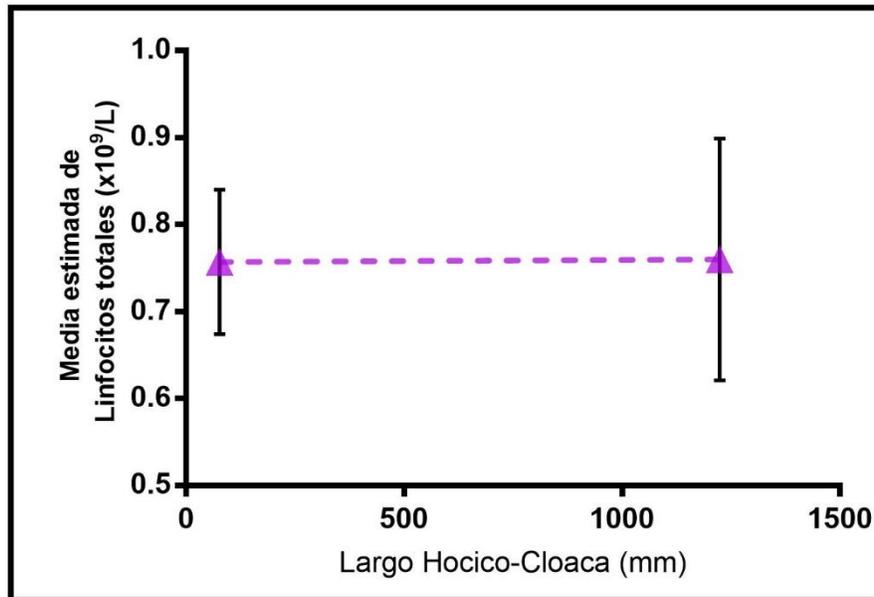


Figura 14. Media estimada de linfocitos totales ( $\times 10^9/L$ ) en época no reproductiva en función de la medida morfométrica Largo Hocico-cloaca. Se representan los estimados de confianza  $\pm 95$

Para las variables de heterófilos, basófilos, eosinófilos y monocitos en función de las tres medidas morfométricas no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las especies ni épocas.

## V.- Discusión

Es necesario estudiar con un enfoque integral los diferentes sistemas fisiológicos intrínsecos que forman parte de los organismos. La secreción de testosterona en estas especies presenta cambios en su fluctuación durante las épocas reproductiva y no reproductiva, como se observa en los resultados, un aumento de los niveles séricos de testosterona se observó durante la época reproductiva en ambas especies de crocodilianos. La especie de cocodrilo de pantano presentó una media estimada de testosterona de 20.9 ng/ml en época reproductiva siendo significativamente mayor a la obtenida en época no reproductiva de 15.9 ng/ml. En tanto que la media estimada en época reproductiva para el caimán de anteojos (*C.c.chiapasius*) presentó un valor de 11.1 ng/ml, la cual es significativamente mayor a la obtenida en época no reproductiva de 6.1 ng/ml. Esta elevación de testosterona también se ha observado en ejemplares de caimán americano (*Alligator mississippiensis*), donde Lance (2003) informó que los niveles más altos de testosterona en suero se han encontrado en época de cortejo con un pico de 75 ng/ml mientras que en los meses que no hay actividad reproductiva tienen una media de 2 ng/ml. También en el caso del cocodrilo cubano (*Crocodylus rhombifer*), los machos en época reproductiva presentaron mayores niveles de testosterona en heces comparado con otras épocas, así como las concentraciones de testosterona encontradas en hembras de la misma especie (Augustine *et al.*, 2020). Las variaciones de los niveles de testosterona, independientemente del sexo y género filogenético, se pueden explicar por los procesos evolutivos que han presentado las diferentes especies, los cuales producen variaciones en las propiedades del sistema reproductivo, con consecuencias en las necesidades y la jerarquía de distribución de recursos entre los sistemas fisiológicos, por ejemplo, se ha demostrado que los atributos fisiológicos específicos varían debido a una segregación espacial a lo largo de diferentes gradientes ambientales en los que se han desarrollado los individuos (Hau, 2007; Segner *et al.*, 2017).

El preciso mecanismo de la regulación de la función testicular y secreción hormonal de testosterona en crocodilianos es de conocimiento limitado, se han aislado varias

isoformas de la hormona hormona liberadora de gonadotropina (GnRH, cGnRH-I and cGnRH-II en *Alligator mississippiensis*), así como de dos gonadotropinas similares a sus homologos de la hormona luteinizante (LH) y de la hormona folículo-estimulante (FSH) en mamíferos, la LH parece tener un papel en el incremento y producción de andrógenos en machos, sin embargo, se ha reportado que la FSH de mamíferos tiene un potente efecto en la regulación de la esteroidogénesis en tortugas y caimanes (Kumar *et al.*, 2011).

El aumento de los niveles séricos de testosterona durante la época reproductiva es dado por el posible resultado de la necesidad de los machos de desarrollar conductas o señales sexuales, capaces de ser indicadores confiables de su calidad genética para las hembras y así poder lograr los beneficios asociados con un incremento en la inversión energética para la reproducción y con ello el éxito reproductivo. Dentro de las conductas demostradas en el comportamiento reproductivo de los crocodilianos machos, se encuentran las vocalizaciones y posturas corporales, asociadas con establecer y mantener el estatus jerárquico, donde los individuos más dominantes tienen mayor acceso a la cópula (Budd *et al.*, 2015; Goldstein y Gray, 2018). En algunas especies de aves, por ejemplo, en el grévol chino (*Tetrastes sewerzowi*), se demostró que aquellos machos que presentaron un mayor aumento en los niveles séricos de testosterona, expusieron una mayor coloración rojiza de su cresta, una mejor condición corporal y una mayor cantidad de cópulas comparados con los ejemplares con menores niveles de testosterona, resultado consistente con la hipótesis de que el tamaño y la coloración de la cresta son señales honestas de una mejor calidad genética del macho de estas especies, señales mediadas por testosterona (Yang *et al.*, 2013).

En el caso de crocodilianos, el tamaño del ejemplar y el comportamiento agresivo, son características que parecen ser constantes en los ejemplares más dominantes, muchos investigadores han correlacionado positivamente a la testosterona con el dominio social (Lang, 1987; De Barros, 2001; Da Silveira *et al.*, 2011). Esta información corresponde con los resultados obtenidos en este estudio, debido a que los ejemplares con mayores longitudes fueron aquellos que presentaron los

mayores niveles de testosterona, ya que son individuos más competitivos, capaces de tener los recursos energéticos relacionados a la síntesis de testosterona aún en épocas no reproductivas. Este aumento de testosterona en función del tamaño del individuo concuerda con los resultados obtenidos en el cocodrilo de Nilo (*Crocodylus niloticus*), en donde niveles de testosterona basal más elevados se encontraron en los animales más grandes (Individuos de longitud: >75 cm: 2344 +/- 16 pg/ml) comparados con aquellos más pequeños (Individuos de longitud <65 cm: 815 +/- 91 pg/ml) (Morpurgo *et al.*, 1992). También en el caimán americano, donde los machos más largos presentaron mayores niveles de testosterona en época reproductiva comparado con los machos más pequeños (Milnes *et al.*, 2002; Hamlin *et al.*, 2011).

La relación entre la longitud del individuo y los niveles séricos de testosterona sintetizada, puede ser explicada por los siguientes factores: En primera instancia, se conoce que la hormona testosterona es una hormona relacionada con factores anabólicos, los cuales incrementan la síntesis de proteína, así como la estimulación de factores de crecimiento de la somatotropina (en especies de vertebrados con dimorfismo sexual donde los machos son más largos que las hembras), por lo que, a mayor secreción de testosterona mayor longitud del individuo (Rooney *et al.*, 2004; John-Alder *et al.*, 2007). El segundo factor se relaciona directamente con la subordinación de los ejemplares, una reducción en las concentraciones de testosterona puede ser el resultado de las interacciones agonistas con machos más dominantes y largos, con lo que se produce una situación de estrés en individuos subordinados, con la consecuencia de la disminución en la secreción de testosterona (Lance *et al.*, 2004; Hamlin *et al.*, 2011). El nivel de testosterona puede aumentar en la fase inicial de un estrés agudo, factor que se ha observado prevalecer en individuos que tienen mayor experiencia o han logrado triunfar en interacciones agonistas, mientras que la disminución de los niveles de testosterona en machos subordinados está dado por la hormona adrenocorticotrópica, la cual a su vez estimula la secreción de glucocorticoides que a su vez ejercen un efecto negativo en la producción de testosterona (Chichinadze y Chichinadze, 2008).

Finalmente, un factor que se debe de tener en consideración es la nutrición, animales más dominantes tienen mayor acceso a recursos ambientales, se debe de recordar que los recursos disponibles en el ambiente son de carácter limitado, por lo que una mejor nutrición puede llegar a tener un efecto estimulante en las gonadotropinas, que a su vez estimulan la producción de testosterona como ha sido demostrado en especies de mamíferos (Walkden-Brown, 1994), sin embargo, faltan más estudios acerca de este último punto en especies de reptiles y crocodilianos.

El siguiente punto particular para analizar son los valores hematológicos que se obtuvieron en las diferentes épocas. Es necesario realizar mayor investigación para establecer rangos de referencia de los diferentes analitos en las diferentes especies de crocodilianos, donde se debe tomar en cuenta diferentes factores como la localización geográfica, variaciones genéticas, dieta, entre otras variables (Millan *et al.*, 1997; Zayas *et al.*, 2011). Dentro de estas variables, se debe considerar el estadio reproductivo en el que se encuentran los ejemplares, ya que como se demostró en este estudio, en las dos especies de crocodilianos, se puede observar que el total de leucocitos varía de acuerdo con la época en la que se encuentra el individuo. Los resultados obtenidos demuestran una disminución de leucocitos totales, así como una disminución de heterófilos, linfocitos y monocitos.

La disminución de los niveles de leucocitos totales en época reproductiva se puede explicar de manera complementaria con otro sistema fisiológico intrínseco de los individuos, con el que probablemente comparta ciertos recursos metabólicos por lo que se indaga en una probable interacción entre los sistemas reproductivo-inmunológicos. Es importante mencionar que las hormonas sexuales esteroideas regulan el crecimiento, diferenciación y funcionamiento de varios tipos celulares del sistema inmune. Parte de la regulación de la testosterona hacia el sistema inmune puede estar mediada por receptores de andrógenos (AR) presentes en algunas células inmunológicas, tales como los linfocitos, lo que sugiere que la hormona puede modular directamente su función. Los receptores de andrógenos son regulados por uniones de ligando (agonistas y antagonistas), los cuales regulan la transcripción de los genes necesarios para la diferenciación, crecimiento o

sobrevivencia celular, aunque estos mecanismos todavía no son bien comprendidos (Kovats *et al.*, 2010).

Al tener en consideración, que cuando los costos de reproducción son más elevados, por la asignación de recursos para la completa expresión del comportamiento reproductivo, la testosterona con un posible papel regulador podría generar un efecto negativo sobre el sistema inmune. Este efecto negativo puede causar supresión en ciertas células del sistema inmune innato con el fin de que los individuos puedan asignar sus recursos metabólicos necesarios a la completa expresión de comportamientos sexuales (Grossman, 1985). Esta disminución en los niveles totales de leucocitos se ha encontrado en la lagartija colilarga (*Psammodromus algirus*) en donde a mayor nivel de testosterona, menor el conteo total de leucocitos, por reducción de linfocitos. La inmunosupresión es uno de los mecanismos en donde se puede elucidar los costos elevados que tiene el organismo para mantener los niveles de testosterona altos (Puerta *et al.*, 1996; Salvador *et al.*, 1996).

En el presente estudio, se demostró que, durante la época reproductiva, existió una disminución en la media de heterófilos en ambas especies de crocodylianos. No se ha demostrado el efecto directo de la testosterona sobre los heterófilos en reptiles. Sin embargo, las investigaciones en los efectos sobre los neutrófilos, homólogos celulares en mamíferos, han demostrado que puede provocar una disminución en la cantidad de neutrófilos circulantes, efecto que se ha demostrado experimentalmente por medio de la castración de ratones macho (Camacho *et al.*, 2011). Así mismo, la testosterona llega a aumentar la expresión de quimiocinas locales, lo que lleva a una infiltración excesiva a tejidos, pero con características disfuncionales que perpetúan el proceso inflamatorio, el daño tisular y la disfunción orgánica. Al mismo tiempo, esta infiltración excesiva provoca que estas células exhiban un fenotipo "similar a N2" (fenotipo pro tumoral) con una eficiencia reducida, también reduce la producción de especies reactivas de oxígeno y eleva la expresión de moléculas inmunomoduladoras como la interleucina 10 y el factor de crecimiento

transformante beta 1 (Lai *et al.*, 2012; Klein y Flanagan; 2016; Scalerandi *et al.*, 2018).

Con relación a los efectos de las diferentes épocas en los leucocitos: eosinófilos y basófilos, no se observaron diferencias significativas entre las medias de estos en las diferentes épocas. Sin embargo, cabe mencionar que se ha estudiado que la testosterona puede reducir la adhesión y viabilidad de los eosinófilos en mamíferos (Hamano *et al.*, 1998).

Por otro lado, en el caso de los monocitos circulantes, se puede observar que existió una disminución en la circulación en las dos especies de crocodilianos durante la época reproductiva. Se ha estudiado que la testosterona puede tener un papel en la regulación de la apoptosis y crecimiento de las líneas celulares monocíticas, con un posible resultado de la disminución de estos. La testosterona también modula el factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B, interfiriendo en el crecimiento celular y en la apoptosis de estas células, también regula positiva o negativamente la expresión y producción de la producción de interleucina 6 y de prostaglandina E2 en monocitos periféricos (Cutolo *et al.*, 2005). Algo semejante sucede con los macrófagos, células que proceden de los monocitos, experimentalmente se demostró un efecto inmunosupresor hacia los macrófagos, a causa de la administración de testosterona exógena a animales gonadectomizados (Kanda *et al.*, 1996; Cutolo *et al.*, 2005; Camacho *et al.*, 2011; Pergola *et al.*, 2011).

Finalmente, por lo que se refiere a la media de linfocitos, se observó una disminución de los linfocitos en época reproductiva. Existen estudios que demuestran que la testosterona, en algunas especies animales, puede influir en receptores tímicos, lo que puede provocar una supresión en la producción de linfocitos, aunque los mecanismos involucrados en estos efectos no están claramente identificados (Da Silva, 1999). En otras especies de reptiles, como es el caso de la tortuga de Caspio (*Mauremys caspica*), se ha demostrado que la administración de testosterona, aplicada a una dosis máxima, equivalente a la que esta especie de tortuga alcanza en época de cortejo, produce una ligera involución del timo y bazo, así como linfopenia (Saad *et al.*, 1991). En experimentación con

ratones BALB/c AnN, *in vitro*, se ha demostrado que la proliferación de linfocitos T obtenidos de hembras es mayor a la obtenida en machos (De León-Nava, 2009). Zuk *et al.* (1995) encontraron que manipulaciones experimentales de testosterona en aves de corral (*Gallus gallus*) puede resultar en una disminución de linfocitos circulantes.

Este efecto en la disminución de la inmunocompetencia en las dos especies de crocodilianos no se observó en las épocas no reproductivas debido a que, este periodo al ser menos demandante energéticamente (al no existir actividades reproductivas), genera que los organismos reasignen sus reservas energéticas a la producción de células inmunes para combatir patógenos y de esta manera los organismos puedan estar presentes en la siguiente época reproductiva.

Es de importancia crítica recalcar que estos patrones de inmunidad regulados por hormonas esteroides no se han encontrado en todas las especies de reptiles o vertebrados estudiados, posiblemente por las diferentes estrategias de reproducción de los individuos (Hudson *et al.*, 2020). Se considera que en reptiles la temperatura y el fotoperiodo podrían estar involucrados en estos cambios inmunológicos, sin embargo, en ambientes y condiciones controladas, estos cambios también se han observado durante las diferentes épocas (Saad *et al.*, 1991).

La determinación de las células inmunes blanco y la comprensión de los mecanismos por los cuales la testosterona modifica su producción, maduración y función, es de importancia para develar las causas de las diferentes estrategias de supervivencia. Al tomar en cuenta las evidencias de los efectos de la testosterona sobre algunas células del sistema inmune, se debe considerar que, aunque se sugiere de manera general una inmunosupresión, también se han encontrado algunos efectos inmunopotenciadores (Camacho *et al.*, 2011).

Se podría considerar que no solo se trataría de una inmunosupresión causada por la testosterona, sino de una redistribución temporal, en donde las células inmunitarias se distribuyen a compartimentos donde es probable que sean de mayor utilidad en ese momento, esto mediante la unión de la testosterona a receptores en

los leucocitos, lo que desencadenaría su migración a otros tejidos (Braude *et al.*, 1999).

Por otra parte, las diferencias significativas que se obtuvieron en época no reproductiva donde los individuos con mayor LHC son aquellos que presentan mayor cantidad de leucocitos totales, se pueden explicar debido a que estos individuos al ser supuestamente los más dominantes, tienen mayor acceso a los recursos ambientales, por lo que pueden tener una mayor producción de leucocitos para asegurar su supervivencia inmediata. También como se comentó anteriormente, son aquellos que tienen los recursos necesarios para mantener los niveles basales del sistema reproductivo más elevados.

Estos mayores niveles de leucocitos en función con el tamaño del ejemplar en época no reproductiva, puede ser una ejemplificación de la calidad de los machos dominantes, debido a que probablemente los machos de menor calidad tengan mayor demanda energética de otros sistemas fisiológicos, incluyendo el inmunológico, cuando se les compara con los individuos dominantes. Por lo que animales más dominantes y largos tendrían los recursos energéticos para producir mayores niveles de leucocitos y de esta manera sobrevivir para la siguiente época reproductiva (Saino *et al.*, 1995). Este factor de dominancia relacionado con la producción de leucocitos también ha sido encontrado en estudios de golondrina común, en donde aquellos machos de golondrina con menor largo de cola (carácter sexual secundario de la especie, donde animales más dominantes presentan mayor largo de cola), presentan mayor carga parasitaria y menor posibilidad de supervivencia, a causa de una menor inmunocompetencia, comparados con individuos más dominantes. Así mismo, estudios realizados con el cocodrilo de agua salada (*Crocodylus porosus*), los animales con mayor largo de cabeza tuvieron una mayor respuesta inmune cuando se estimularon con fitohemaglutinina (Finger Jr. *et al.*, 2016). Sin embargo, cabe mencionar que los resultados encontrados no coinciden con los encontrados en el caimán del Orinoco (*Crocodylus intermedius*), donde se obtuvo una correlación negativa, aunque cabe recalcar que el estudio fue realizado sin distinguir entre ambos sexos y durante todo el año, sin tomar en cuenta

una época en específico (Fuentes *et al.*, 2011). Se debe considerar que el largo de un individuo puede estar correlacionado con diversos factores como las condiciones ambientales, estrés, enfermedades; sin perder la perspectiva reproductiva donde puede ser una señal de ventaja o aptitud (Hudson *et al.*, 2020). Una predicción de este estudio era que esta relación también se presentará en época reproductiva, con la explicación de que los animales con mayor calidad son aquellos que pueden pagar el costo de una inmunosupresión y aun así pudieran mantener los comportamientos sexuales secundarios para su reproducción, posiblemente se observaría esta relación con un aumento en la muestra.

Finalmente, el último valor hematológico a analizar es la cantidad de eritrocitos totales, donde no se encontraron diferencias significativas entre las diferentes épocas, sin embargo, se debe recalcar que se ha señalado que los andrógenos pueden alterar el desarrollo de la hematopoyesis en la médula ósea y aumentar el suministro de glóbulos rojos, pocos estudios longitudinales se han realizado en este aspecto fisiológico (Puerta *et al.*, 1995; Kelani y Durotoye, 2002).

Es necesario recalcar que entender el mecanismo entre la relación del sistema inmune y reproductivo necesita una mayor investigación. Es preciso investigar la respuesta inmunitaria de manera multifactorial (inmunidad innata y adaptativa). Así mismo, se debe tomar en consideración que la testosterona también puede afectar a otras hormonas y, por tanto, alterar indirectamente la función inmunitaria, por lo que es necesario realizar mediciones sanguíneas de otras hormonas. Por ejemplo, se ha observado una elevación de corticosterona en estudios en donde la testosterona altera la función inmunitaria, debido a su efecto inmunomodulador, por lo que también podría estar involucrada (Greenman *et al.*, 2005). Razón por la que es de suma importancia realizar estudios hormonales complementarios.

## **VI.- Conclusiones**

La evidencia que se presenta en este trabajo explica la importancia de realizar mayores investigaciones de los sistemas de retroalimentación que existen entre el sistema reproductivo y el inmunológico en los diferentes estadios reproductivos en los crocodilianos. Sin embargo, podemos concluir que existe un efecto referente a la época en los niveles de testosterona, donde se observa un aumento de su media en la época reproductiva, mientras que al mismo tiempo se observa una disminución en la media de leucocitos circulantes. Lo que probablemente sea una indicación de que los organismos, en época reproductiva, prefieren invertir los recursos energéticos en los comportamientos y caracteres sexuales secundarios necesarios para obtener el éxito reproductivo. Mientras que en época no reproductiva ocurre el efecto inverso, ya que al no existir esta necesidad de manifestar estos caracteres disminuye la media de testosterona, los costos reproductivos y por lo tanto el aumento de leucocitos en las dos especies de crocodilianos estudiados.

Se demostró que existe un aumento en los niveles séricos de testosterona en función de la longitud hocico-cloaca, largo de cráneo y circunferencia de cola, así como una mayor producción de leucocitos en función de LHC en época no reproductiva. Esto debido a una posible ventaja de los animales más largos en la capacidad de competir por recursos, lo que les proporciona una vida útil más larga, con mayor éxito reproductivo comparado a machos más pequeños con menor capacidad de competencia.

Existe actualmente un debate en la comunidad científica con respecto al efecto inmunosupresor de la testosterona. Algunos estudios demuestran este efecto mientras que otros, parecen sugerir que la testosterona ayuda a los organismos a combatir patógenos. Sin embargo, organismos de excelente calidad, son capaces de realizar conductas de cortejo y competencia por parejas, mientras simultáneamente combaten a patógenos, a pesar de experimentar cierta supresión inmune debido a niveles elevados de testosterona.

El sistema inmune y reproductivo comparten muchos receptores, pero para un mejor entendimiento de este proceso de comunicación bilateral es necesario continuar con el estudio de las funciones inmunes y reproductivas, mediados por la testosterona durante diferentes épocas reproductivas en machos de crocodilianos.

Para finalizar, es importante el estudio de la reproducción en crocodilianos, específicamente el monitoreo hormonal, ya que nos permite conocer aspectos relevantes e importantes para el éxito en su reproducción, así como también profundizar en el estudio complementario del sistema inmunológico, tanto el sistema innato como el adaptativo de estos ejemplares, para poder comprender mejor todos los factores relativos a su inmunocompetencia y su relación con el sistema reproductivo.

## VII.- Referencias

Abdool, F. S., Coetzer, T. H. y Goldring, J. D. (2020). Isolation of Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*) serum immunoglobulin M and Y (IgM and IgY). *Journal of immunological methods*, 478, 112724.

Álvarez del Toro M. (1974). Los Crocodylia de México (Estudio Comparativo). *Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables*, México

Arikan H. y Cicek, K. (2014). Haematology of amphibians and reptiles: A review. *North-Western journal of zoology*, 10(1).

Ashley N. T. y Wingfield J.C. (2012). Sickness behavior in vertebrates: Allostasis, Life-History modulation and hormonal regulation. *Ecoimmunology*. Demas, G. y Nelson, R. (Eds.). Oxford University Press.

Augustine, L., Miller, K., Peters, A., Franklin, A. D., Steinbeiser, C. M., Brown, J. L., y Prado, N. A. (2020). Impacts of the season and reproductive status on fecal reproductive and adrenocortical steroid metabolites in zoo Cuban crocodiles (*Crocodylus rhombifer*). *Zoo Biology*, 39(6), 411-421.

Balaguera-Reina, S. A., Venegas-Anaya, M., Sanjur, O. I., Lessios, H. A., y Densmore, L. D. (2015). Reproductive ecology and hatchling growth rates of the American Crocodile (*Crocodylus acutus*) on Coiba Island, Panama. *South American Journal of Herpetology*, 10(1), 10-22.

Barrios, G. y Cremieux, J. (2018). Protocolo de ranqueo para cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*) en México. *Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (Conabio)*, México.

Barrios-Quiroz, G., Casas-Andreu, G. y Escobedo-Galván, A. H. (2012). Sexual size dimorphism and allometric growth of Morelet's crocodiles in captivity. *Zoological Science*, 29(3), 198-203.

Bates, D., Maechler, M., Bolker, B. y Walker, S. (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1), 1-48.

Baxter-Gilbert, J. H., Riley, J. L., Mastromonaco, G. F., Litzgus, J. D. y Lesbarrères, D. (2014). A novel technique to measure chronic levels of corticosterone in turtles living around a major roadway. *Conservation physiology*, 2(1).

Belliure, J., Smith, L. y Sorci, G. (2004). Effect of testosterone on T cell-mediated immunity in two species of Mediterranean lacertid lizards. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 301(5), 411-418.

Berger, S., Martin II, L. B., Wikelski, M., Romero, L. M., Kalko, E. K., Vitousek, M. N. y Rödl, T. (2005). Corticosterone suppresses immune activity in territorial Galapagos marine iguanas during reproduction. *Hormones and Behavior*, 47(4), 419-429.

Berkvens, C. N., Hyatt, C., Gilman, C., Pearl, D. L., Barker, I. K. y Mastromonaco, G. F. (2013). Validation of a shed skin corticosterone enzyme immunoassay in the African House Snake (*Lamprophis fuliginosus*) and its evaluation in the Eastern Massasauga Rattlesnake (*Sistrurus catenatus catenatus*). *General and comparative endocrinology*, 194, 1-9.

Braude, S., Tang-Martinez, Z. y Taylor, G. T. (1999). Stress, testosterone, and the immunoredistribution hypothesis. *Behavioral Ecology*, 10(3), 345-350.

Brown, D. R., Schumacher, I. M., Nogueira, M. F., Richey, L. J., Zacher, L. A., Schoeb, T. R. y Brown, M. B. (2001). Detection of antibodies to a pathogenic mycoplasma in American alligators (*Alligator mississippiensis*), broad-nosed caimans (*Caiman latirostris*), and Siamese crocodiles (*Crocodylus siamensis*). *Journal of clinical microbiology*, 39(1), 285-292.

Buchanan, K. L., Evans, M. R., y Goldsmith, A. R. (2003). Testosterone, dominance signalling and immunosuppression in the house sparrow (*Passer domesticus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 55(1), 50-59.

Budd, K. M., Spotila, J. R. y Mauger, L. A. (2015). Preliminary Mating Analysis of American Crocodiles, *Crocodylus acutus*, in Las Baulas, Santa Rosa, and Palo Verde National Parks, Guanacaste, Costa Rica. *South American Journal of Herpetology*, 10(1), 4-9.

Camacho I., Morales J. y Velazquez J. (2011). Efectos no reproductivos de hormonas esteroides. *Sociedad Mexicana de Neuroinmunoendocrinología*. Universidad Autónoma Metropolitana.

Casas-Andreu G. y Guzmán-Arroyo M. (1970). Estado actual de las investigaciones sobre cocodrilos mexicanos. Secretaría de Industria y Comercio. Instituto Nacional de Investigaciones Biológico Pesqueras. *Serie Divulgación*, 3, 1-52.

Casas-Andreu, G., Barrios-Quiroz, G. y Macip-Ríos, R. (2011). Reproducción en cautiverio de *Crocodylus moreletii* en Tabasco, México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 82(1), 261-273.

Casto, J. M., Nolan, Jr, V. y Ketterson, E. D. (2001). Steroid hormones and immune function: experimental studies in wild and captive dark-eyed juncos (*Junco hyemalis*). *The American Naturalist*, 157(4), 408-420.

Chichinadze, K., y Chichinadze, N. (2008). Stress-induced increase of testosterone: contributions of social status and sympathetic reactivity. *Physiology & behavior*, 94(4), 595-603.

Childs, C. E., Calder, P. C. y Miles, E. A. (2019). Diet and immune function. *MDPI AG: Nutrients*, 11.

Comisión Nacional para el Uso y Conservación de la Biodiversidad (CONABIO). (2020). Cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*). En: [https://www.biodiversidad.gob.mx/planeta/cocodrilos\\_m/](https://www.biodiversidad.gob.mx/planeta/cocodrilos_m/).

Cutolo, M., Capellino, S., Montagna, P., Ghiorzo, P., Sulli, A., y Villaggio, B. (2005). Sex hormone modulation of cell growth and apoptosis of the human monocytic/macrophage cell line. *Arthritis research and therapy*, 7(5), 1-9.

Da Silva, J. A. P. (1999). Sex hormones and glucocorticoids: interactions with the immune system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 876(1), 102-118.

Da Silveira, R., Farias, I. P., Magnusson, W. E., Muniz, F. L., Hrbek, T. y Campos, Z. (2011). Multiple paternity in the black caiman (*Melanosuchus niger*) population in the Anavilhanas National Park, Brazilian Amazonia. *Amphibia-Reptilia*, 32(3), 428-434.

De Barros, F. (2001). Class Reptilia, Order Crocodylia (Crocodylians): Caimans, Crocodiles. *Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals*, 9-14.

De León-Nava, M. A., Nava, K., Soldevila, G., López-Griego, L., Chávez-Ríos, J. R., Vargas-Villavicencio, J. A. y Morales-Montor, J. (2009). Immune sexual dimorphism: effect of gonadal steroids on the expression of cytokines, sex steroid receptors, and lymphocyte proliferation. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 113(1-2), 57-64.

Delves, P. J. y Roitt, I. M. (2000). The immune system. *New England journal of medicine*, 343(1), 37-49.

Demas, G. y Nelson, R. (Eds.). (2012). *Ecoimmunology*. Oxford University Press.

Detoef-Boulade, A. S. (2006). Reproductive cycle and sexual size dimorphism of the Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*) in the Okavango Delta, Botswana (Doctoral dissertation, Stellenbosch: Stellenbosch University).

Domínguez-Laso, J. (2006). Determinación del estado de las poblaciones silvestres del cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*) en México y evaluación de su estatus en la CITES. *Instituto de Historia Natural y Ecología*. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. CS009. México D. F.

Duffy, D. L., Bentley, G. E., Drazen, D. L. y Ball, G. F. (2000). Effects of testosterone on cell-mediated and humoral immunity in non-breeding adult European starlings. *Behavioral Ecology*, 11(6), 654-662.

Eatwell, K., Hedley, J., y Barron, R. (2014). Reptile haematology and biochemistry. *In Practice*, 36(1), 34-42.

Eikenaar, C., Husak, J., Escallon, C. y Moore, I. T. (2012). Variation in testosterone and corticosterone in amphibians and reptiles: relationships with latitude, elevation, and breeding season length. *The American Naturalist*, 180(5), 642-654.

Escobedo-Galván, A. H., Padilla-Paz, S. E., Perera-Trejo, E. E., González-Jáuregui, M. y Gómez-Duarte, J. O. (2009). *Crocodylus moreletii* (Morelet's crocodile) nesting ecology. *Herpetological Review*, 40, 211-212.

Evans, M. R., Goldsmith, A. R., y Norris, S. R. (2000). The effects of testosterone on antibody production and plumage coloration in male house sparrows (*Passer domesticus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 47(3), 156-163.

Finger Jr, J. e Isberg, S. R. (2012). A review of innate immune functions in crocodilians. *Animal Science Reviews*, 7(7), 195.

Finger Jr, J. W., Adams, A. L., Thomson, P. C., Shilton, C. M., Brown, G. P., Moran, C. e Isberg, S. R. (2013). Using phytohaemagglutinin to determine immune responsiveness in saltwater crocodiles (*Crocodylus porosus*). *Australian Journal of Zoology*, 61(4), 301-311.

Flatt, T. y Heyland, A. (Eds.). (2011). Mechanisms of life history evolution: the genetics and physiology of life history traits and trade-offs. *OUP Oxford*.

Folstad, I. y Karter, A. J. (1992). Parasites, bright males, and the immunocompetence handicap. *The American Naturalist*, 139(3), 603-622.

Food and drug administration (FDA). (2018). Bioanalytical Method validation. Guidance for the industry. *Biopharmaceutics*

French, S. S., McLemore, R., Vernon, B., Johnston, G. I. y Moore, M. C. (2007). Corticosterone modulation of reproductive and immune systems trade-offs in female tree lizards: long-term corticosterone manipulations via injectable gelling material. *Journal of Experimental Biology*, 210(16), 2859-2865.

French, S. S. y Moore, M. C. (2008). Immune function varies with reproductive stage and context in female and male tree lizards, *Urosaurus ornatus*. *General and comparative endocrinology*, 155(1), 148-156.

Fuentes, A. G. M., Seijas, A. E. y Rossini, M. (2011). Valores hematológicos en ejemplares jóvenes de caimán del Orinoco (*Crocodylus intermedius*) en Venezuela. *Revista Científica*, 21(4), 360-364.

Fuxjager, M. J., Fofopoulos, J., Diaz-Uriarte, R. y Marler, C. A. (2011). Functionally opposing effects of testosterone on two different types of parasite: implications for the immunocompetence handicap hypothesis. *Functional Ecology*, 25(1), 132-138.

Galina, C. y Valencia, J. (2008). Reproducción de los animales domésticos. *Limusa*, (3).

Ghoral, S.M. y Priyam, M. (2018). Reptilia: Cellular immunity in reptiles: Perspective on elements of evolution. In Cooper EL, editor. *Advances in Comparative Immunology*. Springer International Publishing AG, 773-786

Goldstein, R. A. y Gray, P. M. (2018). Evolutionary GEM: Crocodylian Vocalizations. *Western Undergraduate Research Journal: Health and Natural Sciences*, 9(1).

Gómez-Lucía, E., Blanco, M. D. M. y Doménech, A. (2007). Manual de inmunología veterinaria. *Pearson Prentice Hall*.

Gonzalez, G., Sorci, G. y de Lope, F. (1999). Seasonal variation in the relationship between cellular immune response and badge size in male house sparrows (*Passer domesticus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 46(2), 117-122.

González–Desales, G. A., Monroy–Vilchis, O., Charruau, P. y Zarco–González, M. M. (2016). Aspectos ecológicos de la anidación de *Caiman crocodilus chiapasius* (Bocourt, 1876) en la reserva de la biosfera La Encrucijada, México. *Animal Biodiversity and Conservation*, 39(2), 155-160.

Greenman, C. G., Martin II, L. B. y Hau, M. (2005). Reproductive state, but not testosterone, reduces immune function in male house sparrows (*Passer domesticus*). *Physiological and Biochemical Zoology*, 78(1), 60-68.

Grigg, G. (2015). Biology and evolution of crocodylians. Clayton South: *Csiro Publishing*.

Grossman, C. J. (1985). Interactions between the gonadal steroids and the immune system. *Science*, 227(4684), 257-261.

Hall, J. E. y Hall, M. E. (2020). Guyton and Hall textbook of medical physiology e-Book. *Elsevier Health Sciences*.

Halliday, W. D., Paterson, J. E., Patterson, L. D., Cooke, S. J., y Blouin-Demers, G. (2014). Testosterone, body size, and sexual signals predict parasite load in Yarrow's Spiny Lizards (*Sceloporus jarrovii*). *Canadian journal of zoology*, 92(12), 1075-1082.

Hamano, N., Terada, N., Maesako, K. I., Numata, T. y Konno, A. (1998). Effect of sex hormones on eosinophilic inflammation in nasal mucosa. *Allergy and asthma proceedings* (Vol. 19, No. 5, p. 263). OceanSide Publications.

Hamilton, W. D. y Zuk, M. (1982). Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites?. *Science*, 218(4570), 384-387.

Hamilton, M. T., Finger Jr, J. W., Elsey, R. M., Mastromonaco, G. F. y Tuberville, T. D. (2018). Corticosterone in American alligator (*Alligator mississippiensis*) tail scutes: Evaluating the feasibility of using unconventional samples for investigating environmental stressors. *General and comparative endocrinology*, 268, 7-13.

Hamlin, H. J., Lowers, R. H., y Guillette Jr, L. J. (2011). Seasonal androgen cycles in adult male American alligators (*Alligator mississippiensis*) from a barrier island population. *Biology of reproduction*, 85(6), 1108-1113.

Hau, M. (2007). Regulation of male traits by testosterone: implications for the evolution of vertebrate life histories. *BioEssays*, 29(2), 133-144.

Hernández-Hurtado, H., García de Quevedo Machain, R., Hernández-Hurtado, P., Jiménez-Quiroz, M. C., y Espino-Barr, E. (2006). Los cocodrilos de la costa Pacífico occidental (Michoacán, Colima y Jalisco) de México. *Los recursos pesqueros y acuícolas de Jalisco, Colima y Michoacán. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México*, 375-389.

Huchzermeyer, F. W. (2003). Crocodiles: biology, husbandry and diseases. CABI Publishing.

Hudson, S. B., Kluever, B. M., Webb, A. C. y French, S. S. (2020). Steroid hormones, energetic state, and immunocompetence vary across reproductive contexts in a parthenogenetic lizard. *General and comparative endocrinology*, 288, 113372.

Huyghe, K., Husak, J. F., Herrel, A., Tadić, Z., Moore, I. T., Van Damme, R., y Vanhooydonck, B. (2009). Relationships between hormones, physiological performance and immunocompetence in a color-polymorphic lizard species, *Podarcis melisellensis*. *Hormones and behavior*, 55(4), 488-494.

Iwasaki, A., y Medzhitov, R. (2010). Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*, 327(5963), 291-295.

John-Alder, H. B., Cox, R. M. y Taylor, E. N. (2007). Proximate developmental mediators of sexual dimorphism in size: case studies from squamate reptiles. *Integrative and Comparative Biology*, 47(2), 258-271.

Kanda, N., Tsuchida, T., y Tamaki, K. (1996). Testosterone inhibits immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells. *Clinical and experimental Immunology*, 106(2), 410-415.

Kelani, O. L., y Durotoye, L. A. (2002). Haematological responses of the African giant rat (*Cricetomys gambianus*) to castration and androgen replacement. *Vet Arh*, 72(1), 39-49.

Klein, S. L. (2000). The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 24(6), 627-638.

Klein, S. L., y Flanagan, K. L. (2016). Sex differences in immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 16(10), 626-638.

Kofron, C. P. (1990). The reproductive cycle of the Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*). *Journal of Zoology*, 221(3), 477-488.

Kofron, C. P. y Steiner, C. (1994). Observations on the African dwarf crocodile, *Osteolaemus tetraspis*. *Copeia*, 1994(2), 533-535.

Kommanee, J., Preecharram, S., Daduang, S., Temsiripong, Y., Dhiravisit, A., Yamada, Y. y Thammasirirak, S. (2012). Antibacterial activity of plasma from crocodile (*Crocodylus siamensis*) against pathogenic bacteria. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 11(1), 1-8.

Kovats S., Carreras E., Agrawal H. (2010) Sex Steroid Receptors in Immune Cells. In: Klein S., Roberts C. (eds) *Sex Hormones and Immunity to Infection*. Springer, Berlin, Heidelberg. Doi: 10.1007/978-3-642-02155-8\_3

Kumar, S., Roy, B. y Rai, U. (2011). Hormonal regulation of testicular functions in reptiles. *In Hormones and reproduction of vertebrates*, pp. 63-88.

Lai, J. J., Lai, K. P., Zeng, W., Chuang, K. H., Altuwaijri, S. y Chang, C. (2012). Androgen receptor influences on body defense system via modulation of innate and adaptive immune systems: lessons from conditional AR knockout mice. *The American journal of pathology*, 181(5), 1504-1512.

Lance, V. A. (1989). Reproductive cycle of the American alligator. *American Zoologist*, 29(3), 999-1018.

Lance, V. A. (2003). Alligator physiology and life history: the importance of temperature. *Experimental gerontology*, 38(7), 801-805.

Lance, V. A., Elsey, R. M., Butterstein, G. y Trosclair Iii, P. L. (2004). Rapid suppression of testosterone secretion after capture in male American alligators (*Alligator mississippiensis*). *General and Comparative Endocrinology*, 135(2), 217-222.

Lang, J. W. (1987). Crocodylian behaviour: implications for management. *Wildlife management: crocodiles and alligators*, 1987, 273-294.

Laucht, S., Kempenaers, B., y Dale, J. (2010). Bill color, not badge size, indicates testosterone-related information in house sparrows. *Behavioral ecology and sociobiology*, 64(9), 1461-1471.

Lindström, K. M., Krakower, D., Lundström, J. O. y Silverin, B. (2001). The effects of testosterone on a viral infection in greenfinches (*Carduelis chloris*): an experimental test of the immunocompetence-handicap hypothesis. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 268(1463), 207-211.

López-Luna, M. A., Hidalgo-Mihart, M. G. y Aguirre-León, G. (2011). Descripción de los nidos del cocodrilo de pantano *Crocodylus moreletii* en un paisaje urbanizado en el sureste de México. *Acta zoológica mexicana*, 27(1), 1-16.

Ludovisi, A., La Grange, L. J., Morales, M. A. G. y Pozio, E. (2013). Development of an ELISA to detect the humoral immune response to *Trichinella zimbabwensis* in Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*). *Veterinary parasitology*, 194(2-4), 189-192.

Macip-Rios, R., Fernandez-Aguilar, M., Barrios-Quiroz, G. y Casas-Andreu, G. (2012). Indirect morphological measures to infer body size in a wild population of the Chiapas spectacled caiman, *Caiman crocodilus chiapasius* (Bocourt, 1876). *Herpetological Conservation and Biology*, 7(3), 367-375.

Medzhitov, R. y Janeway Jr, C. (2000). Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunological reviews*, 173, 89.

Merchant, M. E., Mills, K., Leger, N., Jerkins, E., Vliet, K. A. y McDaniel, N. (2006). Comparisons of innate immune activity of all known living crocodylian species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 143(2), 133-137.

Millan, J. M., Janmaat, A., Richardson, K. C., Chambers, L. K. y Fomiatti, K. R. (1997). Reference ranges for biochemical and haematological values in farmed saltwater crocodile (*Crocodylus porosus*) yearlings. *Australian Veterinary Journal*, 75(11), 814-817.

Milnes, M. R., Woodward, A. R., Rooney, A. A., y Guillette Jr, L. J. (2002). Plasma steroid concentrations in relation to size and age in juvenile alligators from two Florida lakes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 131(4), 923-930.

Milnes, M. R. (2011). Hormones and reproductive cycles in crocodylians. *Hormones and Reproduction of Vertebrates*, 305-319.

Mondal, S. y Rai, U. (1999). Sexual dimorphism in phagocytic activity of wall lizard's splenic macrophages and its control by sex steroids. *General and comparative endocrinology*, 116(2), 291-298.

Mondragón RL. (2007). Disproteinemias. En Núñez y Bouda J. Patología clínica veterinaria. UNAM, FMVZ.

Moore, B. C., Holliday, C. M., McMurry, S. T., Platt, S. G. y Rainwater, T. R. (2019). Correlation between increased postpubertal phallic growth and the initiation of cranial sexual dimorphisms in male Morelet's crocodile. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, 331(10), 562-570.

Morpurgo, B., Gvaryahu, G. y Robinzon, B. (1992). Effects of population density, size, and gender on plasma testosterone, thyroxine, hematocrit, and calcium in juvenile Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*) in captivity. *Copeia*, 1023-1027.

Muehlenbein, M. P. y Bribiescas, R. G. (2005). Testosterone-mediated immune functions and male life histories. *American Journal of Human Biology: The Official Journal of the Human Biology Association*, 17(5), 527-558.

Nicholson, L. B. (2016). The immune system. *Essays in biochemistry*, 60(3), 275-301.

Núñez OL. (2007). Leucocitos. En Núñez y Bouda J. Patología clínica veterinaria. UNAM, FMVZ.

Olsson, M., Wapstra, E., Madsen, T. y Silverin, B. (2000). Testosterone, ticks and travels: a test of the immunocompetence-handicap hypothesis in free-ranging male sand lizards. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 267(1459), 2339-2343.

O'Neal D. M. y Ketterson E.D. (2012). Life-history evolution, hormones and avian immune function. *Ecoimmunology*. Demas, G. y Nelson, R. (Eds.). Oxford University Press.

Oppliger, A., Giorgi, M. S., Conelli, A., Nembrini, M. y John-Alder, H. B. (2004). Effect of testosterone on immunocompetence, parasite load, and metabolism in the

common wall lizard (*Podarcis muralis*). *Canadian journal of zoology*, 82(11), 1713-1719.

Owen-Ashley, N. T., Hasselquist, D. y Wingfield, J. C. (2004). Androgens and the immunocompetence handicap hypothesis: unraveling direct and indirect pathways of immunosuppression in song sparrows. *The American Naturalist*, 164(4), 490-505.

Parkin, J. y Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *The Lancet*, 357(9270), 1777-1789.

Pergola, C., Rogge, A., Dodt, G., Northoff, H., Weinigel, C., Barz, D. y Werz, O. (2011). Testosterone suppresses phospholipase D, causing sex differences in leukotriene biosynthesis in human monocytes. *The FASEB Journal*, 25(10), 3377-3387.

Preecharram, S., Daduang, S., Bunyatratthata, W., Araki, T., y Thammasirirak, S. (2008). Antibacterial activity from Siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) serum. *African Journal of Biotechnology*, 7(17).

Peters, A. (2000). Testosterone treatment is immunosuppressive in superb fairy-wrens, yet free-living males with high testosterone are more immunocompetent. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 267(1446), 883-889.

Puerta, M., Nava, M. P., Venero, C., y Veiga, J. P. (1995). Hematology and plasma chemistry of house sparrows (*Passer domesticus*) along the summer months and after testosterone treatment. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 110(4), 303-307.

Puerta, M., Abelenda, M., Salvador, A., Martin, J., Lopez, P., y Veiga, J. P. (1996). Haematology and plasma chemistry of male lizards, *Psammmodromus algirus*. Effects of testosterone treatment. *Comparative Haematology International*, 6(2), 102-106.

Platt, S. G., Sigler, L. y Rainwater, T. R. (2010). Morelet's crocodile *Crocodylus moreletii*. *Crocodyles: Status survey and conservation action plan*, 79-83.

Pratt, N. C., Alberts, A. C., Fulton-Medler, K. G. y Phillips, J. A. (1992). Behavioral, physiological, and morphological components of dominance and mate attraction in male green iguanas. *Zoo Biology*, 11(3), 153-163.

Rios, F. M., y Zimmerman, L. M. (2015). Immunology of reptiles. *ELS*, 1-7.

Roberts, M. L., Buchanan, K. L. y Evans, M. R. (2004). Testing the immunocompetence handicap hypothesis: a review of the evidence. *Animal behaviour*, 68(2), 227-239.

Rooney, A. A., Crain, D. A., Woodward, A. R. y Guillette Jr, L. J. (2004). Seasonal variation in plasma sex steroid concentrations in juvenile American alligators. *General and comparative endocrinology*, 135(1), 25-34.

Saad, A. H., Torroba, M., Varas, A. y Zapata, A. (1991). Testosterone induces lymphopenia in turtles. *Veterinary immunology and immunopathology*, 28(2), 173-180.

Saino, N., Møller, A. P. y Bolzerna, A. M. (1995). Testosterone effects on the immune system and parasite infestations in the barn swallow (*Hirundo rustica*): an experimental test of the immunocompetence hypothesis. *Behavioral Ecology*, 6(4), 397-404.

Salvador, A., Veiga, J. P., Martin, J., Lopez, P., Abelenda, M. y Puerta, M. (1996). The cost of producing a sexual signal: testosterone increases the susceptibility of male lizards to ectoparasitic infestation. *Behavioral Ecology*, 7(2), 145-150.

Scalerandi, M. V., Peinetti, N., Leimgruber, C., Cuello Rubio, M. M., Nicola, J. P., Menezes, G. B. y Quintar, A. A. (2018). Inefficient N2-like neutrophils are promoted by androgens during infection. *Frontiers in immunology*, 9, 1980.

Seddon, R. y Klukowski, M. (2013). Secondary sexual coloration is related to white blood cell counts and testosterone in male southeastern five-lined skinks (*Plestiodon inexpectatus*). *Amphibia-Reptilia*, 34(4), 585-589.

Segner, H., Verburg-van Kemenade, B. L. y Chadzinska, M. (2017). The immunomodulatory role of the hypothalamus-pituitary-gonad axis: proximate mechanism for reproduction-immune trade offs? *Developmental and Comparative Immunology*, 66, 43-60.

Shaw, A. C., Joshi, S., Greenwood, H., Panda, A. y Lord, J. M. (2010). Aging of the innate immune system. *Current opinion in immunology*, 22(4), 507-513.

Sirois, M. (2014). *Laboratory Procedures for Veterinary Technicians-E-Book*. Elsevier Health Sciences.

Stacy, N. I., Alleman, A. R. y Saylor, K. A. (2011). Diagnostic hematology of reptiles. *Clinics in laboratory medicine*, 31(1), 87-108.

Staton, M. A. y Dixon, J. R. (1977). *Breeding biology of the spectacled caiman, Caiman crocodilus crocodilus in the Venezuelan Llanos*. US Department of the Interior, Fish and Wildlife Service.

Sykes IV, J. M., y Klaphake, E. (2008). Reptile hematology. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 11(3), 481-500.

Velasco, A., Ayarzagüena, J., Manolis, S., y Stevenson, C. (2010). Spectacled caiman *Caiman crocodilus*. *Crocodyles, Status Survey and Conservation Action Plan*, 10-15.

Walkden-Brown, S. W., Restall, B. J., Norton, B. W., Scaramuzzi, R. J. y Martin, G. B. (1994). Effect of nutrition on seasonal patterns of LH, FSH and testosterone concentration, testicular mass, sebaceous gland volume and odour in Australian cashmere goats. *Reproduction*, 102(2), 351-360.

Weatherhead, P. J., Metz, K. J., Bennett, G. F. e Irwin, R. E. (1993). Parasite faunas, testosterone and secondary sexual traits in male red-winged blackbirds. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 33(1), 13-23.

Wedekind, C. y Folstad, I. (1994). Adaptive or nonadaptive immunosuppression by sex hormones? *The American Naturalist*, 143(5), 936-938.

Yang, C., Wang, J., Fang, Y. y Sun, Y. H. (2013). Is sexual ornamentation an honest signal of male quality in the Chinese grouse (*Tetrastes sewerzowi*)? *PLoS One*, 8(12).

Zahavi, A. (1975). Mate selection a selection for a handicap. *Journal of theoretical Biology*, 53(1), 205-214.

Zayas, M. A., Rodríguez, H. A., Galoppo, G. H., Stoker, C., Durando, M., Luque, E. H. y Munoz-de-Toro, M. (2011). Hematology and blood biochemistry of young healthy broad-snouted caimans (*Caiman latirostris*). *Journal of Herpetology*, 45(4), 516-524.

Zimmerman, L. M., Vogel, L. A. y Bowden, R. M. (2010). Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective. *Journal of Experimental Biology*, 213(5), 661-671.

Zuk M, Johnsen TS, MacLarty T (1995) Endocrine-immune interactions, ornaments and mate choice in red jungle fowl. *Proc RSoc Lond B*, 260, 205-210.