

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Determinación de fenotipos
inmunoneuroendócrinos y su modulación
por situaciones de estrés crónico en 2
modelos de aves que difieren en el grado
de domesticación: *Coturnix coturnix* y
Gallus gallus.**

por

Biol. Nazar, Franco Nicolás.

Directores asociados:

Prof. Dr. Raúl H. Marín y Prof. Dra. Silvia G. Correa.

**Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIByT), CONICET – Facultad
de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales - Universidad Nacional de Córdoba e
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA), Facultad de Ciencias
Exactas, Físicas y Naturales - Universidad Nacional de Córdoba.**

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

CÓRDOBA, ARGENTINA

2015

COMISIÓN ASESORA.

Dra. Teresa Nieves Scimonelli.

Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba.

Dra. Ana María Dalcerro.

Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río IV.

Dra. Silvia Graciela Correa.

Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba.

Dr. Raúl Héctor Marin.

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba.

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA.

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Dedicatoria.

*A todos los que en algún momento deciden
emprender un camino...*

Agradecimientos.

A la FCEFyN de la Universidad Nacional de Córdoba por permitirme desarrollar mi doctorado en Ciencias Biológicas en el marco institucional que conforman.

A CONICET por las becas otorgadas para el desarrollo de mi doctorado.

A mi director Dr. Raúl Marin por guiarme en este particular camino de la ciencia, por sus consejos, por sus sugerencias y por las discusiones (no pocas) que hemos tenido, en todos los casos con consecuencias productivas. También quiero agradecerle por el apoyo brindado ya sea a nivel profesional como personal, desde que ingresé al grupo de ciencia avícola como ayudante de investigación y luego para hacer mi tesis de grado.

A mi directora Dra. Silvia Correa por permitirme el ingreso al mundo de la inmunología, desde aquella charla en el patio de las baterías “B”, y por mantener una mente siempre abierta a mis “salidas de los estándares”. También quisiera agradecerle por el enorme gesto de entender y transmitirme con claridad que no sirve ser un “buen científico” sin ser una buena persona.

A ambos directores debo agradecerles la confianza que depositaron en mí al fomentar el desarrollo de una línea enfocada en el estudio de interacciones inmuno-neuroendócrinas en aves y por seguir aún hoy apostando a mi desarrollo como joven investigador.

A los miembros de la comisión asesora: Dras. Dalcerro y Scimonelli, por su seguimiento y acompañamiento en el desarrollo de la tesis, por sus nutritivos aportes y por hacer que la instancia de evaluación sea una etapa de aprendizaje más.

Al Dr. Caviedes Vidal por aceptar la tarea de ser el evaluador externo y tercer miembro del tribunal de mi trabajo de tesis y por sus positivos aportes.

A la Dra. María Angélica Perillo por facilitar, apoyar y guiar mi desarrollo como profesional tanto en investigación como en docencia. A través de ella hago extensivo el agradecimiento a la comunidad del IIByT y demás miembros de la cátedra de Química Biológica de la FCEFyN.

A las autoridades del CIBICI especialmente por permitirme desarrollar las pruebas relacionadas al componente inmune asociado a la presente Tesis.

A las autoridades del ICTA por permitir el desarrollo de mi Tesis en las instalaciones del mismo.

A la Dra. Inma Estevez quiero agradecerle particular y especialmente por permitirme trabajar en el grupo que dirige y ampliar los alcances de la presente tesis al modelo animal *Gallus gallus* enriqueciendo de manera significativa el proceso y el producto, así como por apoyar el desarrollo de mi carrera profesional. El agradecimiento es extensivo también a cada uno de los miembros de su grupo, del departamento de producción animal y autoridades del instituto NEIKER-TECNALIA quienes posibilitaron y apoyaron mi trabajo durante mi estancia en el País Vasco.

A la Dra. Miriam Carranza por recibirme como profesor asistente en la cátedra de Morfología Animal, mostrando siempre apoyo en el desarrollo de mi carrera profesional.

A la familia Marín-Gleiser por recibirme en su hogar durante casi un mes en el extranjero, y tratarme como a un miembro más. Le agradezco a Raquel por “cuasi” adoptarme y a Sebastián y Gonzalo por compartir la estadía conmigo.

A mis compañeros de ciencia avícola/comportamiento en el IIByT por hacer que el día a día sea genial, especialmente a los codornos por estar para tomar mates, comer pizzas, componer música o para ir a comprar una coca.

A mis compañeros en el laboratorio 104 de CIBICI y especialmente a mis compañeros del grupo Correa, a los presentes hoy ahí y a los que han estado para ayudar siempre.

A mis alumnos por permitirme crecer en aspectos tan necesarios en el desarrollo de un doctorado como la transferencia de conocimientos.

A mi Papá, Mamá y Hermano por acompañarme en el desarrollo de mi tesis desde el lugar que cada uno ha podido, lugares desde donde me han aportado cosas inmensas y que muchas veces fueron inesperadas pero enormemente necesarias.

A mi novia Stefy por ser un sostén para llevar adelante lo que implica un doctorado, pero más aún por estar conmigo en la vida para llevarla adelante juntos.

A mis amigos de la facu y del cole. Por más que sean espaciados los encuentros, y los tiempos de cada uno hagan difíciles las coincidencias a veces, me han hecho siempre saber que están ahí.

Manuscritos derivados de la tesis.

Nazar, F.N., Barrios, B.E., Kaiser, P., Marin, R.H. and Correa, S.G. Immune neuroendocrine phenotypes in *Coturnix coturnix*: do avian species show LEWIS/FISCHER-like profiles? ACEPTADO para publicación en PLOS ONE.

Nazar, F.N., Correa, S.G., Estevez, I., Marin, R.H. Avian physiological strategy: Immune neuroendocrine phenotypes in *Gallus gallus*. EN REDACCIÓN para ser enviado a Poultry Science.

Nazar, F.N., Correa, S.G., Estevez, I., Marin, R.H. Stress induced modulation of immune neuroendocrine phenotypes in *Gallus Gallus*. EN REDACCIÓN para ser enviado a Developmental and Comparative Immunology.

Nazar, F.N., Estevez, I., Marin, R.H. and Correa, S.G. Disruptive polarization as an immune neuroendocrine strategy at the population level in poultry species?. EN REDACCIÓN para ser enviado a The Journal of Experimental Biology.

Índice.

1. Introducción.	1 a 33
1.1 Tres disciplinas... neurología, endocrinología e inmunología.....	3
1.1.1 ... neurología.....	3
1.1.2 ... endocrinología.....	6
1.1.3 ... inmunología.....	9
1.2 SURGIMIENTO... La Inmuno-Neuroendocrinología como disciplina.....	10
1.2.1 Subpoblaciones de linfocitos T efectores.	20
1.2.2 Perfiles o Fenotipos Inmuno-neuroendócrinos (FINEs).	21
1.3 El estrés y su potencial relación con los FINEs.	23
1.3.1 Estrés.	23
1.3.2 Sustrato fisiológico de la respuesta de estrés.....	25
1.3.3 Modulación de la respuesta inmune por situaciones de estrés.	27
2. Hipótesis y predicciones.	31
Predicciones derivadas.	31
3. Objetivos.	32
3.1 Objetivo general.	32
3.2 Objetivos específicos.	32
4. Materiales y Métodos Generales.	34 a 56
4.1 Modelos animales.....	35
4.1.1 <i>Coturnix coturnix</i>	35
4.1.2 <i>Gallus gallus</i>	36
4.2 Definición de la manera de aproximación al estudio de FINEs en aves.....	38
4.3 Manipulación del animal para determinación de su FINE.	40
4.4 Técnicas empleadas y su puesta a punto.	41
4.4.1 Cuantificación de Corticosterona, IFN- γ e IL-4 en <i>Gallus gallus</i>	41
4.4.2 RIA para cuantificación de CORT en <i>Coturnix coturnix</i>	42
4.4.3 Recuento leucocitario en extendido de sangre.	42
4.4.4 Titulación de anticuerpos específicos contra glóbulos rojos de oveja.	42
4.4.5 Linfoproliferación celular.	42
4.4.6 Citometría de Flujo.....	43
4.4.7 Análisis de material genético.	45
4.4.7.1 Aislamiento de Glóbulos Blancos.....	45
4.4.7.2 Extracción de RNA.....	46
4.4.7.3 Transcripción Reversa (RT).	46
4.4.7.4 Amplificación de material genético.	47
4.4.7.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa (convencional).....	47
4.4.7.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa (tiempo real).	50

4.5	Protocolos de estrés crónico.	52
4.5.1	<i>Coturnix coturnix</i>	52
4.5.2	<i>Gallus gallus</i>	55
4.6	Análisis estadísticos.	56
5.	Estudio sobre la interrelación entre componentes del sistema INE en <i>Coturnix coturnix</i>: Potencial existencia y distribución poblacional de fenotipos inmuno-neuroendócrinos.	57 a 66
5.1	Introducción.	58
5.2	Materiales y métodos.	58
5.3	Resultados y Discusión.	59
5.4	Conclusiones parciales.	66
6.	Estrés crónico, variado e impredecible como modulador de la expresión y/o distribución de fenotipos inmunoneuroendócrinos en <i>Coturnix coturnix</i>.	67 a 80
6.1	Introducción.	68
6.2	Materiales y métodos.	68
6.2.1	Esquema experimental.	68
6.2.1.1	Protocolo de estrés crónico, variado e impredecible.	69
6.3	Resultados y discusión.	70
6.3.1	Determinación de FINEs previo estrés crónico variado.	70
6.4	Conclusiones parciales.	79
7.	Evaluación de la interrelación entre componentes del sistema INE en <i>Gallus gallus</i>: estudio sobre existencia y potencial distribución poblacional de fenotipos inmunoneuroendócrinos.	82 a 91
7.1	Introducción.	83
7.2	Materiales y métodos.	83
7.2.1	Determinación de FINE.	83
7.3	Resultados y discusión.	84
7.4	Conclusiones parciales.	91
8.	Evaluación de un estrés crónico social como modulador de la expresión y distribución de fenotipos inmunoneuroendócrinos en <i>Gallus gallus</i>.	93 a 100
8.1	Introducción.	94
8.2	Materiales y Métodos.	94
8.2.1	Caracterización del estresor crónico social.	94
8.3	Resultados y discusión.	95
8.4	Conclusiones parciales.	100
9.	Discusión general, conclusiones finales y construcciones futuras.	102 a 119
9.1	Discusión General.	103
9.1.1	Definición de variables para caracterizar un FINE en aves.	103

9.1.2	Expresión de FINEs en condiciones basales en dos especies de aves de granja: <i>Coturnix Coturnix</i> y <i>Gallus gallus</i>	104
9.1.3	Expresión de FINEs y modulación por estrés crónico en aves de granja que poseen diferente tiempo de domesticación: <i>Coturnix coturnix</i> y <i>Gallus gallus</i>	108
9.1.4	Domesticación y expresión de FINEs en aves de la especie <i>Coturnix coturnix</i> y <i>Gallus gallus</i>	112
9.1.5	Variabilidad, estrés crónico y expresión de FINEs.	114
9.2	Discusión final.	115
9.3	Conclusión final.	118
9.4	Potenciales construcciones futuras.	119
10.	Bibliografía.	121 a 138

Índice de figuras, tablas y funciones.

Las figuras, tablas y funciones han sido numeradas siguiendo el formato: “a.n”, siendo “a” el número de capítulo donde se encuentra y “n” el orden de la figura, tabla o función en dicho capítulo.

Índice de figuras.

Figura 4.1: Gráfico de puntos (“Dot plot”) obtenido a partir de la realización de una citometría de flujo en codornices. En el gráfico se indican las subpoblaciones leucocitarias detectadas con la técnica en base a lo desarrollado por (Uchiyama et al., 2005).....45

Figura 5.1: Gráfico de análisis de componentes principales empleando como variables clasificatorias a: la concentración plasmática de CORT, la linfoproliferación ante la inyección de PHA-P, el título de anticuerpos contra GRO, y el cociente obtenido a partir de la citometría de flujo. En negro, blanco y gris se representan respectivamente los animales que corresponderían al perfil A, B e intermedio (ver detalles de clasificación en perfiles más abajo en página siguiente). Número total de animales en análisis: 60. Número de animales por grupo: A: 10 (15%), B: 10 (15%), intermedio: 40 (70%).62

Figura 6.1: Gráfico de análisis de componentes principales de codornices adultas empleando como variables clasificatorias a: la concentración plasmática de CORT, la linfoproliferación ante la inyección de PHA-P, el título de anticuerpos contra GRO, y el cociente obtenido a partir de la citometría de flujo. Se muestran en diferentes colores los diferentes grupos de animales. En negro, blanco y gris se representan respectivamente los animales que corresponderían al perfil A, B e intermedio (ver detalles de clasificación en perfiles en página siguiente). Número de animales en análisis: 93. Número de animales por grupo: A: 13 (14%), B: 14 (15%), intermedio: 66 (71%).71

Figura 6.2: Gráfico de análisis de componentes principales de codornices adultas luego de haber sido sometidas a estrés crónico variado empleando como variables clasificatorias a: la concentración plasmática de CORT, la linfoproliferación ante la inyección de PHA-P, el título de anticuerpos contra GRO, y el cociente obtenido a partir de la citometría de flujo. Se muestran en diferentes colores los diferentes grupos de animales. En negro, blanco y gris se representan respectivamente los animales que corresponderían al perfil A, B e intermedio (ver detalles de clasificación en perfiles más abajo en página siguiente). Número de animales en análisis: 84. Número de animales por grupo: A: 19 (23%), B: 20 (24%), intermedio: 45 (53%).75

Figura 7.1: Gráfico de análisis de componentes principales empleando como variables clasificatorias la linfoproliferación, la titulación de Ac contra GRO, cociente Inn/Adq, concentración de CORT, IL-4 e IFN- γ . Los colores representan el potencial fenotipo extremo del animal. Se muestran en diferentes colores los diferentes grupos de animales. En blanco, negro y gris se representan respectivamente los animales que corresponderían al perfil A, B e intermedio (ver detalles de clasificación en perfiles más abajo en página siguiente). Número de animales en análisis: 72. Número de animales por grupo: A: 12 (16%), B: 12 (16%), intermedio: 48 (68%)......86

Figura 7.2: Gráfico de análisis discriminante empleando como variables linfoproliferación, titulación de Ac GRO, cociente Inn/Adq, concentración de CORT, IL-4 e IFN- γ . Se muestran en diferentes colores los diferentes grupos de animales definiéndolos además mediante líneas de contorno. Color blanco, negro y gris indican grupos de animales de perfil A, B e intermedio respectivamente. Número de animales en análisis: 72. Número de animales por grupo: A: 12, B: 12, intermedio: 48.90

Función 7.1: Función discriminante obtenida a partir de los coeficientes indicados en el análisis discriminante realizado con las variables: linfoproliferación in vivo, titulación de anticuerpos contra GRO, cociente Inn/Adq, concentración de CORT, IL-4 e IFN- γ91

Figura 8.1: Gráfico de análisis de componentes principales empleando como variables clasificatorias Linfoproliferación, titulación de Ac GRO, cociente Inn/Adq, concentración de CORT, IL-4 e IFN- γ . Se muestran en diferentes colores los diferentes grupos de animales. En negro, blanco y gris se representan respectivamente los animales que corresponderían al perfil A, B e intermedio (ver detalles de clasificación en perfiles en página siguiente). Número de animales en análisis: 69. Número de animales por grupo: A: 19 (28%), B: 21 (30%), intermedio: 29 (42%)......95

Figura 8.2: Gráfico de análisis discriminante empleando como variables linfoproliferación, titulación de Ac GRO, cociente Inn/Adq, concentración de CORT, IL-4 e IFN- γ . Se muestran en diferentes colores los diferentes grupos de animales definiéndolos además mediante líneas de contorno. Color negro, blanco y gris indican grupos de animales de perfil A, B e intermedio respectivamente. Número de animales en análisis: 69. Número de animales por grupo: A: 19, B: 21, intermedio: 29.99

Función 8.1. Función discriminante obtenida a partir de los coeficientes indicados en el análisis discriminante realizado con las variables: linfoproliferación in vivo, titulación de anticuerpos contra GRO, cociente Inn/Adq, concentración de CORT, IL-4 e IFN- γ100

Figura 9.1: Resumen de las variables empleadas en cada modelo animal objeto de la presente tesis para definir y estudiar los FINEs. Hormonales: niveles basales de

corticosterona (CORT). Efectores de la interacción INE: linfoproliferación ante la inyección de PHA-P, título de Ac inducidos por la inyección de GRO, cocientes representativos de poblaciones leucocitarias (FLD o Inn/Adq). Mediadores de la interacción INE: IFN- γ , IL-1 β (pro-inflamatorios), IL-13 e IL-4 (anti-inflamatorios).103

Figura 9.2: Representación esquemática de los grupos extremos de animales que expresan uno u otro FINE en aves de la especie *Coturnix coturnix*. Las variables seleccionadas para determinar la existencia de FINE se encuentran rodeando cada animal y su tamaño relativo representa si ese grupo posee alto o bajo nivel de respuesta en la variable citada. Hormonales: niveles basales de corticosterona (CORT). Efectores de la interacción INE: linfoproliferación ante la inyección de PHA-P (LINFO), título de Ac inducidos por la inyección de GRO, cocientes de poblaciones leucocitarias (FLD). Mediadores de la interacción INE (ARNm): IFN- γ , IL-1 β (pro-inflamatorios), IL-13 e IL-4 (anti-inflamatorios). 104

Figura 9.3: Representación esquemática de los grupos extremos de animales que expresan uno u otro FINE en aves de la especie *Gallus gallus*. Las variables seleccionadas para determinar la existencia de FINE se encuentran rodeando cada animal y su tamaño comparativo representa si ese grupo posee alto o bajo nivel de respuesta en la variable dada. Hormonales: niveles basales de corticosterona (CORT). Efectores de la interacción INE: linfoproliferación ante la inyección de PHA-P (LINFO), título de Ac inducidos por la inyección de GRO, cocientes de poblaciones leucocitarias (Inn/Adq). Mediadores de la interacción INE (proteínas séricas): IFN- γ (pro-inflamatorio) e IL-4 (anti-inflamatorio).104

Índice de tablas.

Tabla 4.1: Contenido (composición y volumen) de los diferentes tubos utilizados en la puesta a punto de la citometría de flujo de sangre de codornices.....43

Tabla 4.2: Contenido (composición y volumen) de los diferentes tubos utilizados en la puesta a punto de PCR convencional de β -actina.48

Tabla 4.3: Temperatura correspondiente a cada uno de los tubos utilizados en la puesta a punto de la temperatura de “annealing” de la PCR convencional de β -Actina.49

Tabla 4.4: Parámetros obtenidos como óptimos para la amplificación de los genes de *Coturnix coturnix* en estudio mediante PCR convencional.50

Tabla 4.5: Secuencia y número de acceso de los genes de mediadores INE en aves de la especie *Coturnix coturnix*, amplificados a través de la técnica de PCR en tiempo real.51

Tabla 4.6: Combinaciones de variables empleadas en la puesta a punto de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para material genético de aves de la especie <i>Coturnix coturnix</i>.	52
Tabla 4.7: Nombre y descripción de cada estresor empleado en el diseño de un protocolo de estrés CVI desarrollado en aves de la especie <i>Coturnix coturnix</i> para conocer el efecto del mismo sobre la distribución poblacional de los FINEs.	53
Tabla 4.8: Descripción del protocolo de estrés CVI desarrollado en aves de la especie <i>Coturnix coturnix</i> para conocer el efecto del mismo sobre la distribución poblacional de los FINEs.	54
Tabla 5.1: Efecto de los factores Línea (lab vs. no lab) y Batería (1 vs. 2) y su interacción sobre las variables: concentración plasmática de CORT, linfoproliferación in vivo ante la inyección de PHA-P, título de anticuerpos contra GRO, y FDL.	60
Tabla 5.2: Análisis de correlación de la variable “Orden de muestro” con las variables: concentración plasmática de CORT, linfoproliferación ante la inyección de PHA-P, título de anticuerpos contra GRO, y cociente obtenido a partir de la citometría de flujo. Efecto del factor “Día” sobre las mismas variables de respuesta.	61
Tabla 5.3: Coeficiente de correlación de Pearson entre las variables CORT, Linfoproliferación, Ac GRO y FDL.	63
Tabla 5.4: Efecto de los factores Línea (lab vs. no lab) y Perfil (A vs. B) y su interacción sobre las variables: concentración plasmática de CORT, linfoproliferación ante la inyección de PHA-P, título de anticuerpos contra GRO, y cociente obtenido a partir de la citometría de flujo (FDL).	64
Tabla 5.5: Media (\pm error estándar) de variables INE determinadas en grupos de individuos con Perfil A o B.	65
Tabla 5.6: Resumen conjunto de todos los parámetros definidos como necesarios para la determinación de FINEs en aves de la especie <i>Coturnix coturnix</i>. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.	66
Tabla 6.1: Protocolo de estrés CVI desarrollado en codornices para conocer el efecto del mismo sobre la distribución poblacional de los FINEs.	69
Tabla 6.2: Análisis de correlación entre el Orden de muestreo (ORDEN) y Ubicación en jaula (JAULA) y la concentración plasmática de CORT, la linfoproliferación ante la	

inyección de PHA-P, los título de anticuerpos contra GRO, y el cociente obtenido a partir de la citometría de flujo. Efecto del Día de muestreo sobre las mismas variables de respuesta.	70
Tabla 6.3: Coeficientes de correlación de Pearson entre las variables CORT, Linfoproliferación, Ac GRO y FDL.....	72
Tabla 6.4: Media (\pm error estándar) de variables INE determinadas en grupos de individuos con Perfil A o B.	73
Tabla 6.5: Resumen conjunto de todos los parámetros definidos como necesarios para la determinación de FINEs en aves de la especie <i>Coturnix coturnix</i> . Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.	74
Tabla 6.6: Coeficientes de correlación de Pearson entre las variables CORT, Linfoproliferación, Ac GRO y FDL.....	76
Tabla 6.7: Media (\pm error estándar) de variables INE determinadas en grupos de individuos con Perfil A o B.	77
Tabla 6.8: Resumen conjunto de todos los parámetros propuestos como necesarios para la determinación de FINEs en aves de la especie <i>Coturnix coturnix</i> luego de haber sido sometidas a un estrés CVI. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.	78
Tabla 6.9: Proporciones de perfiles expresados en una población de aves de la especie <i>Coturnix coturnix</i> previo y post estrés CVI.	78
Tabla 6.10: Proporciones de cambios de perfiles expresados en una población de aves de la especie <i>Coturnix coturnix</i> producto de un estrés CVI.....	79
Tabla 7.1: Efecto del tamaño de grupo (10 vs. 40), apariencia fenotípica (marcado vs. no marcado) y su interacción, y efecto de la ubicación sobre la respuesta de linfoproliferación in vivo, titulación de anticuerpos contra GRO, cociente Inn/Adq concentración de CORT, IL-4 e IFN- γ	85
Tabla 7.2: Coeficiente de correlación de Pearson entre CORT, Linfoproliferación, Ac GRO, cociente Inn/Adq, IL-4 e IFN- γ	87
Tabla 7.3: Efecto del tamaño de grupo (10 vs. 40) y fenotipo (marcado vs. no marcado) sobre la variable perfil.	88

Tabla 7.4: Efecto del perfil (A vs. B) sobre la concentración plasmática de CORT, la linfoproliferación, el título de anticuerpos contra GRO, el cociente Inn/Adq y la concentración de citoquinas pro y anti-inflamatorias (IFN-γ e IL-4, respectivamente).	88
Tabla 7.5: Media (\pm error estándar) de variables INE determinadas en grupos de individuos con Perfil A o B.	89
Tabla 8.1: Coeficiente de correlación de Pearson entre CORT, Linfoproliferación, Ac GRO, cociente Inn/Adq, IL-4 e IFN-γ.	96
Tabla 8.2: Media (\pm error estándar) de variables INE determinadas en grupos de individuos con Perfil A o B.	97
Tabla 8.3: Análisis de proporciones de perfiles expresados en una población de aves de la especie <i>Gallus gallus</i> previo y post estrés social.	97
Tabla 8.4: Proporciones de cambios de perfiles expresados en una población de aves de la especie <i>Gallus gallus</i> producto de un estrés social.....	98
Tabla 8.5: Proporciones de cambios de individuos de una población intermedia a perfil extremo en la especies <i>Coturnix coturnix</i> y <i>Gallus gallus</i> producto de un protocolo de estrés*	98

Índice de funciones.

*Función 7.1: Función discriminante obtenida a partir de los coeficientes indicados en el análisis discriminante realizado con las variables: linfoproliferación in vivo, titulación de anticuerpos contra GRO, cociente Inn/Adq, concentración de CORT, IL-4 e IFN- γ*91

*Función 8.1. Función discriminante obtenida a partir de los coeficientes indicados en el análisis discriminante realizado con las variables: linfoproliferación in vivo, titulación de anticuerpos contra GRO, cociente Inn/Adq, concentración de CORT, IL-4 e IFN- γ*100

Abreviaturas.

abreviatura	significado desarrollado
μg	microgramo.
μl	microlitro.
A	Adenina.
Ac	Anticuerpo.
ACh	Acetilcolina.
ACP	Análisis de componentes principales.
ACTH	Adrenocorticotrofina o corticotrofina.
AD	Análisis discriminante.
ADN	Ácido desoxiribonucleíco.
ADNasa	Enzima degradadora de ADN.
Adq	Inmunidad adquirida.
ANOVA	Análisis de la varianza.
ARN	Ácido ribonucleíco.
ARNasa	Enzima degradadora de ARN.
ARNm	ARN mensajero.
AS	Antisentido.
C	Citosina.
CEBADOR F	Cebador "Forward".
CEBADOR R	Cebador "Reverse".
CORT	Corticosterona.
CP	Componente principal.
CPA	Célula presentadora de antígenos.
CRH	Hormona liberadora de corticotrofina.
CVI	Crónico variado e impredecible.
DNTp	Desoxi-nucleótidos tri-fosfato.
DO	Densidad óptica.
EC	Eje canónico.
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético.
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.
F344	Cepa de rata Fischer.
FDL	Frecuencia de distribución leucocitaria.
FIG	Factor inductor de glucocorticoides.
FINE	Fenotipo inmuno-neuroendócrino.
g	Gravedad.
G	Guanina.
GC	Glucocorticoide.
GRGC	Gen de respuesta a glucocorticoide.

abreviatura significado desarrollado

GRO	Glóbulo rojo de oveja.
HPA	Eje Hipotálamo Pituitario Adrenal.
IFN	Interferon.
IL	Interleucina.
INE	Inmunoneuroendocrino/a.
Inn	Inmunidad innata.
l	Litro.
LEW	Cepa de rata Lewis.
mg	miligramo.
Mg	Magnesio.
ml	mililitro.
NF-κB	Factor nuclear Kappa-B.
ng	nanogramo.
NS	No significativo.
°C	Grados centígrados.
P	Probabilidad.
PBS	Búfer fosfato salino.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
pg	picogramo.
PHA-P	Fitohemaglutinina-P.
RIA	Radio-inmunoensayo.
RPM	Revoluciones por minuto.
RT	Transcripción reversa.
S	Sentido.
SA	Simpático-adrenérgico.
SC	Síndrome comportamental.
SNC	Sistema nervioso central.
SNP	Sistema nervioso periférico.
T	Timina.
Th1	Subpoblación de linfocitos colaboradores 1.
Th17	Subpoblación de linfocitos colaboradores 17.
Th2	Subpoblación de linfocitos colaboradores 2.
TNF	Factor de necrosis tumoral.
T°	Temperatura.
VC	Vagal-colinérgico.
vs	Versus.

Resumen.

La inmunoneuroendocrinología comprende diversas interacciones a nivel sistémico, celular y molecular. Se ha propuesto la existencia de fenotipos inmunoneuroendócrinos (FINEs) describiendo subgrupos poblacionales con características diferenciales en distintos niveles de interacción inmunoneuroendócrina (INE). En mamíferos estos perfiles se estudian bajo el paradigma Lewis/Fisher (ratas con opuesta susceptibilidad a infecciones, enfermedades autoinmunes y tumores). En 2008 se demuestra la existencia de FINEs en humanos. Analizando la respuesta de estrés en el contexto INE, los FINEs podrían estar asociados a diferencias en la respuesta de estrés. La presente tesis evidencia la existencia de FINEs en 2 especies de aves de granja con diferente grado de domesticación: *Coturnix coturnix* y *Gallus gallus*. En poblaciones de ambas se encontraron 2 subgrupos que manifiestan una diferencia basal en niveles plasmáticos de corticosterona y (asociado a esto) perfiles de respuesta opuestos de efectores y mediadores de la interacción INE. Se evaluó la modulación de la distribución poblacional de FINEs por estrés crónico. Poblacionalmente el estrés crónico se constituye como fenómeno inductor de estos fenotipos actuando como fuerza disruptiva sobre su expresión. Post estrés se evidencia que los individuos conservan su FINE extremo y el aumento de la frecuencia de expresión de estos fenotipos se da a expensas de la subpoblación que previo estrés poseía una respuesta intermedia. Estos resultados se interpretan considerando tanto los fenotipos como su modulación por estrés crónico en diferentes contextos de discusión: evolutivo (teoría de asignación de recursos, selección direccionada), fisiológico (teorías de síndrome, de multi-huésped con multi-parásito), poblacional (teoría de capital y análisis de fitness) e individual (teorías de defensa real y plasticidad). De este modo se contribuye al conocimiento sobre la existencia de FINEs y su relación con el estrés de tipo crónico en ambos modelos de aves de granja.

Summary.

Immuno-neuroendocrinology comprises a variety of interactions at a systemic, cellular and molecular level. The existence of immune-neuroendocrine phenotypes (INPs) has been proposed describing population subgroups regarding different characteristics at different levels of the immuno-neuroendocrine (INE) interaction. In mammals these profiles are studied under the Lewis/Fisher paradigm (rats with opposite susceptibility to infections, autoimmune diseases and tumors). In 2008 the existence INPs in humans was demonstrated. Considering stress response in the INE context, these phenotypes could be associated to differences in the stress response. This dissertation thesis proposes the existence of INPs in two poultry model species with different domestication history: *Coturnix coturnix* and *Gallus gallus*. In populations of both species, 2 subgroups manifesting differences in basal plasma corticosterone levels and (associated with this) opposite profiles of INE effectors and mediators responses were found. Modulation of INPs distribution by chronic stress was evaluated finding that this stress constitutes an inductive as well as disruptive force on INPs expression. Individuals retain their FINE post stress and the increase in the frequency of expression of these phenotypes is given at expense of animals that showed an intermediate response previous to stress. These results are discussed considering both phenotypes and their modulation by chronic stress in different contexts: evolutionary (resource allocation theory, directed selection), physiological (syndrome and multi-host with multi-parasite theories), at a population (capital theory and analysis of fitness) and also at individual (actual defense theory and plasticity) level. This dissertation thesis contributes to the knowledge regarding the existence of INPs and their relationship with the stress state in two avian models.

1. Introducción.

Para comenzar con el desarrollo escrito de la presente tesis, se pondrán a consideración las palabras un investigador húngaro considerado uno de los padres de la inmuno-neuroendocrinología como disciplina:

*“El circuito inmuno-neuroendócrino representa un caracter de la fisiología y de la patología inmensamente complejo, poderoso y de amplio alcance. Este caracter va desarrollando su camino hacia la creación de una nueva inmunología basada en una visión enriquecida del potencial inmunológico en la salud y en la enfermedad. Esta nueva inmunología será discutida en el marco de trabajo de la fundación de una nueva biología, más apropiadamente llamada **Neuro-Inmuno-Biología...***

Andor Szentivanyi”.

1.1 Tres disciplinas... neurología, endocrinología e inmunología.

Para poder realizar un desarrollo teórico de cada disciplina antes de la descripción de la inmuno-neuroendocrinología se consultó diverso material bibliográfico desde libros hasta artículos de publicación científica. Al finalizar cada una de las introducciones teóricas se citarán en conjunto las referencias empleadas en la redacción del texto.

1.1.1 ... neurología.

La Neurología, decía Thomas Willis (quien uso esta palabra para definir a la disciplina) es por definición la ciencia que posee por objeto el estudio del sistema nervioso. El famoso filósofo René Descartes en el siglo XV especuló que toda actividad de un animal era una reacción necesaria a algún estímulo externo; la conexión entre el estímulo y la respuesta seguramente estaba hecha a través de una ruta nerviosa. Logró transmitir esta idea a sus discípulos de modo tal que uno de ellos (Alkmeon de Croton) profundiza en el concepto mencionando que el cuerpo se encontraba integrado como un todo a través de la hegemonía del cerebro. Los primeros avances registrados en esta ciencia se produjeron en el período que históricamente es denominado Renacimiento. Un ejemplo temprano fue *Naturalis Philosophiae Compendium* de Johann Peyligk, publicado en Leipzig, Alemania, en 1499. Este trabajo contenía 11 grabados en madera, donde estaban representadas estructuras asociadas al sistema nervioso como algunas de las meninges: la duramadre y la piamadre, así como los ventrículos encefálicos. Una revolución tuvo lugar en la anatomía en general y en la neuro-anatomía en particular en el año 1543 cuando Andreas Vesalio publica su obra *De Humani Corporis Fabrica*. Esta recopilación se compuso de 7 libros y en su libro número 5 describe el sistema nervioso: incluye imágenes con descripciones anatómicas de diversas estructuras como los ventrículos cerebrales, los nervios craneales, la glándula hipófisis, las meninges, las estructuras del ojo, el suministro vascular al cerebro y la médula espinal, y nervios periféricos. La obra de Vesalio fue un importante hito que le valió ser considerado el padre de la anatomía moderna. Siguiendo un desarrollo de tipo cronológico, Thomas Willis en 1664, publicó *Anatomía del Cerebro*, obra que fue sucedida por *La Patología Cerebral* en 1676. Este investigador aportó avances sustanciosos en la materia al remover

un cerebro del cráneo, y así fue capaz de describirlo más claramente, exponiendo el *círculo de Willis* (el círculo de vasos que permite suministro arterial al cerebro). Estas obras producto de las investigaciones de Willis fueron las primeras en contener nociones no exclusivamente anatómicas. Algunos de sus escritos hacen referencia a funciones cerebrales, incluyendo una idea en cuanto a la localización de los centros que controlarían las mismas, incluso describe la existencia de diversos centros subcorticales que unían los 2 hemisferios cerebrales. Como ya se ha mencionado, a él se debe al acuñamiento de la palabra neurología. Como muchas investigaciones en estas áreas, algunos de los avances provienen de estudios de patologías y anomalías tanto anatómicas como funcionales. Willis describió la epilepsia, la apoplejía y la parálisis. Mateo Baillie y Jean Cruveilhier ilustraron las lesiones que tienen lugar en el encéfalo en el caso de un accidente cerebrovascular, en 1799 y 1829 respectivamente. Todos los avances descriptos incrementaron el cuerpo de conocimiento referido a la morfología y la anatomía del sistema nervioso con las posibilidades ópticas limitadas del ojo humano. Sólo cuando se identificaron las células al microscopio fue posible avanzar más allá de la noción preponderantemente anatómica. Jan Evangelista Purkinje en 1837 fue el primer investigador en dar una descripción de las células nerviosas; de hecho esta descripción de las neuronas sería muy temprana para células de cualquier tipo. Más tarde Golgi (*Opera omnia*) y Cajal (*textura del sistema nervioso de hombre y de los vertebrados*) desarrollaron tinciones para las ramificaciones de las neuronas, logrando de esta manera hacer un gran avance en el área de la morfo-anatomía a nivel celular del sistema nervioso. Independientemente de la adherencia ideológica de cada uno a la teoría reticular o neuronal, sus trabajos fueron necesariamente complementarios y es por la actividad conjunta que se hacen merecedores del premio Nobel en el año 1906 en “reconocimiento a su trabajo en la estructura del sistema nervioso”. Este es el momento en que se comenzó a desarrollar el estudio a nivel celular de los componentes del sistema nervioso pero la función seguía aún sin describirse en detalle. Los primeros y más destacables avances en el estudio de la funcionalidad fueron los alcanzados por Luigi Galvani, quien demostró que la estimulación eléctrica de los nervios es responsable de la contracción de las fibras musculares. Este investigador es considerado el padre de la electrofisiología y su trabajo se basó en el empleo de sapos como modelo animal. Otra labor pionera en estas áreas de funcionalidad fueron los trabajos realizados en colaboración por los

investigadores Charles Bell y Francois Magendie quienes por vez primera expusieron que las astas ventrales de la médula espinal corresponden a las vías motoras y las astas dorsales a las vías sensoriales. Otro avance de integración anatomo-funcional en esta disciplina se desarrolla cuando un paciente hemipléjico que no podía hablar llevó al investigador Paul Broca a proponer de manera acertada que las funciones de la corteza cerebral tienen una localización anatómica definida. Ivan Pavlov desarrolló estudios en el área de los reflejos y la posibilidad de las funciones cerebrales superiores de modificarlos mediante condicionamientos, realizando estudios que tenían como animal modelo a perros. Sus estudios fueron complementados en cuanto a su sustrato fisiológico por el neurofisiólogo Charles Sherrington de Scott. De esta manera queda definido cómo históricamente se va desde el concepto de filósofos de 25 siglos atrás hasta la integración neurofisiológica del sistema nervioso.

En cuanto a la idea de manejo actual, el tejido nervioso, que comprende tal vez hasta trillones de neuronas con multitud de interconexiones, forma el complejo sistema de comunicación neuronal en el cuerpo de animales vertebrados superiores. Las neuronas poseen receptores especializados en la recepción de distintos estímulos (mecánicos, químicos, térmicos, etc) y transducirlos en impulsos nerviosos que serán conducidos a centros nerviosos. Estos impulsos se transfieren a otras neuronas para el procesamiento y transmisión a centros más altos a fin de percibir sensaciones o iniciar acciones motoras. Para llevar a cabo estas funciones, el sistema nervioso se organiza anatómicamente en sistema nervioso central (SNC, encéfalo y médula espinal) y sistema nervioso periférico (SNP). Este último se localiza fuera del SNC e incluye los nervios craneales, raquídeos y sus ganglios relacionados.

Funcionalmente el SNP se divide en un componente sensorial (aférente), que recibe y transmite impulsos al SNC para su procesamiento, y un componente motor (eferente), que se origina en el SNC y transmite impulsos a órganos efectores en la totalidad del cuerpo. El componente motor se subdivide en: i) sistema somático, en el que los impulsos originados en el SNC son transmitidos a través de una neurona a fibras musculares esqueléticas, comprendiendo además numerosas estructuras superiores de gran importancia como las cortezas motoras, cerebelo, núcleos de la base, y ii) sistema autónomo, en el que los impulsos que provienen del SNC son transmitidos primero a un ganglio autónomo a través de una neurona; una segunda neurona que se origina en el

ganglio transmite a continuación el impulso a músculo liso, cardíaco o glándulas. Vale aclarar que en este componente se incluyen importantes centros de control y coordinación, como los centros bulbares y otros. De los centros autónomos parten vías simpáticas y para-simpáticas para regular funciones vitales como mio-contracción y estímulos glandulares, entre otros. Además de neuronas, el tejido nervioso contiene muchos otros tipos celulares denominados en conjunto células neurogliales, que no reciben ni transmiten impulsos; en lugar de ello, apoyan a las neuronas en diversas formas. Referencias consultadas: (Cimino, 1999; Crainz, 1982; Descartes, 2011; Doyle, 1939; Gartner and Hiatt, 2001; Grant, 2007; Grossman, 1971; Le Fanu, 1962; Mazzarello, 1998; McMenemey, 1953; Pavlov and Tracey, 2005; Praga, 2010; Reveron, 2007; Romero Reveron and Reveron, 2007; Tubbs et al., 2007; Üstün, 2004).

1.1.2 ... endocrinología.

Los primeros avances en la ciencia denominada endocrinología fueron preponderantemente de tipo anatómicos y comenzaron con la descripción de los denominados órganos endócrinos básicos. Las gónadas y el hígado eran conocidas para los primeros estudiosos, así como lo era el timo para los Alejandrinos (siglo III a.C.). Las glándulas tiroides, pineal y pituitaria fueron descritas por Galeno. Las suprarrenales fueron descubiertas por Bartolomeo Eustachi en el siglo XVI. Los islotes pancreáticos fueron descritos por vez primera por Langerhans en 1869 y finalmente las paratiroides se descubrieron en Uppsala en 1880 por I. Victor Sandstrom. Se incluye al hígado entre las glándulas endócrinas clásicas respetando al fisiólogo francés Claude Bernard quien introdujo el concepto de secreción interna gracias a sus estudios en tejido hepático. De hecho, el hígado no solo secreta hormonas, sino que a través de sus enzimas se constituye en el órgano efector terminal de la función metabólica de muchos otros. Estos son los órganos endócrinos adultos. Hacen su aparición en la cuarta semana de vida embrionaria. A pesar de esto, se han descrito otros órganos endócrinos cuya aparición se da antes en la ontogenia a los mencionados. Estos son los denominados “organizadores” cuya función es dirigir el desarrollo de una masa celular amorfa en un sistema de órganos diferenciados. Los trabajos en estas áreas comenzaron con Spemman quien en los años 1920 describió los organizadores primarios que aparecen prácticamente antes del clivaje embrionario y que se sitúan en el labio dorsal del blastoporo; y, los

organizadores secundarios que se desarrollan un poco más tarde bajo la inducción de los primarios. Needham en 1934 demostró que los organizadores de Spemman dirigen la diferenciación del embrión celular a través de una hormona morfogenética que es un esteroide y por ende se encuentra relacionada a las hormonas sexuales y la vitamina D. Así se define la aparición en escena de las diversas estructuras endócrinas principales.

En lo que respecta a la capacidad secretoria en el contexto endócrino, precisamente el término “endócrino” ha sido empleado en campos muy amplios. Se ha probado que todas las células del cuerpo de los animales poseen funciones incretorias (secreción de sustancias). Tan temprano como el siglo XVIII Teofilo de Bordeu escribe sobre emanaciones de diversos tejidos del cuerpo penetrando en la sangre. Esta idea es desarrollada más científicamente por Brown-Sequard y D’Arsonval en el siglo XIX. La secreción interna es entonces una función de todas las células. Existen células aisladas en varios tejidos que poseen esta función potenciada, como algunos elementos celulares del hipotálamo. Un paso más en la especialización para la secreción interna lo constituyen algunos grupos de células endócrinas que constituyen órganos endócrinos difusos. Estos fueron descritos por primera vez por Masson como órganos argentafines ubicados en las membranas mucosas del tracto gastrointestinal (año 1914). Un órgano endócrino difuso similar se describió como disperso en las papilas duodenales encargado de la secreción de secretina. De este modo se resume el primer período descriptivo en donde se puede apreciar desde una perspectiva histórica la evolución conceptual que comienza con que todas las células poseen alguna actividad endócrina, para continuar con que en algunos tejidos existen células aisladas que se especializan para constituir células incretoras. En un grado mayor de especialización estas células se encuentran agrupadas en órganos endócrinos difusos y la cumbre de la especialización se da con el agrupamiento de dichas células en glándulas endócrinas reales.

En un siguiente período histórico susceptible de ser denominado endocrinología analítica, se profundizó en el conocimiento de las hormonas y fisiología de glándulas endócrinas. Recién en el siglo XVIII la idea de glándulas endócrinas que tenemos hoy en día (órganos de secreción interna) emergió producto del trabajo de investigadores daneses como Ruysch y el *Tratado de fisiología* de Haller, publicado en 1776. La primera prueba experimental de secreción interna fue dada por Hunter en 1792 y Berthold en 1849. Complementando los experimentos de Hunter, fisiólogos demostraron que la

castración del gallo produce atrofia de la cresta de modo directo, fenómeno que puede ser prevenido si los testículos son trasplantados a otra parte del cuerpo. Con este experimento se demuestra la influencia de los testículos en la sangre y por ende en el cuerpo como un todo. La concepción de secreción interna por las glándulas previamente descritas tomó definitivamente lugar en 1855, año denominado “el pico de la endocrinología” principalmente debido al trabajo de tres investigadores destacados: Claude Bernard, Thomas Addison y Brown-Sequard. En este año Bernard publicó sus *Lecciones de fisiología experimental* en donde estableció definitivamente de modo experimental la doctrina de la secreción interna. El mismo año Addison publicó su clásico *Efectos locales y constitucionales de enfermedades de las cápsulas suprarrenales* en donde el rol de la secreción interna se demuestra a través de observaciones clínico-anatómicas. Brown-Sequard realizan el mismo año los primeros experimentos en animales con adrenalectomía, estimulados de manera directa por el trabajo de Addison.

Desde lo desarrollado, en adelante el conocimiento fisiológico de las glándulas endócrinas progresó rápidamente. Se demostró que su secreción interna está compuesta por sustancias químicas especiales: las hormonas (término usado por primera vez en 1905 por Starling). En 1856 se descubrieron en las glándulas adrenales y en sangre proveniente de las mismas un cromógeno responsable de la secreción glandular. En 1895 Baumann describió la yodo-tironina como el principio activo de la tiroides. Independientemente Takamine y Aldrich aislaron la secreción de la médula adrenal en 1901 y determinaron su fórmula química como adrenalina; un año más tarde se aisló la secretina a partir de extractos duodenales. La última fase en la historia de la fisiología de glándulas endócrinas llegó con el descubrimiento de la integración de estas glándulas y su rol regulatorio en el funcionamiento del cuerpo. A través del trabajo de Cushing y Langdon-Brown las glándulas endócrinas fueron establecidas como constituyentes de un sistema integrado y comandado por la glándula pituitaria. Trabajos experimentales demostraron que este sistema regula el metabolismo (término introducido por Foster en 1876), es decir los procesos químicos del cuerpo. Todas las células del cuerpo poseen funciones metabólicas específicas. Si estas células trabajasen independientemente, el resultado sería el caos. El sistema endócrino regula, correlaciona e integra todos estos metabolismos locales. De este modo contribuye a lo que Claude Bernard denominó la estabilidad del medio interno, la cual es una condición absolutamente indispensable para la vida. Referencias

consultadas: (Bordeu, 1775; Cawadiaz, 1941; Gartner and Hiatt, 2001; Keele, 1969; Langdon-Brown, 1935; Langerhans, 1869; Loeper and Crouzon, 1904; Masson, 1914; Medvei, 1993; Smans and Zelissen, 2012).

1.1.3 ... inmunología.

La inmunología como ciencia se define como el estudio de los mecanismos fisiológicos que los animales usan para defenderse de la invasión por otros organismos. Los orígenes de la especialidad se encuentran en la práctica de la medicina y en las observaciones históricas que indican que las personas que sobrevivían a las enfermedades epidémicas no eran afectadas cuando se enfrentaban con la misma enfermedad nuevamente: eran inmunes a la enfermedad infecciosa. En todos los vertebrados mandibulados cuyos sistemas inmunológicos han sido estudiados hasta el momento, la respuesta inmune se puede dividir en dos grandes ramas: respuestas innatas y adaptativas. La inmunidad innata es la primera línea de defensa de un organismo, la cual incluye barreras física y químicas, más respuestas pre-establecidas para combatir infecciones en sus primeros estadios de desarrollo. La primera instancia en una respuesta es el reconocimiento de un patógeno. En ello participan proteínas solubles y receptores de superficie que se unen ya sea al patógeno y/o sus productos, o a células o proteínas séricas que se modifican en presencia de un patógeno. Una vez que ha sido reconocido, se activan mecanismos efectores que lo destruyen y eliminan. Los mecanismos efectores son aportados por células efectoras fagocíticas y por una batería de proteínas séricas llamadas en conjunto sistema del complemento. La comunicación entre las diferentes células de la inmunidad innata es posible gracias a la secreción de proteínas solubles, las citoquinas. Los efectos de las citoquinas son variados e incluyen: vasodilatación, reclutamiento, sobrevida y proliferación celular. Algunas infecciones logran superar las barreras de defensa impuestas por la inmunidad innata. Es en esta instancia donde las respuestas adaptativas tienen lugar. Las mismas se organizan en respuesta a una infección ya presente y se adaptan a las peculiaridades del patógeno infectante en el animal. Los mecanismos efectores de la respuesta inmunitaria adaptativa son similares a los de la respuesta inmunitaria innata, la diferencia fundamental radica en los receptores de superficie celulares que los linfocitos emplean para reconocer a los patógenos. En contraste con los receptores de la inmunidad innata (que no son específicos), los

receptores de la inmunidad adquirida son altamente específicos. Durante la infección sólo los linfocitos que reconozcan al patógeno serán seleccionados para participar en la respuesta. Estos procesos se denominan de selección y de expansión clonal, por inducir la expansión clonal selectiva de determinadas células. De este modo, el sistema inmune responde a distintos estímulos tanto externos como endógenos a través de mediadores humorales y componentes celulares. Durante su activación por la vía que tenga lugar, se produce la polarización de las respuestas inmunológicas hacia perfiles predominantemente inflamatorios ricos en citoquinas tipo I como interferón (IFN) y o interleucina (IL) 12 o bien, de naturaleza menos inflamatoria y rica en citoquinas de tipo II como IL-4 o IL-10. Esta polarización obedece a señales provenientes de las células presentadoras de antígenos, que en distintos tejidos, promueven selectivamente uno u otro perfil. La producción de citoquinas asociadas a la inmunidad innata muestra una gran variabilidad individual. Los factores que controlan la producción de las citoquinas tradicionalmente se han ligado a los efectos de mecanismos inmunogénicos que operan exclusivamente para el sistema inmune. El entorno de citoquinas y la base genética han sido consideradas los principales factores responsables del control del perfil y la capacidad de respuesta de un individuo. Referencias consultadas: (Davison et al., 2011; De Groote et al., 1992; Du Pasquier, 2005; Entzian et al., 1996; Flajnik and Kasahara, 2010; Mølviq et al., 1988; Mosmann et al., 1986; Murphy, 2009; Parham, 2006; Westendorp et al., 1997).

1.2 SURGIMIENTO... La Inmuno-Neuroendocrinología como disciplina.

Caracterizadas las tres disciplinas desde un principio de modo particular y diferenciado, vale ahora mencionar que con el avance de las investigaciones las áreas de alcance de cada una necesariamente se han superpuesto, si bien resulta realmente difícil encontrar un único punto de solapamiento. En sí la conceptualización de la interacción inmuno-neuroendócrina (INE) ha resultado de un proceso dinámico que involucró estudios que abarcaron diferentes niveles de organización desde células, pasando por tejidos y órganos hasta sistemas complejos como organismos animales completos (ya sean en particular estudios en especies de vertebrados o de invertebrados). Es de esta

manera que conceptos que parecían estar referidos exclusivamente a una sola de las áreas hoy se emplean en todas ellas con diferentes aplicaciones y alcances. De esta manera, resulta relativamente difícil establecer un límite en la comunicación entre células, tejidos u órganos para determinar “inequívocamente” si la interacción es de naturaleza inmune, endócrina, o nerviosa. Un claro ejemplo de lo previo es la descripción de citoquinas que poseen efectos reguladores sobre células nerviosas, como la IL-1 sobre neuronas hipotalámicas en el sistema nervioso central (Alheim, 1997; Elenkov et al., 2000; Turnbull and Rivier, 1999); neurotransmisores con efectos a largas distancias sobre su órgano blanco como la adrenalina o la noradrenalina sobre fibras de musculo esquelético (Elenkov et al., 2000); y, por último, algunas hormonas han sido caracterizadas como moduladoras de la expresión génica en leucocitos como la corticosterona (CORT) y su efecto a nivel nuclear en la transcripción de factores inhibidores de mediadores pro-inflamatorios (Kaiser et al., 2009; Shini et al., 2010b, 2009). De este modo, el criterio una vez fundado en “la distancia que recorre una determinada señal hasta encontrar su célula/órgano blanco de acción” (que en algún momento diferenció de manera inequívoca las disciplinas) ha caído, como también otros pilares de identificación de cada disciplina, para hacer necesario pensar a los 3 sistemas como un nuevo “macrosistema” con capacidad de comunicación autócrina, parácrina y endócrina en diferentes situaciones, todas válidas en el contexto fisiológico normal de un animal, con el principal objeto de mantener la homeostasis.

Por las características de la actividad científica y del crecimiento del cuerpo de conocimientos que genera, la interacción INE no surgió a partir de una revolución en las áreas que competen a la inmuno-neuroendocrinología. Los procesos de gestación de ideas que puedan llevar al cambio o modificación en paradigmas científicos llevan años de desarrollo y acumulación de evidencias de naturalezas variadas (Klimovsky, 1997; Popper, 2005). Por esta razón se hará ahora un repaso histórico, intentando referir de modo cronológico los diferentes hechos que fueron aportando ideas y evidencias que dejaron de manifiesto la existencia de una interconexión subyacente a la primera división de los sistemas: nervioso, endócrino e inmune.

La primera inter-relación entre neurología e inmunología fue principalmente anatómica y ocurre alrededor del año 1899 cuando Tonkoff (Tonkoff, 1899) pone en evidencia que los órganos linfoides se encuentran inervados por fibras nerviosas,

ingresando estas estructuras al interior de los nódulos linfáticos, de modo independiente a los vasos pertenecientes al sistema circulatorio. Por medio del empleo de impregnaciones argénticas es que los anatomistas lograron demostrar que en particular el timo glandular está profusamente innervado. Sin embargo en esos tiempos el timo era considerado meramente una estructura rudimentaria, cuya función como órgano linfoide primario del sistema inmune no sería descubierta hasta 30 años más tarde. De ahí que esta evidencia no contribuyó a la idea de la interacción entre ambos sistemas hasta la atribución al timo de su papel como órgano donde tiene lugar, entre otras funciones, la ontogenia de linfocitos T (Murphy, 2009; Parham, 2006).

La interacción entre la inmunología y la endocrinología comienza a hacerse manifiesta a partir del descubrimiento de la regulación de la inmunidad por la glándula adrenal. Este hecho ocurre a mediados del 1800 cuando Thomas Addison documenta que pacientes con insuficiencia adrenal poseen excesos de linfocitos circulantes y, de acuerdo con esa observación, observa también que la remoción de la glándula adrenal en ratas produce hipertrofia del timo (Keele, 1969; Smans and Zelissen, 2012).

Hacia finales de 1800 y comienzos de 1900, Ilya Metal'Nikov y Paul Ehrlich desarrollan los conceptos de inmunidad celular y humoral respectivamente (Ehrlich, 1893; Metal'Nikov and Chorine, 1920), mientras Sherrington introdujo el concepto de neurotransmisión química. Estos últimos fueron avances paralelos de cada una de estas áreas, lo cual pone de manifiesto que la interacción entre ambas no anula el desarrollo de cada disciplina como cuerpo de conocimiento.

Un hito que demuestra la íntima conexión entre órganos de secreción hormonal y el sistema nervioso fue que el impulso nervioso actúa a través de la liberación de hormonas en los terminales de las fibras. Elliott en 1904 fue el primero en concebir que las fibras nerviosas actúan a través de la liberación de sustancias químicas especiales (hormonas) y esta idea es desarrollada en experimentos posteriores de Loewi de Graz y Cannon. Loeper y Crouzon en el año 1904 (Loeper and Crouzon, 1904) continúan con el estudio de interacciones endócrino-inmunológicas y son los primeros en describir una leucocitosis pronunciada (incremento significativo de leucocitos circulantes) luego de una inyección subcutánea de la hormona adrenomedular epinefrina en humanos. Ishigamy es probablemente el primero en indicar el rol de la interacción del "sistema de estrés" (como fue denominado entonces) y el inmune en la alteración de los procesos infecciosos

(Ishigami, 1919). En 1919 estudiando individuos humanos enfermos de tuberculosis crónica este investigador observa una disminución de la actividad fagocítica de los leucocitos durante los períodos de mayor estrés fisiológico. En este mismo año se desarrolla un importante avance en la interacción neuro-endócrina cuando Greiving, Roussy y Mossinger demuestran que el sistema nervioso desarrolla conexiones entre el hipotálamo y la glándula pituitaria en 1919 (Koutcherov et al., 2000). Ransom y sus colaboradores complementaron y describieron el tracto nervioso entre el núcleo supraóptico del hipotálamo y la glándula pituitaria posterior. En el año siguiente, 1920 Metal’Nikov y Chorine (Metal’Nikov and Chorine, 1920) demuestran que las reacciones inmunes pueden ser condicionadas por métodos pavlovianos clásicos. Quizás un conjunto de conocimientos más extendido en estas interacciones sean los obtenidos a partir de estudios experimentales desarrollados por Hans Selye quien propone el concepto de “respuesta de estrés” y reporta que la hipertrofia de la glándula adrenal y la involución del timo son características comunes de respuesta de animales al estrés, independientemente de la naturaleza del estresor (evento o factor que induce la respuesta de estrés) (Selye, 1936). Estos estudios continúan profundizando en la existencia de una asociación cercana entre la fisiología de la glándula adrenal y la actividad inmune. Complementando el crecimiento en conocimiento desarrollado hasta el momento, el fisiólogo Walter Cannon denomina a esta respuesta de estrés reacción de *lucha o huida* o de “*fight or flight*” (Cannon, 1915) y hace la primera relación o nexo entre la respuesta adaptativa al estrés y la secreción y acción de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina). Fisiólogos demuestran la influencia de la estimulación nerviosa en la secreción hormonal. Cannon lo hace para la adrenalina en 1930 y Mac Leod para la insulina. Dixon, Loewi y Dale demostraron que la acción de nervios parasimpáticos ocurre a través de la liberación de acetilcolina (ACh) y luego Dale describe la hoy denominada placa motora.

En cuanto a la fisiología y funcionamiento de la glándula adrenal, el aislamiento del principal activo de la corteza de esta glándula, cortisona, por Kendall y Reichstein en la década de 1940 y la demostración de su capacidad de suprimir los procesos inflamatorios da soporte a la hipótesis que la secreción adrenal de glucocorticoides (GC) tiene un papel significativo en la regulación de los procesos inmunológicos. Los avances en el conocimiento de las hormonas de la corteza adrenal, su estructura y sus funciones

biológicas fueron reconocidos a nivel mundial y le valieron a sus autores el premio Nobel en Medicina en el año 1950 (Neeck, 2002). A pesar de que aumentos marcados en la concentración plasmática de GC son observados luego de todos los tipos de estímulos estresantes, muchos estudios posteriormente mostraron que la actividad anti-inflamatoria de los GC tenía lugar en rangos de concentraciones más farmacológicas que a niveles fisiológicos de estas moléculas (D Hazard et al., 2008; Puvadolpirod and Thaxton, 2000; Shini and Kaiser, 2009). Los resultados de las investigaciones que tuvieron lugar en las décadas de 1940/50 se adelantaron a los usos de terapias basadas en GC para enfermedades autoinmunes inflamatorias. Estos avances que podrían representar una evidencia bioquímica de la interacción entre sistemas que previamente fueron definidos como compartimentos aislados, fueron simultáneos con el importante trabajo en el área de la neurología de investigadores como Loewi y Dale sobre la transmisión sináptica química: ellos imitaron la respuesta de órganos periféricos a la estimulación nerviosa autónoma aplicando sustancias que se podrían extraer del mismo u otros órganos periféricos (Otsuka, 2007; Raju, 1999). Esto nuevamente refuerza que el creciente conocimiento de la interacción entre las áreas y la intercomunicación entre las mismas no invalidó ni impidió el crecimiento de cada disciplina como cuerpo de conocimiento en particular.

Estudios subsiguientes permitieron profundizar, caracterizar y comprender los mecanismos de las relaciones. Un hito en el proceso de comprensión de interacciones celulares tuvo lugar de mano de los investigadores alemanes Ernst y Berta Scharrer alrededor de los años 1940/50 también. Estos investigadores manifestaron lo siguiente: “es ciertamente extraño que células tan altamente especializadas como las células nerviosas, tuviesen la facultad de actuar como células glandulares” al describir las células neuro-secretoras presentes en animales vertebrados e invertebrados, las características citológicas distintivas de las mismas y el significado a nivel funcional de las neurosecreciones propias de estas células. (Scharrer and Scharrer, 1945; Scharrer, 1998; Smith, 1994). Este trabajo puso de manifiesto de manera inexcusable que la posibilidad de sintetizar, acumular y liberar productos de secreción no es exclusiva de células endócrinas localizadas en glándulas de este sistema. Por otro lado, un avance igualmente considerable y hasta quizás comparable, fue el desarrollado por Geoffrey Harris en los años 1940 (Raisman, 1997). Este investigador develó el control que ejerce el sistema

nervioso sobre el sistema endócrino a través de un exquisito patrón de regulación de síntesis y liberación de miembros individuales de la familia de las hormonas peptídicas, describiendo por primera vez la comunicación que existe entre el hipotálamo y la hipófisis. Dicha comunicación estaría dada a través de la liberación de hormonas en el sistema vascular porta hipotálamo-hipofisario, las cuales selectivamente regulan la secreción de las seis hormonas producidas a nivel de la glándula hipófisis (G. Harris, 1948; G. W. Harris, 1948; Harris, 1950). En los mismos años 40, Ulf von Euler (1946) aísla norepinefrina de un órgano linfoide (el bazo) y luego proporciona la evidencia de que la hormona es el mayor neurotransmisor secretado por el sistema nervioso simpático, investigación cuyos aportes al conocimiento científico lo hicieron merecedor también de un premio Nobel (Shampo and Kyle, 1995). Sin embargo, en las dos décadas siguientes el bazo continuó siendo considerado meramente un reservorio de sangre, y estudios concernientes al rol de la inervación simpática del mismo se focalizaron en su función en la contracción, resistencia vascular y flujo sanguíneo. Esto se debió a que en esos tiempos se asumía que las fibras nerviosas que contienen norepinefrina en el bazo no tenían otra función.

Grandes avances en el funcionamiento y caracterización de la interfaz INE tuvieron lugar en la segunda década del siglo XX. Interesantemente en 1950, Dougherty y Frank notaron que luego de 10 minutos de una inyección subcutánea de epinefrina ocurre aproximadamente un 400% de incremento de lo que denominaron “linfocitos de estrés” (Dougherty and Frank, 1953). Estas células tenían la morfología de linfocitos granulares grandes o células natural “killer” cuya función y características no serían descritas hasta los años 1970, pero la base de que un estímulo endócrino evocaba una respuesta inmunológica estaba siendo fortalecida de manera ineludible. Recién en los años 1970 y 1980, debido al trabajo pionero de Hugo Besedovsky y colaboradores, se define que las hormonas clásicas ya ampliamente caracterizadas por estos años y las citoquinas descritas recientemente estaban involucradas en una comunicación cruzada muy importante y funcionalmente relevante entre el cerebro y el sistema inmune, poniendo en evidencia la existencia de una comunicación a través de mediadores solubles entre los sistemas (Besedovsky, 1981; Besedovsky et al., 1979, 1975). Este hecho aporta sustento a la idea de que la comunicación entre los sistemas no es exclusivamente anatómica. Ellos demuestran que la respuesta inmune induce y por ende incrementa los niveles de GC en

plasma (Besedovsky et al., 1975), altera la actividad de las neuronas noradrenérgicas del hipotálamo (Besedovsky et al., 1983) y disminuye el contenido de NE encontrado a nivel de bazo. En los años 1970 el primer receptor hormonal linfocitario fue descrito funcionalmente cuando se publicó que los agentes adrenérgicos modulan la proliferación linfocitaria (linfoproliferación) a través de la interacción de esta hormona con su receptor específico presente en la membrana de éstas células inmunes, haciendo inexcusable el concepto de interconexión entre un mediador endócrino soluble y su receptor linfocitario. En los años 1970 y 1980, se obtienen resultados del primer estudio morfológico que proveyó la evidencia completa de que los 2 tipos principales de órganos linfoides (primarios y secundarios) se encuentran inervados por fibras nerviosas simpáticas noradrenérgicas.

De este modo es posible apreciar que en la historia de desarrollo conjunto de los sistemas nervioso, inmune y endócrino hay muchos hitos que van lentamente desentrañando nodos de interconexión. Quizás en un principio las tendencias fueron más bien anatómicas, pero cuando los métodos de estudio y el conocimiento adquirido lo permitieron, el estudio pudo ser complementado en aspectos referidos a mecanismos o relaciones a diferentes niveles de complejidad de los organismos animales. Uno de los primeros trabajos que pone en evidencia la actividad integrada del sistema formado por componentes inmune, nervioso y endócrino es publicado en el año 1952. Esta publicación puso en evidencia el papel central del hipotálamo (ya descrito previamente como un elemento central de la interacción neuro-endócrina) en el desarrollo de episodios agudos de asma en pacientes humanos (enfermedad hasta el momento restringida al área de la inmunología clínica). De este modo se describe un ejemplo de control del hipotálamo sobre la actividad inmune a través de mediadores hormonales (Szentivanyi, 1968) (Szentivanyi and Mess, 1952; Szentivanyi and Filipp, 1958), completando los aportes referidos a la interacción entre estos 3 sistemas.

En la década de 1970 gracias al trabajo pionero de Besedovsky, del Rey y colaboradores se estableció el rol fisiológico de GC en la prevención de la hiper-activación y especificidad de reacciones inmunes. De esta manera se da un nuevo hito muy importante en la interacción INE. En una revisión de los años 1980, Munck y colaboradores, reforzaron este concepto (Kelso and Munck, 1984) y propusieron la hoy ampliamente aceptada idea de que los GC endógenos actúan previniendo la hiper-

activación de la respuesta inmune inflamatoria. De esta manera estos mediadores limitan las defensas del hospedador para controlar un patógeno (como en el caso de un virus invasor) sin el efecto deletéreo hacia el hospedador de una hiper-activación del sistema inmune (por ej. daño tisular, autoinmunidad). Trabajos más recientes indican que la influencia de GC en procesos inmunológicos es claramente más compleja que una supresión generalizada de la actividad inmune y depende del tipo de respuesta y del subgrupo de células involucradas (Dhabhar, 2009). Estos aspectos serán discutidos en profundidad más adelante en el desarrollo de la presente tesis. Sin embargo, en principio queda claro que los GC endógenos, producto de la activación del eje neuroendócrino hipotálamo pituitario adrenal (HPA), son reguladores claves en el funcionamiento del sistema inmune, evidenciando nuevamente la naturaleza interactiva que estudia y describe la INE.

El dinamismo de la comunicación entre los sistemas en discusión se hace manifiesto en trabajos posteriores de Besedovsky y col. quienes sugirieron que no sólo los GC tienen un impacto profundo en la actividad inmune, sino que lo inverso es también cierto y la actividad inmune influencia la secreción de GC (Besedovsky and del Rey, 2013; Besedovsky et al., 1986). Esta hipótesis surge en un principio a partir de observaciones experimentales sobre el desarrollo de una respuesta inmune a un antígeno particulado extraño (glóbulos rojos de ovejas-GRO) en ratas, las cuales desarrollan una respuesta endócrina paralela a la inmunitaria caracterizada por el incremento de CORT plasmática. Más aún, ratones inyectados con sobrenadantes de células periféricas estimuladas con concanavalina-A producían uno o más factores inductores de glucocorticoides (FIGs), elevando los niveles plasmáticos de CORT. Estos estudios sugieren la existencia de un mecanismo de feed-back o retroalimentación regulatoria a nivel inmuno-neuroendócrino donde las células inmunes limitarían su propia actividad secretando moléculas que estimulan la liberación de glucocorticoides adrenales.

El concepto de una comunicación bidireccional entre sistema inmune y neuroendócrino se establece firmemente con los trabajos de Edwin Blalock y colaboradores en torno a los años 1980 y 1990 (Blalock, 2002, 1994). Estos investigadores comienzan a describir las bases moleculares para esta comunicación. Sus primeros estudios demostraron coincidencias en las vías de acción de moléculas inmuno-reguladoras como el IFN y de hormonas como la NE. Este grupo de investigadores

descubre que un conjunto de hormonas clásicas no sólo son secretadas por glándulas endócrinas como la pituitaria, sino que también son producidas por células del sistema inmune, como los linfocitos que sintetizan hormona adrenocorticotrofica (ACTH), además de endorfinas, tirotrófina y hormona del crecimiento. El descubrimiento de que estas células inmunes sean capaces de sintetizar moléculas del tipo de ACTH en combinación con la demostración de que en ratones cuyas glándulas pituitarias fueron removidas aún hay producción de CORT ante infecciones virales, llevó a Blalock y col. a proponer el concepto del eje: "linfático-adrenal". Según esta hipótesis la ACTH producida por linfocitos estimulados por la invasión viral actúa sobre las glándulas adrenales para incrementar la secreción de CORT (Blalock, 1994). A pesar de haber encontrado dificultades en la réplica de este fenómeno, Besedovsky y col. demuestran que linfocitos estimulados secretan FIGs que incrementan ACTH y por consiguiente CORT en ratas (Besedovsky and del Rey, 2013). La identidad de los FIGs es un hecho muy importante en el desarrollo de la INE como disciplina. El reconocimiento de que las clásicas hormonas endócrinas no son de modo excluyente la única clase de mediadores involucrados en la comunicación confirma en el sistema la característica de comunicación multidireccional. Este hecho hace necesariamente dinámicos los conceptos de órgano blanco y órgano productor de un determinado mediador. En efecto, a mediados de 1980 se vuelve claro que citoquinas inmuno-reguladoras, también son una pieza clave de coordinación en la interfaz entre sistema inmune y neuroendocrino. Estos estudios fundamentales liderados por Besedovsky y Blalock, indicaron que las citoquinas podrían ser factores liberadores de ACTH extra hipotalámicos liberados por tejidos dañados. A modo de ejemplo, a partir de los estudios mencionados se concluyó que la IL-1 (principalmente) tiene potentes efectos moduladores en la secreción de la mayoría de las hormonas bajo control neuroendócrino (Besedovsky et al., 1986).

Evidencias relativamente recientes de la interfaz inmuno-neuroendócrina que datan del año 2000 demuestran la existencia de un mecanismo para-simpático donde las vías vagales y su señalización se encuentran involucradas en la regulación inmune de la inflamación: la vía colinérgica. Esta información complementa la actividad como neurotransmisor y neuromodulador de la ACh, para ahora caracterizarlo a la vez como inmuno-modulador (Pavlov and Tracey, 2005). Evidencias experimentales indica que la exposición de células macrofágicas humanas a ACh (principal neurotransmisor vagal)

inhibe de modo dosis-dependiente la liberación de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 e IL-18, sin afectar la actividad anti-inflamatoria de IL-10 en respuesta a endotoxina (Borovikova et al., 2000; Tracey). Más aún, la estimulación eléctrica del nervio vago a nivel periférico in-vivo, durante el curso de endotoxemia experimental en ratas, suprime la síntesis de TNF- α en hígado y corazón, atenuando por ende los picos plasmáticos de TNF y previniendo el desarrollo de un shock endotóxico (Borovikova et al., 2000; Pavlov and Tracey, 2005; Tracey).

Hoy en día la comunicación entre los sistemas neuroendócrino e inmune está ampliamente descrita y caracterizada en muchos animales vertebrados (Besedovsky and del Rey, 2013; Butts and Sternberg, 2008; Correa et al., 2007; Elenkov, 2008; Kaiser et al., 2009; Koolhaas, 2008; Mashaly et al., 1993; Romano et al., 1994; Sternberg, 2001). Estos tres sistemas comparten un conjunto común de ligandos y receptores. Ejemplo de esto son: neurotransmisores, neuropéptidos, factores de crecimiento, hormonas y citoquinas neuroendócrinas (Besedovsky and del Rey, 2013; Blalock, 1994; Correa et al., 2007; Kaiser et al., 2009). Hormonas “clásicas” como los GC, la prolactina y la hormona de crecimiento pueden ser producidas por células del sistema inmunológico, así como una variedad de citoquinas (originalmente descritas como producto de secreción de células inmunes) que son sintetizadas y liberadas por diferentes linajes de glándulas y tejidos endócrinos (Heijnen, 2007; Turnbull and Rivier, 1999). Lo descrito previamente se hace válido a nivel celular y, como es de esperarse, también a nivel de organismos multicelulares (con niveles de organización de sistemas de órganos) donde estas células se encuentran integradas en tejidos y en sistemas conspicuos. Finalmente y en síntesis, en la actualidad se han dilucidado vías de comunicación comunes entre estos 3 sistemas en vertebrados superiores (aves y mamíferos), que son otra clara manifestación de su funcionamiento integrado en la fisiología de un animal: el eje HPA, la vía simpático-adrenérgica (SA) y la vía vagal-colinérgica (VC). El eje HPA posee actividad anti-inflamatoria mediada por GC y pro-inflamatoria a través de dehidroepiandrosterona (Bhatnagar and Meaney, 1995; Calogero et al., 1992; Kudielka and Kirschbaum, 2005; Magariños and McEwen, 1995); la vía SA posee actividad dependiente de contexto y del íntimo contacto de terminales nerviosas con linfocitos en el interior de los órganos linfoides secundarios (Calogero et al., 1992; Elenkov et al., 2000; Heijnen, 2007) y la vía VC es anti-inflamatoria, a través de la

liberación de ACh (Anisman et al., 1981; Borovikova et al., 2000; Gallowitsch-Puerta and Pavlov, 2007; Pavlov and Tracey, 2005; Tracey).

De esta manera queda claro que las investigaciones han progresado en diferentes áreas que necesariamente interconectan cuerpos de conocimiento que en un principio correspondieron a la neurología, la inmunología y la endocrinología por separado. En las últimas décadas fuimos testigos de un crecimiento explosivo en nuevas áreas de investigación interdisciplinaria. Fue, y aún sigue siendo, necesario reanalizar los contenidos alcanzados hasta el momento y volver a articular cuerpos de conocimiento en disciplinas nuevas que surgen como una clara necesidad en el avance científico, como puede ser el ejemplo de la *fisiología y farmacología del sistema inmune* que aboca sus estudios de manera específica a la comunicación neuro-endócrina e inmune.

1.2.1 Subpoblaciones de linfocitos T efectores.

Para el desarrollo de la presente tesis resulta de fundamental importancia realizar una profundización en los conceptos referidos a subpoblaciones de linfocitos T efectores. De esta manera se menciona que el balance de respuesta inflamatoria / anti-inflamatoria se analiza en animales a través del estudio de citoquinas circulantes o bien evaluando los isotipos de inmunoglobulinas (Elenkov, 2008; Rasoli et al., 2014). Las respuestas inmunes están reguladas por las células presentadoras de antígenos (CPA) como monocitos/macrófagos, células dendríticas y otras células fagocíticas que son componentes de la inmunidad innata y por las subclases de linfocitos T colaboradores Th1, y Th2 que son componentes de la inmunidad adquirida. Las células Th1 principalmente secretan IFN- γ , IL-2 y TNF- α , que promueven la inmunidad celular, mientras que las células Th2 secretan un conjunto diferente de citoquinas principalmente IL-4, 10 y 13 e IL-9 que promueven la inmunidad humoral (Degen et al., 2005; Elenkov, 2008; Mosmann et al., 1986; Scott, 1989).

Las células Th 0 (vírgenes) son células pluri-potenciales y sirven como precursores de células Th1 y Th2. En sus primeras descripciones del paradigma Th1/Th2, (Mosmann et al., 1986) trataron de explicar las respuestas observadas en muchos modelos experimentales de infección, autoinmunidad y alergia. Las células Th1 son promovidas por la IL-12 que induce la expresión del factor de transcripción T-bet y la secreción de la

citoquina distintiva IFN- γ . Las células Th2 son inducidas por la IL-4, expresan el factor de transcripción GATA3 y están vinculadas a las respuestas humorales a los organismos extracelulares o parásitos y desarrollo de atopia y reacciones alérgicas, con producción de citoquinas que incluyen IL-4, IL-5 e IL-13 (Murphy, 2009; Parham, 2006). El concepto inicial fue que las células Th1 y Th2 representan estados epigenéticos binarios mutuamente excluyentes ya que la IL-12, el IFN- γ y la expresión de T-bet inhiben la diferenciación de Th2, mientras que la IL-4 y el Gata3 antagonizan la polarización hacia Th1. El descubrimiento de células CD4+ que expresan el factor de transcripción FoxP3 (Treg) demostró que la diferenciación de células vírgenes Th0 podía tener otras alternativas y que no todas las células T CD4+ podían ser clasificadas como tipo 1 o tipo 2. Recientemente se han descrito las células Th17 que expresan el factor de transcripción ROR γ t y secretan las citoquinas IL-17^a e IL-17F, o las células Th foliculares que emergieron como un agregado importante al viejo paradigma de dos únicos modos de polarización Th (Zhou et al., 2009).

1.2.2 Perfiles o Fenotipos Inmuno-neuroendócrinos (FINEs).

Recientemente y como producto de diferentes investigaciones se ha propuesto en mamíferos la existencia de perfiles o fenotipos inmunoneuroendócrinos (FINE) (Elenkov et al., 2008; Sternberg and Hill, 1989). Este concepto implica la categorización poblacional en grupos que manifiestan características diferenciales de la interacción INE, como producción de citoquinas inflamatorias, densidad de expresión y actividad de receptores hormonales y niveles de mediadores neuroendócrinos lo cual implicaría distinta actividad en y entre las vías ya descritas previamente. La determinación de FINEs ha sido importante para la comprensión de mecanismos inmunopatogénicos ya que el predominio de algún perfil incrementa el riesgo o la resistencia a diferentes enfermedades infecciosas o autoinmunes. Además, estos perfiles neuroendócrinos estarían asociados a diferencias en la respuesta de estrés que desarrollan las poblaciones (Calogero et al., 1992; Sternberg et al., 1989; Wei et al., 2003; Zelazowski et al., 1992). En mamíferos estos perfiles se han estudiado exhaustivamente en ratas de la especie *Rattus norvegicus* bajo el paradigma LEWIS/FISCHER (cepas LEW / F344), que poseen opuesta susceptibilidad a infecciones, enfermedades autoinmunes y tumores inducidos experimentalmente. Las primeras presentan una respuesta polarizada a Th1 de perfil

claramente inflamatorio, y las segundas presentan una respuesta opuesta poco polarizada a Th1 con menor expresión del componente inflamatorio asociado (Sternberg and Hill, 1989; Sternberg et al., 1989; Tonelli et al., 2003; Wei et al., 2003; Zelazowski et al., 1992). En estas cepas los niveles endógenos basales de la hormona CORT son los que subyacen a la configuración de las demás variables correspondientes a los perfiles definidos en estos animales (Sternberg et al., 1989). El estudio de los perfiles en mamíferos ha ampliado su alcance hacia comienzos del siglo XXI, incluyendo la utilización del humano como modelo animal. En el año 2008 Illia Elenkov y colaboradores publican en *Journal of Immunology* una investigación sobre la existencia de los FINE en *Homo sapiens sapiens* (Elenkov et al., 2008). En su trabajo se establece una relación entre niveles basales de adrenalina y perfiles de citoquinas. Los autores identifican subgrupos de humanos con hipo o hiper actividad adrenal, y asociado a ello perfiles de citoquinas opuestos (TNF- α , IL-12 e IL-10). Si bien la hormona que subyace a las configuraciones de los perfiles no sería la misma, lo importante a destacar es la existencia del fenómeno de los FINE en 2 especies de mamíferos. Independientemente de la configuración final exacta, es posible encontrar en ambas especies subgrupos de animales saludables que manifiestan diferencias en la fisiología de la interacción inmunoneuroendócrina, las cuales llevan a la aparición de diferentes FINEs en la población.

El estudio del sistema inmune en aves ha tenido un gran avance en los últimos años. Muchos aspectos han sido profundizados sobre fisiología y biología de las respuestas inmunes en aves (Adelman and Ardia, 2014; Davison et al., 2011; Juul-Madsen et al., 2014; Oláh et al., 2014; Schultz and Magor, 2014; Toivanen and Toivanen, 1987). De particular importancia para el desarrollo de la presente tesis, ha sido caracterizado el perfil Th1 y la respuesta de fase aguda inflamatoria (Davison et al., 2011; Koutsos and Klasing, 2001). Respecto al perfil Th2, hasta el momento se han caracterizado componentes del mismo como las IL 4, 10 y 13 (Koutsos and Klasing, 2014). Se ha documentado la posibilidad de intercambio de perfiles Th1 a Th2 y viceversa (Davison et al., 2011; Degen et al., 2005). Aún no se han desarrollado estudios tendientes a conocer si se encuentran perfiles inmunoneuroendócrinos en aves ni su distribución poblacional.

1.3 El estrés y su potencial relación con los FINEs.

1.3.1 Estrés.

El estrés es un término comúnmente empleado para describir una serie de fenómenos fisiológicos diversos, que involucran una respuesta adaptativa de un organismo cuando se enfrenta a estímulos o factores que afectan su homeostasis (estresores) (Dohms y Metz, 1991). Aquellos individuos que sobreviven al efecto de los estresores, es decir que se sobreponen a la alteración producida en su homeostasis, se consideran organismos mejor adaptados al ambiente y a la variabilidad presente en el mismo. La respuesta de estrés en vertebrados puede involucrar múltiples cambios en varios sistemas neuroquímicos y endócrinos tales como el opioide (Drugan et al., 2007), el dopaminérgico (Anisman and Zacharko, 1990), el noradrenérgico (Korte et al., 1997), el colinérgico (Anisman et al., 1981), el serotoninérgico (Calogero et al., 1992; Summers, 2002), el GABAérgico (Marin et al., 2002; Martijena et al., 1992) y el eje hipotálamo-pituitario-adrenal (Dantzer, 1991). Si el estrés resulta de carácter perjudicial o no, dependerá principalmente de las interacciones entre, i) las características individuales y las propiedades del estresor, y ii) el sistema nervioso, sistema de órganos periféricos y sistema endócrino (Bohus et al., 1987). Si la intensidad y duración del estresor supera la capacidad de adaptación del individuo el organismo se encontrará en la situación denominada estrés negativo o distrés, el cual puede afectar negativamente el bienestar, salud y desarrollo de los animales (Dantzer, 1991; Jones, 1996; Jones et al., 1999; Marin et al., 2001; Satterlee and Marin, 2004).

La respuesta fisiológica que el estrés involucra puede desencadenar reacciones emocionales que afectan de una u otra forma el comportamiento de las aves. Los estados emocionales que son inducidos por la percepción de un daño real o potencial que amenaza el bienestar del individuo se denominan miedo y ansiedad respectivamente y son inducidos por diversos estresores. El miedo también podría ser definido como el estado o situación en que un animal percibe a un estímulo como una amenaza y en consecuencia genera una respuesta comportamental y/o fisiológica al mismo (Cohen and Harel, 2007). Si bien el comportamiento de miedo ayuda al animal a evitar o reducir las consecuencias de la exposición a un peligro (Cockrem, 2007), el desencadenamiento del

miedo o de la ansiedad inhiben otros sistemas motivacionales y sus comportamientos asociados (Jones, 1989) dando como resultado, una menor habilidad para adaptarse a los cambios ambientales, para interactuar exitosamente con los congéneres, y para utilizar nuevos recursos, aparejando de éste modo numerosos efectos perjudiciales sobre el organismo que incluyen: pérdidas de energía, disminución en el crecimiento, conversión del alimento, producción y calidad y nutrientes de sus huevos; además de un retraso en la maduración, tasa de nacimientos comprometida, desarrollo de picaje de plumas, canibalismo y dolor (Dantzer, 1991; Korte et al., 1997; Lay et al., 2011; Marin and Satterlee, 2004; Rubolini et al., 2005).

Es posible identificar estresores de diversos tipos como por ejemplo físicos (térmicos, químicos, eléctricos, infecciosos, etc), o definidos por la situación (inmovilización, aislamiento social, hacinamiento, presencia de predador, etc). Tal diferenciación posee valor limitado por diversas razones: i), en muchos casos varios estresores son aplicados simultáneamente (por ej. electroshock y aislamiento social); ii), diferentes estresores pueden evocar la misma reacción y así dar como resultado la misma respuesta fisiológica; iii) porque en algunos casos el estresor puede tener una importancia menor que el contexto en el cual fue aplicado (Lyons et al., 1988). Los estresores pueden diferir en su intensidad y duración, pudiendo además clasificarse de acuerdo a la repetición de los eventos estresantes a lo largo del tiempo. De este modo se encuentran los denominados estresores agudos o crónicos, dependiendo de si los animales han sido expuestos una única vez o un mayor número de veces a los estresores (Malisch et al., 2010; Marin et al., 2001; Nazar and Marin, 2011; Siegel, 1980). La exposición repetida a un estresor (estrés crónico) puede resultar en una alteración de la respuesta tanto comportamental como fisiológica al estresor a lo largo del tiempo: puede aumentar en intensidad (sensibilización), disminuir en intensidad (habitación o desensibilización), o puede no ser alterada en el tiempo (Ladewig, 2000). La naturaleza, duración, intensidad y frecuencia de un estímulo estresante puede determinar si predomina la habituación o sensibilización como fenómeno fisiológico-comportamental, o si se produce un balance entre ambos (Grissom and Bhatnagar, 2009; Jones et al., 2000). Por ejemplo, se considera a la habituación inversamente relacionada con la intensidad del estímulo, y positivamente correlacionada con el número (Jones et al., 2000) y frecuencia de las exposiciones (Grissom and Bhatnagar, 2009). La habituación, en vertebrados superiores, también se

extiende a la respuesta del eje HPA, donde la exposición repetida a un estresor progresivamente reduce la respuesta de dicho eje (Grissom and Bhatnagar, 2009; Grissom et al., 2008). Se ha demostrado que la habituación a un tipo de estresor repetido no se extiende a un tipo de estresor diferente (Ladewig, 2000), por ende la habituación tendría la característica de ser “específica” para cada estresor (Kant et al., 1985). Más aún, hay indicios de que la exposición repetida a estresores de baja intensidad podría causar habituación a ese tipo de estresores en particular y sensibilización a otro tipo de estresores (Grissom and Bhatnagar, 2009). Por ejemplo, exposiciones repetidas a un ambiente frío, estrés social, o natación forzada llevaron a una sensibilización de la respuesta del eje HPA a un estrés novel por inmovilización parcial (Akana et al., 1996; Bhatnagar and Dallman, 1998; Bhatnagar and Meaney, 1995; Bhatnagar and Vining, 2003; Grissom et al., 2008).

1.3.2 Sustrato fisiológico de la respuesta de estrés.

En vertebrados superiores se ha caracterizado en profundidad el conjunto de procesos fisiológicos y el sustrato anatómico que subyacen a los diferentes aspectos descritos de la respuesta de estrés (Bhatnagar and Vining, 2003; Carsia and Harvey, 2000; Gartner and Hiatt, 2001; D Hazard et al., 2008; Kuenzel and Jurkevich, 2010; Kuenzel, 2000; Marsh and Scanes, 1994; Scanes, 2009, 2000).

Aves y mamíferos poseen un conjunto de órganos endocrinos similares que incluye el complejo hipotálamo-pituitaria, las gónadas, los islotes pancreáticos, la glándula adrenal, tiroides, paratiroides, y células endócrinas de sistema respiratorio y digestivo. Estas glándulas liberan su contenido al torrente sanguíneo, actuando las hormonas en sitios específicos de los correspondientes órganos blancos. Cada una de ellas ejerce su efecto por medio de la interacción con receptores de superficie o citoplásmicos/nucleares. Además de las “clásicas glándulas endócrinas” mencionadas y sus productos de secreción, también integran este conjunto hormonas producidas por otros órganos como la glándula pineal (melatonina), el hígado (IGF1) y el riñón (renina, eritropoyetina) (Carsia and Harvey, 2000; Gwinner and Hau, 2000; Scanes, 2000).

En referencia al complejo hipotálamo-pituitaria, la glándula pituitaria o hipófisis se encuentra íntimamente conectada con el hipotálamo en la base del encéfalo. Esta glándula tiene una estructura muy compleja y un desarrollo embrionario muy interesante.

Sus tejidos principales pueden ser morfológicamente clasificados como adenohipófisis o neurohipófisis cada uno con distinto origen embrionario (Gartner and Hiatt, 2001; Kuenzel, 2000). La adenohipófisis es un derivado embrionario de la bolsa de Rathke (ectodermo del techo de la boca) y la neurohipófisis es derivada del infundíbulo (crecimiento externo del neuroectodermo). La adenohipofosis en mamíferos incluye la pars distalis, pars tuberalis y pars intermedia (Gartner and Hiatt, 2001). Sin embargo en aves no existe estructura homóloga a la pars intermedia, de este modo la adenohipófisis constituye la glándula pituitaria anterior o pars distalis. La neurohipófisis se conforma de la pars nervosa, el infundíbulo y la eminencia media. La pars distalis aviar produce un conjunto completo de hormonas: gonadotrofinas, tirotrofinas, prolactina, hormona de crecimiento y ACTH (Anne McNabb, 2000; Carsia and Harvey, 2000; Scanes, 2000). La inducción de células de tipo específico involucra la transcripción de factores específicos. El lóbulo anterior de la pituitaria se encuentra muy vascularizado incluyendo el sistema porta hipofisario. Este último provee una ruta para las terminales nerviosas neurosecretoras localizadas en la eminencia media para llegar a la pituitaria anterior. La actividad de la glándula pituitaria anterior es regulada a través de factores de liberación secretados en la eminencia media, los cuales viajan a través de los vasos del sistema porta-hipófiso-hipotalámico. La glándula pituitaria posterior consiste en terminales neurosecretoras que liberan mesotocina o arginina vasopresina. Estas hormonas son sintetizadas en cuerpos celulares en núcleos hipotalámicos y transportadas a la porción posterior de la glándula hipófisis a través de axones neuronales modificados (Kuenzel, 2000).

La biología y fisiología del eje HPA en aves han sido revisadas extensamente (Eraud et al., 2008; D Hazard et al., 2008; Kuenzel and Jurkevich, 2010; Kuenzel, 2000; Lara and Rostagno, 2013; Mumma et al., 2006; Saito et al., 2005; Shini et al., 2010a) así como los mecanismos de activación frente a estresores. La activación de la función adrenocortical (en términos de secreción de CORT) (Mashaly et al., 1993; Mumma et al., 2006; Puvadolpirod and Thaxton, 2000) a través de este eje es mediada principalmente por la hormona ACTH secretada y liberada desde la pituitaria. Como sucede en mamíferos, la ACTH es un péptido de 39 aminoácidos liberado de la pituitaria aviar en respuestas a estrés (Carsia and Harvey, 2000; Mumma et al., 2006; Puvadolpirod and Thaxton, 2000). Hay fuertes evidencias tanto fisiológicas como neuroanatómicas de que la hormona

liberadora de corticotrofina (CRH) es un secretagogo para ACTH. Vale señalar también que la arginina vasopresina (AVP) es un significativo secretagogo de ACTH en algunas especies de aves. La liberación de esta hormona también se encuentra regulada por mecanismos de retroalimentación negativa por hormonas como la somatostatina y otros compuestos como los opioides (Carsia and Harvey, 2000). En gallinas, pavos y gansos no estresados, las concentraciones plasmáticas de ACTH van desde los 20 a 150 pg/ml y pueden alcanzar concentraciones del doble de estos valores ante varios estresores (Carsia and Harvey, 2000; Harvey et al., 1984; Kaiser et al., 2009). Existe una relación entre los niveles plasmáticos de ACTH y de CORT en respuesta al estrés. Más aún, en gallinas, la infusión de ACTH estimula la liberación de CORT dentro de los 5 minutos y de modo dosis dependiente. La CORT y otros glucocorticoides parecen ejercer una influencia por retroalimentación negativa en todos los niveles del eje HPA en aves. Por ejemplo CORT exógena suprime la secreción de CORT basal y foto-estimulada en patos. Del mismo modo la Dexametasona (GC sintético) bloquea la CORT inducida por estrés por ejercicio en gallinas y, por último, niveles elevados de CORT en respuesta a la deprivación de alimento suprimen los niveles de ACTH encontrados en plasma.

1.3.3 Modulación de la respuesta inmune por situaciones de estrés.

Como ya se ha mencionado, a nivel sistémico la respuesta de estrés involucra múltiples cambios de orden neuroquímico y endócrino y obligan al organismo a poner en marcha en poco tiempo una serie de mecanismos fisiológicos que le permitan la mejor respuesta adaptativa de “Lucha o Huida” (Puvadolpirod and Thaxton, 2000; Scanes, 2000; Summers, 2002). Los cambios producidos por el estrés provocan alteraciones en los equilibrios dinámicos apartando al organismo del estado de homeostasis (Dominique Hazard et al., 2008; Matuszewich et al., 2007; Mumma et al., 2006; Puvadolpirod and Thaxton, 2000). Existen numerosas evidencias de que uno los sistemas afectados por el mencionado desequilibrio fisiológico es el sistema inmune, el cual reviste fundamental importancia para resistir y controlar patógenos. Este sistema responde a distintos estímulos tanto externos como endógenos a través de mediadores humorales como las inmunoglobulinas (Ig), IL y quimoquinas, y componentes celulares como los leucocitos (Davison et al., 2011; Lee and Klasing, 2004; Murphy, 2009; Parham, 2006). Como ya se mencionara, durante su activación, se produce la polarización de las respuestas hacia

perfiles predominantemente inflamatorios ricos en citoquinas tipo I como IFN- γ o L-12 o bien, de naturaleza menos inflamatoria y rica en citoquinas de tipo II como IL-4 o IL-10. Esta polarización obedece a señales provenientes de las células presentadoras de antígenos, que en distintos tejidos, promueven selectivamente uno u otro perfil (Davison et al., 2011; De Groote et al., 1992; Mosmann et al., 1986). Un clásico ejemplo de inmunodepresión mediada por estrés en la literatura que refiere a estudios con aves es el que fuera informado por Siegel en el año 1972. Este trabajo muestra que un estresor de tipo social puede exacerbar enfermedades, en particular la enfermedad de Merek (Koutsos and Klasing, 2014). Gallinas fueron mantenidas en un ambiente social estresante al cambiar cada día a un nuevo recinto con lo que la estructura social del grupo debía reacomodarse nuevamente. Estos animales mostraron una mayor incidencia de tumores inducidos por el virus de la enfermedad de Merek que aquellos animales también expuestos al virus pero en condiciones sociales no estresantes, es decir alojados en grupos estables. Para caracterizar aún más este efecto del estrés, se bloqueó la síntesis de CORT a partir de desoxicorticosterona, observando que la incidencia de tumores era menor que cuando la conversión de la hormona no se encontraba bloqueada (Gross and Siegel, 1985; Gross, 1989).

Luego de años de investigación en el área de interacción entre la inmunología y la respuesta de estrés los avances sugieren que ACTH y los GC son inmunosupresores (Koutsos and Klasing, 2014). En pollos domésticos, los implantes de ACTH reducen la inmunidad humoral y la hipersensibilidad demorada a la fitohemaglutinina (PHA) (Mumma et al., 2006). Además, la inducción de ACTH y por ende CORT, generalmente reduce el número de linfocitos (predominantemente B y células NK) y aumenta los números de heterófilos (Dhabhar and McEwen, 1997; Dhabhar et al., 1996). Los GC, predominantemente CORT, inducen apoptosis rápida en linfocitos T y B inmaduros (Lechner et al., 2001). Sin embargo, el nivel de CORT, el tiempo de exposición (corto plazo o largo plazo de exposición) y el tipo de parámetro inmune medido afectan las respuestas de CORT (Dhabhar, 2009; Martin et al., 2005). En general, un aumento inicial de CORT permite una respuesta inmune más robusta, mientras que el aumento crónico de CORT resulta en la inmunosupresión. La elevación de CORT de modo agudo estimula la función de hipersensibilidad demorada (Dhabhar and McEwen, 1997; Martin et al., 2005), altera el metabolismo de proteínas (Klasing, 1998; Kogut and Klasing, 2009), desplaza la

respuesta inmune adaptativa de Th1 a un tipo Th2 (Ligier and Sternberg, 1999) y reduce la proporción de linfocitos de sangre total. En contraste, la elevación de modo crónico de CORT actúa por realimentación negativa para regular la inmunidad suprimiendo las respuestas inmunitarias (Dhabhar and McEwen, 1997; Dhabhar et al., 1995; Mashaly et al., 1998). La administración de CORT crónica reduce el tamaño de la bursa, del timo y la masa del bazo (Dohms and Metz, 1991), aumenta la función de las células NK, suprime las respuestas de anticuerpos primarios y secundarios, suprime la producción de prostaglandinas E2 y la fagocitosis por las células monocíticas adherentes de sangre periférica (Fowler et al., 1983), reduce la linfoproliferación de linfocitos, así como producción de IL-2 y de IFN- γ (Isobe and Lillehoj, 1992).

Otros neuropéptidos y neurotransmisores implicados en la respuesta al estrés, incluyen la serotonina, el péptido intestinal vasoactivo (VIP), la vasopresina y la oxitocina, la ACh y la somatostatina (Dohms and Metz, 1991). Varios factores gastrointestinales, incluyendo colecistoquinina, sustancia P, somatostatina y VIP, generalmente aumentan los parámetros inmunológicos locales, incluyendo la linfoproliferación de linfocitos de la mucosa y la producción de anticuerpos, la quimiotaxis de monocitos y actividad intraepitelial de células NK (Bienenstock et al., 1989). La base para efectos reguladores está relacionada con acciones directas sobre los leucocitos, ya que poseen los receptores de estas en sus membranas plasmáticas (Bienenstock et al., 1989).

El mecanismo de acción a través del cual se produce la inmunodepresión mencionada en los ejemplos anteriores se encuentra relacionado a los efectos de las hormonas liberadas, cuando sus concentraciones son elevadas y sostenidas en el tiempo como sucede en los casos de estresores de tipo crónico (principalmente CORT) (Calandreau et al., 2011; Dhabhar and McEwen, 1997; Korte et al., 1997; Shini et al., 2009). La corticosterona posee receptores citoplásmicos y al ser un derivado esteroideo atraviesa las membranas celulares para unirse al mismo en el citoplasma. A continuación el complejo hormona-receptor es translocado al núcleo donde cumplirá su función a nivel de los genes de respuesta a glucocorticoides (GRGC). Los GRGC son aquellos cuya transcripción y posterior traducción se encuentra regulada en alguno de sus pasos por GC (Kaiser et al., 2009; Mumma et al., 2006; Shini et al., 2010a). NF- κ B es un factor de transcripción que induce la síntesis de ARNm correspondiente a varios genes responsables de la activación y respuesta inmunológica (TNF- α , IL-2, IFN- β , etc) (Li and

Verma, 2002). A nivel citoplásmico el factor de transcripción se encuentra unido a su represor I κ -B, y de esta manera el complejo se encuentra inactivo. La activación de NF- κ B se da por la fosforilación, ubiquitinización o proteólisis de I κ -B, la cual esta mediada por acción de enzimas inducibles por diferentes situaciones que requieren una respuesta por parte del sistema inmune (presencia de virus, bacteria, parásito, daño tisular, etc) (Vallabhapurapu and Karin, 2009). El gen que codifica para I κ -B es un GRGC y la activación del mismo induce un incremento del represor a nivel del citoplasma celular (Vallabhapurapu and Karin, 2009; Wang et al., 2002). El estrés de tipo crónico induce una producción elevada y sostenida de GC. Frente a la situación mencionada los GRGC como el correspondiente a I κ -B incrementan la transcripción y traducción subsiguiente del correspondiente ARNm en proteínas. A nivel celular entonces, todo el NF- κ B se encuentra unido a su represor e inactivado. Las concentraciones de I κ -B superan ampliamente las concentraciones de NF- κ B por lo que la activación de mediadores de respuesta inmune se encuentra imposibilitada, manifestándose esto en la mencionada inmunodepresión inducida por estrés crónico. Se ha descrito el modelo clásico de acción de GC sobre el sistema inmune. Sin embargo, existen otros 2 modelos que también explican la modulación inmune mediada por GC que no serían necesariamente excluyentes (Padgett and Glaser, 2003). El segundo modelo propone una interacción entre GC y NF- κ B que tendría como resultado la inhibición de genes. Esto se daría a través de la unión de GC o de su receptor activado con NF- κ B, inhabilitando su translocación al núcleo (Adcock and Caramori, 2001; Hofmann and Schmitz, 2002; Schaaf and Cidlowski, 2002). El tercer y último modelo plantea una inhibición de NF- κ B por competencia por cofactores limitantes (De Bosscher et al., 2000).

Los FINEs se definen, como ya se ha mencionado, en base a interacciones entre variables correspondientes a los sistemas inmune nervioso y endócrino. Teniendo en cuenta entonces la descripción y caracterización realizada de los efectos que las respuestas de estrés tienen sobre los diferentes parámetros de respuesta en el contexto de las interacciones INE, es posible pensar que estos efectos se vean traducidos de una u otra forma en la configuración final de los FINEs, ya sea en la configuración de los perfiles, en la cantidad de individuos que los expresen, etc.

2. Hipótesis y predicciones.

Considerando el conjunto de antecedentes teóricos presentado se plantean las siguientes hipótesis de trabajo:

- El conjunto de procesos fisiológicos compartidos entre vertebrados superiores como aves y mamíferos también incluye la biología de la interacción INE, por ende existirían patrones comunes de parámetros INE cuyo funcionamiento se articula en esta interfaz.
- Considerando que la respuesta de estrés desde el punto de vista evolutivo tiene como primer objetivo la conservación de la especie (e individualmente la conservación de la homeostasis), una situación de estrés crónico modularía las interacciones INE en aves de la especie *Coturnix coturnix* y *Gallus gallus*.

Predicciones derivadas.

- La interacción INE en aves de las especies *Coturnix coturnix* y *Gallus gallus* determinará la existencia de arreglos inmunoneuroendócrinos comparables a los fenotipos descritos para mamíferos.
- El estrés de tipo crónico poseerá efectos sobre las variables que integran la interfaz INE, por ende modificará la expresión de los mismos, en primera instancia a nivel individual y por ende en una segunda instancia a nivel poblacional en aves de las especies *Coturnix coturnix* y *Gallus gallus*.

3. Objetivos.

En base al marco teórico desarrollado se plantean el siguiente objetivo general y los siguientes objetivos específicos:

3.1 Objetivo general.

El estudio del sistema inmunoneuroendócrino (INE) en aves y en particular en relación a las respuestas de estrés tiene una gran relevancia desde diversos puntos de vista: biológico, evolutivo, sanitario e incluso a nivel comercial (principalmente en el caso de las aves de granja). Este proyecto presenta como **objetivo general** el contribuir al conocimiento sobre la potencial existencia de fenotipos inmunoneuroendócrinos y su relación con el estado de estrés en aves, empleando como modelo animal 2 especies de aves que difieren notablemente en su grado de domesticación: *Coturnix coturnix* (codorniz) y *Gallus gallus* (gallina).

3.2 Objetivos específicos.

- Estudiar la interrelación entre componentes del sistema INE en *Coturnix coturnix* y evaluar si pueden determinarse fenotipos INE y cuál es su distribución a nivel poblacional.
- Analizar si un estrés crónico variado e impredecible puede modular la expresión y/o distribución de fenotipos en *Coturnix coturnix* favoreciendo algún tipo particular de perfil fenotípico.
- Estudiar la interrelación entre componentes del sistema INE en *Gallus gallus* y evaluar si pueden determinarse fenotipos INE de características comparables a los observados en *Coturnix coturnix*.
- Analizar si un estrés crónico social puede modular la expresión y/o distribución de fenotipos en *Gallus gallus* y, de existir, analizar si esta modulación puede ser comparable a la observada en *Coturnix coturnix*.
- Realizar una valoración teórica sobre la existencia de una potencial correspondencia o patrón en la expresión de FINEs entre mamíferos (*Ratus norvegicus* y *Homo sapiens sapiens*) y aves (*Coturnix coturnix* y *Gallus gallus*) y sus potenciales implicancias evolutivas.

Las secciones del manuscrito corresponden cada una a un objetivo específico. A modo de cierre se presenta una sección final titulada Discusión y Conclusiones Generales donde se exponen las construcciones teóricas derivadas de la presente Tesis Doctoral consideradas de mayor relevancia.

4. Materiales y Métodos Generales.

4.1 Modelos animales.

En la presente tesis se trabajó con 2 especies de aves de granja diferentes: *Gallus gallus* (gallina) y *Coturnix coturnix* (codorniz). Ambas especies poseen diferente grado de domesticación y en el caso de la gallina no solo ha sido domesticada durante más tiempo que la codorniz sino que además durante los últimos 60 años ha sido sometida a un intenso proceso de selección genética (reproducción selectiva) dirigida a obtener aves que produzcan un mayor número de huevos y más grandes a lo largo de su vida y con el mínimo aporte de alimento posible (tasa de conversión de alimento optimizada). Ambas especies son modelos históricamente reconocidos en estudios de fisiología, productividad y bienestar de aves de granja (Baumgartner, 1994; Huss et al., 2008; Jones, 1996; Puvadolpirod and Thaxton, 2000; Reese and Reese, 1962).

4.1.1 *Coturnix coturnix*.

Los estudios que se desarrollaron en aves de la especie *Coturnix coturnix* comparten los procedimientos de cría y mantenimiento de los animales hasta el momento de la determinación del FINE o hasta los protocolos de estrés o manipulación correspondiente para el objetivo que se intenta abordar con el experimento en cuestión. Estas manipulaciones diferenciales serán explicadas en detalle cuando corresponda.

Las aves se criaron en el laboratorio de ciencia avícola de la Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales – Universidad Nacional de Córdoba, siguiendo procedimientos de rutina (Guzman et al., 2009; Lábaque et al., 2008; Marin and Satterlee, 2004; Nazar and Marin, 2011; Nazar et al., 2012; Satterlee and Marin, 2004). Inmediatamente luego del nacimiento los pichones fueron marcados con anillos de colores numerados en su pata derecha para asegurar su identificación y posibilitar su seguimiento. Las aves fueron alojadas al azar en habitáculos de cría de 90 x 90 x 60 cm (largo x ancho x alto). Cada habitáculo disponía de un piso de malla de alambre (1 cm. de lado de rejilla) elevado 5 cm. del piso para permitir el pasaje de las excretas. Permanecieron en estas cajas hasta la edad de traslado a jaulas de adultos a las 5 semanas de vida. El ciclo de luz-oscuridad empleado en toda la cría fue de 14 horas de luz y 10 de oscuridad. Las luces se encendieron a las 06:00 horas. El manejo de la temperatura se realizó de acuerdo al método descrito por Shanaway (1994) y Marin y Satterlee (2004) donde se practica un

descenso gradual de la temperatura de aproximadamente 3°C semanales desde los 37°C aplicados al momento del nacimiento hasta alcanzar una temperatura ambiente de aproximadamente 25°C a los 28 días de edad. Esta temperatura se mantuvo hasta la finalización del estudio. La humedad relativa ambiente registrada osciló entre el 50 y 60%. El agua y el alimento balanceado para codornices fueron provistos libremente empleando un comedero que abarca todo el frente de cada caja de cría y 16 bebederos automáticos de tipo “niple” por caja. La composición del alimento fue de 20% (como mínimo) de proteínas crudas y un rendimiento energético de 2.900 Kcal/kg. A los 35 días de edad las aves fueron alojadas en parejas de un macho y una hembra en jaulas de 39 x 19 x 25 cm (fondo x frente x alto, respectivamente). En estas jaulas se mantuvieron las mismas condiciones de mantenimiento, es decir: el mismo ciclo de luz oscuridad, nivel de humedad, acceso a agua y comida *ad libitum* también. Para continuar con la correcta identificación de cada animal, a las 8 semanas de edad las bandas que fueron colocadas en las patas se reemplazaron por bandas alares numeradas.

Los animales se mantuvieron en las condiciones descritas hasta las pruebas experimentales correspondientes. Una vez por semana se desarrollaron contactos neutros con las aves, los cuales consistieron en la aproximación del experimentador a los mismos sin hacer ninguna práctica en particular, promoviendo de este modo una habituación de los animales a la presencia del experimentador.

4.1.2 *Gallus gallus*.

El trabajo experimental desarrollado con la especie *Gallus gallus* se realizó durante una pasantía de trabajo en el Departamento de Producción Animal del Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario “Neiker-Tecnalia” (Vitoria-Gasteiz) y dentro del marco de colaboración entre la Dra. Inma Estévez (Investigación Ikerbasque y Directora de la Unidad de Comportamiento y Bienestar Avícola) y el Dr. Raúl H. Marín (Profesor visitante Ikerbasque) bajo el proyecto Modelay AGL2010-18276 MICINN. El proyecto Modelay tenía como objetivos centrales el estudio de los efectos conjuntos de la apariencia fenotípica y el tamaño de grupo sobre variables productivas, comportamentales y en el marco de esta tesis se evaluaron además variables inmuno-endócrinas (ver más abajo). Se estudiaron aves de la estirpe comercial Hy-line Brown que ha sido seleccionada para maximizar la ovipostura de huevos a lo largo de su vida (gallinas ponedoras) (Hy-Line,

2014). Los pichones fueron adquiridos con un día de edad de la incubadora Avigán Terralta S. L. (Tarragona, España). El estudio se llevó a cabo en la granja para avicultura del centro de investigación Neiker-Tecnalia situado en el parque tecnológico de Arkaute (Vitoria-Gasteiz, España). Las aves fueron alojadas y mantenidas en una nave experimental de 320 m² con comederos y bebederos automatizados. Mediante control automatizado por computadora se regulaban la carga y provisión de alimento, la ventilación y la temperatura de la nave. La nave experimental estaba subdividida en 50 recintos. Se emplearon recintos de dos tamaños diferentes de acuerdo al número de individuos que componía los grupos experimentales (10 o 40, ver detalles más abajo). Los recintos para 10 individuos median 0,75 x 1,78 m (1,25m²), frente y fondo respectivamente y los de 40 2,0 y 2,50 m (5m²). En ambos casos la densidad de las aves fue mantenida en 8 hembras/m². Las paredes de los recintos estaban construidas a base de tubos de PVC y malla plástica y adicionalmente se colocó un plástico negro de 1m de altura que cubría la malla que dividía los recintos a los efectos de evitar el contacto visual entre individuos de las diferentes replicas y/o tratamientos. El suelo estaba cubierto con cama de viruta desinfectada (a razón de aprox. 3kg/m²). Los animales tuvieron acceso *ad libitum* a agua y alimento comercial de acuerdo con la fase de crecimiento en que se encontraron y siguiendo lineamientos generales establecidos en los protocolos estándar de cría presentados en el manual de la empresa proveedora (Hy-Line, 2014). El espacio en comedero fue de 4 cm² de comedero circular por individuo. De acuerdo con la legislación española también se dispuso de por lo menos 1 bebedero para cada 7 aves y área destinada a nido

Como ya se mencionara, los experimentos en gallinas se desarrollaron en el marco general del proyecto que evaluaba los efectos conjuntos de la apariencia fenotípica y el tamaño de grupo sobre diversas variables de desempeño productivo y comportamentales. A continuación se explican algunos términos y/o procedimientos que ayudarán luego a comprender mejor la experiencia realizada.

- *Apariencia Fenotípica.* Al nacimiento las aves eran todas de coloración homogénea marrón y aparentemente indistinguibles entre ellas (fenotipo original). Luego de llegadas a la granja, el fenotipo de algunas aves fue modificado mediante el desarrollo de una coloración conspicua negra (marca) en la parte posterior de la cabeza. De este modo quedaron aves con fenotipo “no marcado” y otras con fenotipo “marcado”. La

marca se realizó mediante el teñido de las plumas con tintura de cabello no tóxica (Dennis et al., 2008). Se usó la misma tintura para todos los animales marcados y una plantilla con el fin de que todas las marcas fueran iguales. Mediante el marcado de los animales se conformaron grupos sociales de composición fenotípica diferentes:

Grupos homogéneos. Todos los individuos que conformaban el grupo tenían el mismo fenotipo: grupos con el 100% de los individuos “marcados” y grupos con el 100% de los individuos “no marcados”.

Grupos heterogéneos. Donde el porcentaje de integrantes del grupo que presentaban marcas era el 25%, 50% y 75%.

- *Tamaño de grupo.* Se formaron grupos de aves de 2 tamaños diferentes: 10 y 40 gallinas.

Se estudiaron 3 réplicas de grupos sociales que combinaban los tamaños de grupo (10 y 40) y las diversas apariencias fenotípicas (0, 25, 50, 75 o 100% marcados). De esta manera se estudiaron en conjunto un total de 30 grupos (750 animales en estudio). Las aves fueron asignadas al azar a cada uno de los 30 recintos el día de la llegada a la granja y permanecieron en los mismos recintos hasta el fin de la experiencia.

Cabe destacar que para la realización de los estudios de FINE se estudiaron 6 animales pertenecientes a los grupos homogéneos totalizando 72 animales.

4.2 Definición de la manera de aproximación al estudio de FINEs en aves.

Para poder cumplir con cualquiera de los objetivos mencionados fue primero necesario determinar el modo en el que evaluaría la existencia y posteriormente se caracterizaría el FINE en las aves. Como ya se mencionara en la introducción del presente trabajo, estos fenotipos se encuentran ya estudiados en mamíferos. Intentando mantener una visión amplia y, a la vez, teniendo en cuenta que los informados en la presente Tesis son los primeros trabajos orientados a develar aspectos concernientes a FINEs, se seleccionaron diferentes variables representativas de la interacción INE. A continuación

se describirán los parámetros empleados para la determinación de FINEs y la información brindada por cada uno de ellos:

Hormonales.

- **Cuantificación de CORT plasmática:** empleando métodos de radio-inmunoensayo empleados en aves (Dehnhard et al., 2003; Lèche et al., 2009) se brindará información sobre el eje integrador por excelencia en la INE: el HPA. Analizada en nanogramos de hormona por ml de plasma (ng/ml).

Efectores de la INE.

- **Recuento leucocitario en extendido de sangre:** con una gota de sangre se realiza un extendido que es teñido y analizado al microscopio óptico para conocer proporciones de cada población celular (Fair et al., 1999; Nazar and Marin, 2011). Para el procesamiento de esta variable se realizó un cociente entre células de la inmunidad innata y células de la inmunidad adquirida y de esta manera se resumió la información de 5 variables en un único valor.

- **Titulación de anticuerpos específicos contra glóbulos rojos de oveja (Ac GRO):** una semana antes de tomar las muestras de sangre, los animales son inyectados intraperitonealmente con una suspensión de GRO en buffer fosfato salino (PBS) y el día de la extracción de sangre se cuantifica en suero la respuesta humoral específica (Nazar and Marin, 2011; Sever, 1962; Smits and Baos, 2005). Analizada con el Log2 del título de Ac.

- **Análisis de linfoproliferación celular:** análisis con fitohemaglutinina-P (PHA-P), se practica una inyección de PHA-P en la membrana alar y a las 24 horas se mide el diámetro de la induración inducida (Nazar and Marin, 2011; Nazar et al., 2012; Salaberria et al., 2013). Analizada como porcentaje (%) de cambio.

- **Citometría de flujo:** recuento de células de sangre periférica utilizando el colorante lipofílico fluorescente dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC6; Molecular Probes, (Uchiyama et al., 2005)).

Mediadores de la INE.

- **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real para citoquinas pro- y anti-inflamatorias:** utilizado para cuantificar la producción de ARNm de una citoquina representativa de cada perfil, en células mononucleadas de sangre periférica. Esta técnica fue empleada para determinación de niveles de mediadores en aves de la especie *Coturnix coturnix* (Uno et al., 2012). Relativizada a expresión de un control interno: β -Actina.

- **Ensayo por inmuno-adsorción ligado a enzimas (ELISA):** para cuantificación de citoquinas pro y anti-inflamatorias en plasma de aves de la especie *Gallus gallus*. Analizada como picogramos de mediador por ml de plasma (pg/ml). La elección de esta metodología para la especie en cuestión responde a motivos de disponibilidad de reactivos. Los desarrollos tecnológicos y de investigación aún no han puesto en disponibilidad los kit ELISA para citoquinas en codornices.

Mediante el análisis conjunto de estos parámetros se buscó alcanzar una visión general del FINE de los animales, y ésta manera aproximarse al concepto ya establecido para mamíferos. Cabe destacar que los parámetros propuestos en su mayoría corresponden a pruebas desarrolladas de modo rutinario en mamíferos, por lo que para poder cumplir cualquiera de los objetivos propuestos previamente fue necesaria la puesta a punto de estas técnicas en los modelos animales que son objeto de la presente tesis.

4.3 Manipulación del animal para determinación de su FINE.

De modo independiente al número de animales con el que se haya trabajado a lo largo de los diferentes experimentos incluidos en la presente tesis, la metodología para conocer el FINE de cada ave fue siempre la misma, por lo que se la describirá a continuación.

La manipulación de los animales consistió en 3 días no consecutivos de manejo. El día 1 se induce la producción de Ac contra GRO mediante la inyección intraperitoneal a cada animal de 0,5 ml de una suspensión de GRO al 10 %. El mismo día se inyecta de forma intradérmica en la zona periférica a la vena braquial 0,05 ml de una solución de 1 mg/ml PHA-P para inducir linfoproliferación *in vivo*. El día 2 (24 hs. después de la inyección de PHA-P) se realiza un análisis de la linfoproliferación *in vivo* inducida por la

inyección de la lectina. El día 3 tiene lugar 7 días después del día 1 y es cuando se realiza la extracción de sangre por punción de la vena braquial para desarrollar las pruebas restantes en el siguiente orden: extendidos de sangre, citometría de flujo, aislamiento de glóbulos blancos para posterior aislamiento de ARN, transcripción reversa y PCR; y, finalmente, centrifugación para obtención de suero y separación del mismo para titulación y cuantificación de CORT. Cuando el modelo animal empleado fue el de aves de la especie *Gallus gallus*, las cuantificaciones de mediadores pro y anti-inflamatorios se realizaron mediante ELISAs en lugar de emplear metodologías de manipulación de ácidos nucleicos.

4.4 Técnicas empleadas y su puesta a punto.

4.4.1 Cuantificación de Corticosterona, IFN- γ e IL-4 en *Gallus gallus*.

A partir de plasma obtenido de la extracción de sangre de las aves se determinaron los niveles de CORT, IFN- γ e IL-4 mediante el uso de kits comprados con tal fin y siguiendo los procedimientos detallados por los proveedores.

Para determinar CORT se empleó un enzimo-inmunoensayo competitivo (ENZO Life Sciences). El kit emplea anticuerpos policlonales contra CORT para unir de modo competitivo la hormona presente en una muestra dada (o estándares) y en el competidor del kit (fosfatasa alcalina unida a CORT). Luego de una incubación simultánea de la muestra con el competidor se lavó y se adicionó el sustrato de la enzima. Luego de detener la reacción se leyó la densidad óptica (DO) a 405nm. El valor de DO es entonces inversamente proporcional la concentración de CORT en la muestra.

Ambas citoquinas fueron también cuantificadas en plasma mediante un ELISA sándwich para determinación de IL-4 e IFN- γ en suero, plasma, homogenatos celulares, sobrenadantes de cultivos y otros fluidos biológicos de aves de la especie *Gallus gallus* (USCN Life Science Inc.). En este caso se emplearon placas multi-pocillo tapizadas con anticuerpos monoclonales específicos contra las moléculas de interés, a los cuales se agregó la muestra o estándares. Mediante la reacción de Avidina-HRP con su sustrato se determinó la concentración de las muestras por interpolación en la curva generada a partir de los estándares.

4.4.2 RIA para cuantificación de CORT en *Coturnix coturnix*.

Para la determinación de esta hormona en plasma se realizó una extracción de esteroides con éter etílico. Luego de la evaporación del solvente se empleó un radioinmunoensayo enzimático desarrollado para galliformes. Se siguieron procedimientos de rutina en el Instituto de fisiología, patofisiología y biofísica de Vienna, Austria (Palme et al., 2005; Rettenbacher et al., 2004).

4.4.3 Recuento leucocitario en extendido de sangre.

Se colocó una gota de sangre total sobre un portaobjetos y con un extensor se realizó el frotis. A continuación, todos los extendidos celulares realizados se fijaron y tiñeron con May-Grunwald Giemsa, para luego a partir de su observación en microscopio óptico analizar la fórmula leucocitaria mediante recuento de leucocitos identificando linfocitos, basófilos, heterófilos, eosinófilos y monocitos, recorriendo campos ópticos hasta lograr contar un número total de 100 células por individuo.

4.4.4 Titulación de anticuerpos específicos contra glóbulos rojos de oveja (Ac GRO).

Se les administró a las aves una inyección intraperitoneal de un antígeno inmunógeno no patogénico (suspensión al 10% GRO en PBS) para estimular la producción policlonal de inmunoglobulinas contra el antígeno particulado. A la semana de inyectada la suspensión se realizó la extracción de sangre correspondiente para determinar por titulación de manera semi-cuantitativa la respuesta de las aves.

4.4.5 Linfoproliferación celular.

Se realizó una inyección de 0,075 ml de una solución de PHA-P al 10% en la zona periférica a la vena braquial del ala derecha para analizar inmunidad celular. El calibre de la zona inyectada se midió con micrómetro inmediatamente después a la inyección y luego a las 24 horas para poder hacer el análisis de hipersensibilidad demorada (Nazar and Marin, 2011; Stadecker and Lukic, 1977) donde se determina el porcentaje de inflamación producido por los mecanismos vasodilatadores y reclutadores de células implicados en la respuesta al mitógeno inyectado.

4.4.6 Citometría de Flujo.

La metodología de citometría fue empleada en el caso de *Coturnix coturnix* como animal modelo. Para realizar citometría de flujo en sangre de animales no mamíferos es necesario diferenciar eritrocitos de leucocitos, teniendo en cuenta el carácter nucleado de todas las células circulantes en la sangre.

Siguiendo protocolos desarrollados previamente (Uchiyama et al., 2005) se extrajo 1 ml de sangre a 2 animales de diferente sexo, impidiendo la coagulación de la misma con EDTA. 25 mg de 3,3'-Dipentylloxacarbocyanine iodide (DiOC5, Sigma-Aldrich) se diluyeron en 50 ml de etanol 100% para preparar una solución madre 500 µg/ml del colorante. Este colorante catiónico lipofílico se une específicamente a sistemas de endomembranas, preferentemente a las membranas del retículo endoplásmico. En este fenómeno se basa la posibilidad de separar leucocitos de eritrocitos por su contenido de endomembranas y tamaño celular. Se tomaron 10 µl de sangre total y se colocaron en tubos con diferente volumen de PBS para lograr diferentes diluciones del colorante. El volumen total de los tubos siempre fue de 2000 µl. La composición de los tubos puede apreciarse en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1: Contenido (composición y volumen) de los diferentes tubos utilizados en la puesta a punto de la citometría de flujo de sangre de codornices.

REACTIVO	TUBO 1	TUBO 2	TUBO 3
Sangre total	10 µl	10 µl	10 µl
Colorante (DiOC5)	50 µl	40 µl	30 µl
Buffer	1940 µl	1950 µl	1960 µl
Total	2000 µl	2000 µl	2000 µl

Cada tubo se realizó por duplicado por animal, más un tubo blanco por cada animal conteniendo sangre (10 µl) y PBS (1990 µl) únicamente. De este modo, se realizaron un total de 14 tubos. El colorante se colocó en una dilución 1/10 de la solución madre. Todos los tubos fueron incubados a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego se analizaron. Se observó que la concentración del colorante era muy elevada. Con el fin de encontrar una concentración más apropiada de DiOC5, se realizaron 4 tubos más

(2 por animal) agregando el colorante en una dilución 1:100 y 1:1000 de la solución madre.

Nuevamente los tubos se incubaron y se analizaron en 2 instancias, variando únicamente el número de eventos adquiridos. En una primera instancia se adquirieron 50000 eventos y luego se adquirieron 100000 eventos, completando de esta manera 8 pruebas más. Vale aclarar que los resultados de los gráficos obtenidos durante la puesta a punto de la citometría fueron comparados con datos obtenidos a partir de extendidos de sangre realizados con las mismas muestras. Se determinó como confiable una diferencia menor a un 10 % en los valores de ambas técnicas expresados en porcentajes.

La utilización de esta técnica permitió diferenciar porcentualmente las poblaciones celulares de glóbulos blancos en las aves de este estudio. Luego de la puesta a punto y al momento de analizar los gráficos se utilizó el siguiente cociente: $(\%Linfocitos + \%Monocitos) / (\%Granulocitos)$. Este cociente representa la frecuencia de la distribución leucocitaria (FDL). Esto permite resumir los datos del análisis de citometría en un solo valor representativo de todo el estudio para no agregar al modelo 4 variables.

En la Figura 4.1 se puede apreciar un gráfico de puntos representativo del estudio de citometría de flujo. En el gráfico se han señalado las poblaciones mencionadas previamente, las cuales fueron delimitadas mediante la utilización de diferentes modos de visualización en el programa Flow-Jo.

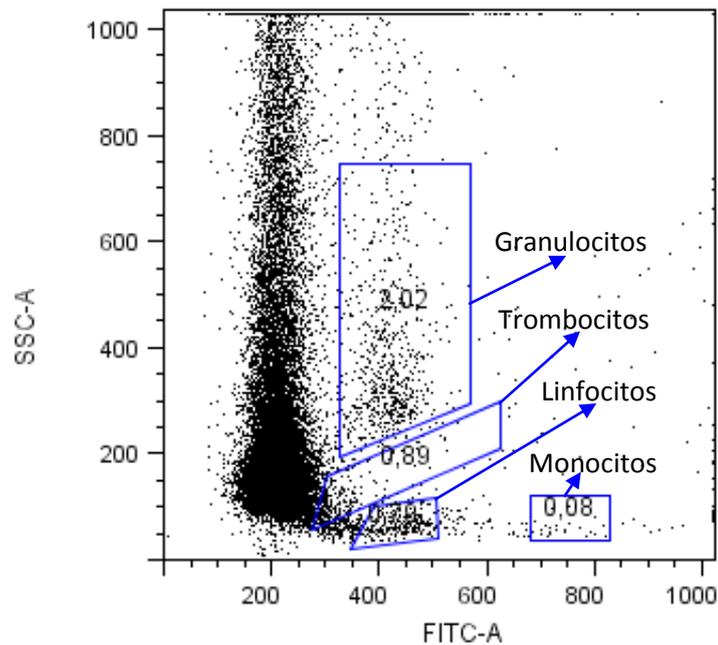


Figura 4.1: Gráfico de puntos (“Dot plot”) obtenido a partir de la realización de una citometría de flujo en codornices. En el gráfico se indican las subpoblaciones leucocitarias detectadas con la técnica en base a lo desarrollado por (Uchiyama et al., 2005).

4.4.7 Análisis de material genético.

Para realizar análisis de mediadores moleculares se optó por la técnica PCR. Para realizar esta técnica es necesario partir de ADN como reactivo principal en la reacción. Esto es independiente del tipo de PCR que se vaya a realizar: convencional o en tiempo real. Lo primero a realizar fue la puesta a punto de la obtención del material genético. Esto se realizó mediante el aislamiento de poblaciones específicas de glóbulos blancos, la posterior extracción de ARN citoplásmico y la transcripción reversa del mismo para obtener ADN.

4.4.7.1 Aislamiento de Glóbulos Blancos.

El aislamiento de células mononucleares, monocitos y linfocitos más específicamente, se desarrolló de acuerdo a protocolos ya establecidos (Shini and Kaiser, 2009) mediante un gradiente de centrifugación en Histopaque 1077. Una alícuota de 0,5 ml de sangre total se diluyó con el mismo volumen de PBS, se colocaron lentamente en 1 ml de Histopaque 1077 y se centrifugó durante 30 minutos a 1200g. Finalizada la centrifugación se tomaron las células de la interfaz visible en el tubo, se colocaron en un tubo universal y se suspendieron en 10 ml de PBS. Esta misma muestra de células re-

suspendidas se centrifugó nuevamente a 1200g durante 10 minutos a 4°C. Las células se contaron en cámara de Neubauer y se ajustaron a una concentración de 10×10^7 células por ml. Se agregó 1 ml de Trizol por muestra para inducir lisis de las membranas celulares.

4.4.7.2 Extracción de RNA.

A partir del material celular tratado con Trizol, se procedió a una centrifugación a 12000 g durante 10 minutos y el sobrenadante se colocó en un tubo “eppendorf” nuevo. De esta manera en esta primera centrifugación se eliminan en el precipitado mucus, grasas, membranas y polisacáridos.

A continuación se agregaron 200 µl de cloroformo por ml de Trizol. Se taparon los tubos “eppendorf” y se los agitó a mano durante 15 segundos. Se dejaron reposar los tubos a temperatura ambiente durante 3 minutos y luego nuevamente se centrifugaron durante 10 minutos a 12000 g. De esta manera luego del centrifugado se observan en el tubo 3 capas. La primera capa (donde se ubica el ARN) se trasvasó a tubos nuevos agregando ahora 500 µl de alcohol isopropílico por ml de Trizol utilizado. Se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos y luego se centrifugo nuevamente por 10 minutos a 12000 g.

El sobrenadante se extrajo y se descartó, luego se agregó 1 ml de etanol 75% frío por ml de Trizol, se mezcló con vortex y se centrifugó a 7500 g por 5 minutos. Por último se quitó el sobrenadante y se dejó secar al aire por 5 a 10 minutos. Se agregaron 50 µl de agua libre de ribonucleasas y se colocó en baño a 55-60°C por 10 minutos.

4.4.7.3 Transcripción Reversa (RT).

Aproximadamente 1 µg de ARN total se transcribió en un volumen de reacción final igual a 20 µl, donde estaban contenidos los siguientes componentes: 7X DNA wipeout buffer, 5X buffer de transcripción reversa, transcriptasa reversa, agua libre de ribonucleasas en volumen necesario para completar los 20 µl de volumen final. El material genético obtenido se almacenó a -80°C hasta su uso en la reacción en cadena de la polimerasa.

4.4.7.4 Amplificación de material genético.

4.4.7.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa (convencional).

Para poder amplificar el ADN obtenido luego de la transcripción reversa fue necesario diseñar cebadores para las secuencias de interés. En la literatura se encontraron solamente las secuencias para la amplificación de la citoquinas antiinflamatorias: IL-13 e IL-4 (Degen et al., 2005). Las secuencias para la amplificación de las 2 citoquinas pro-inflamatorias y del control utilizado (IFN- γ , IL-1 β y β -actina respectivamente) fueron diseñadas utilizando programas de acceso libre en Internet.

- que la temperatura de “melting” se encuentre alrededor de los 60°C (\pm 2°C), no diferenciándose la temperatura del par de cebadores en más de 1 °C.
- que el par de cebadores no forme hetero-dímeros (que el ΔG° de formación de los hetero-dímeros sea lo más cercano a 0 posible, buscando de esta forma evitar la espontaneidad del proceso).
 - que el ΔG° de formación de los homo-dímeros sea lo más cercano a 0 posible.
 - que el segmento a amplificar tenga una extensión aproximada de 130pb.

Una vez definidas las diferentes secuencias de cebadores a utilizar y luego de encargar su síntesis (Sigma-Aldrich) se prosiguió con la puesta a punto de las PRCs de modo de establecer los diferentes parámetros en la reacción. Para la puesta a punto de cualquier PCR se deben establecer 3 factores:

1. en una primera etapa es necesario determinar la cantidad adecuada de cebadores correspondientes a la secuencia a utilizar, la cantidad del ion Mg^{++} y la cantidad de producto de la reacción de transcripción reversa.
2. en segunda instancia se debe determinar la temperatura óptima de “annealing” de la reacción.
3. por último se debe establecer el número óptimo de ciclos de amplificación a realizar antes de detener la reacción.

A continuación se describe lo previamente detallado para cada secuencia a amplificar en la presente tesis, si bien sólo se describirá a modo de ejemplo la determinación de parámetros en β -actina. Vale aclarar que en todos los casos se siguió la misma metodología: se determinaron las condiciones de reacción, se prepararon las muestras, se colocaron en termociclador, se corrieron las muestras una vez finalizadas las

PCRs en geles de agarosa al 2%, se fotografiaron los geles en trans-iluminador UV y se tomaron las decisiones respecto de cómo proseguir en la puesta a punto, basados en criterios acordes a cada situación:

β -actina.

Para determinar las cantidades de cebadores, Mg^{++} y producto de RT se prepararon “eppendorfs” con diferentes concentraciones de cada reactivo siguiendo la Tabla 4.2.

Tabla 4.2: Contenido (composición y volumen) de los diferentes tubos utilizados en la puesta a punto de PCR convencional de β -actina.

	TUBO 1	TUBO 2	TUBO 3	TUBO 4	TUBO 5	TUBO 6	TUBO 7	TUBO 8
RT	1	1	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5
Mg^{++}	0,75	0,75	1	1	0,75	0,75	1	1
Cebadores								
S + AS	1	2,5	1	2,5	1	2,5	1	2,5

RT: producto de reacción de transcripción reversa. Mg^{++} : ión magnesio. S + AS: sentido + antisentido.

Al preparar las mezclas de reacción, las cantidades de dNTPs, buffer y enzima Taq son las mismas para todas las condiciones descritas en la tabla (0,5, 2,5 y 0,13 μ l respectivamente). El volumen total de la reacción es de 25 μ l, por lo que se calculó y se agregó el volumen necesario de agua para PCR libre de ribonucleasas. Se programó el termociclador para realizar el siguiente esquema de tiempos y temperaturas:

1º: 5 minutos a 95°C.

2º: 40 ciclos de 3 minutos (1 minuto a 95°C, 1 minuto a 50 °C y 1 minuto a 72°C).

3º: 5 minutos a 72°C.

Luego de finalizada la secuencia programada se preparó un gel de agarosa al 2% con el marcador sybr green para correr las muestras por electroforesis. Se efectuaron 12 canales de siembra en el gel y en cada uno se sembraron 15 μ l de muestra, uno para sembrar 4 μ l de marcador de peso molecular. Previo a la siembra, a cada muestra se le agregó 5 μ l de loading buffer 6X. Cuando la corrida finalizó se tomaron fotos del gel en un transiluminador UV con cámara digital. En base a la intensidad de las bandas observadas

se determinó que la combinación óptima para continuar con la puesta a punto fue la del tubo 7.

Luego, se procedió a determinar la temperatura óptima de “annealing”. Se prepararon 16 tubos “eppendorfs” con la mezcla de reacción lograda en el punto anterior. La secuencia de tiempos y de temperaturas fue la misma utilizada anteriormente, pero se utilizó la función del termociclador para generar un gradiente de temperatura en la etapa de “annealing”. La temperatura de cada tubo se lee en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3: Temperatura correspondiente a cada uno de los tubos utilizados en la puesta a punto de la temperatura de “annealing” de la PCR convencional de β -Actina.

TUBO	TEMPERATURA	TUBO	TEMPERATURA
1	50	9	60
2	52,1	10	60,6
3	53,9	11	61,4
4	56	12	62,3
5	57,3	13	63,6
6	58,4	14	64,3
7	59,4	15	65,6
8	60	16	66

La determinación de la temperatura se realizó en 2 etapas, una con los tubos 1-8 y la siguiente con los tubos 9-16. A partir de este estudio se determinó que la temperatura óptima a utilizar es de 60°C. El paso a seguir fue establecer el número de ciclos de amplificación a realizar. Para esto se llevó a cabo una PCR con las condiciones ya mencionadas en los pasos previos. Esta vez la reacción fue detenida 8 veces a diferente número de ciclos de amplificación. Para esto se detuvo el termociclador a los 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44 y 48 ciclos de amplificación. Para detener la reacción de amplificación un “eppendorf” se colocó en hielo cada vez que se abrió el termociclador y cuando se sacó el último se realizó la corrida de la electroforesis en gel, determinando esta vez que 24 ciclos eran suficientes para lograr la mejor intensidad de banda en el transiluminador.

De este modo al finalizar la puesta a punto de la PCR para β -actina, los parámetros establecidos fueron: 1 μ l de cebadores, 1 μ l de Mg^{++} y producto de 0,5 μ l RT; 60°C como temperatura de “annealing” y 24 ciclos de amplificación.

Como ya se mencionara previamente, el procedimiento de determinación de los parámetros para cada una de las PCR a realizar se desarrolló del mismo modo. En Tabla 4.4 se resumen los parámetros obtenidos como óptimos para la amplificación de todos los genes en estudio.

Tabla 4.4: Parámetros obtenidos como óptimos para la amplificación de los genes de *Coturnix coturnix* en estudio mediante PCR convencional.

GEN DE INTERÉS	CEBADORES (S + AS)	Mg^{++}	PRODUCTO DE RT	TEMPERATURA DE “ANNEALING”	NÚMERO DE CICLOS
B-Actina	1 μ l	1 μ l	0,5 μ l	60	24
IFN- γ	1 μ l	1 μ l	1 μ l	55	40
IL-1 β	1 μ l	1 μ l	1 μ l	55	45
IL-13	1 μ l	1 μ l	1 μ l	65	45
IL-4	1 μ l	1 μ l	1 μ l	55	45

4.4.7.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa (tiempo real).

Durante el desarrollo de las puestas a punto y el avance de las investigaciones en amplificación de materiales genéticos se arribó en la comunidad científica al consenso de que la PCR convencional no es un método adecuado para la cuantificación de material genético sino que más bien es una técnica adecuada para la determinación de “presencia o ausencia” de una determinada molécula en una muestra dada. Al ser necesario poder cuantificar los niveles de mediadores pro y anti-inflamatorios es que se decidió implementar la metodología de PCR en tiempo real para cuantificar mediadores INE en codornices. Se logró poner a punto la cuantificación de estos mediadores en base al primer estudio sobre cuantificación de interferones e interleucina en aves del género *Coturnix* (Uno et al., 2012). Para desarrollar las reacciones de PCR en tiempo real se partió del mismo material genético que para realizar PCR convencional. Para este trabajo se utilizaron las secuencias correspondientes a los cebadores de los siguientes genes: IFN- γ , IL-1 β , IL-13 e IL-4 (Invitrogen). Las secuencias específicas y los datos referidos a los mismos pueden observarse en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5: Secuencia y número de acceso de los genes de mediadores INE en aves de la especie *Coturnix coturnix*, amplificados a través de la técnica de PCR en tiempo real.

GEN A AMPLIFICAR	SECUENCIA DEL CEBADOR (5'–3')	NÚMERO DE ACCESO
IFN- γ	S: CAACCTTAATGATGGCACGA AS: CTTTGCGGTGGATTCTCA	AJ001678
IL-1 β	S: CTCCTCCAGCCAGAAAGT AS: CAGCTTGTAGCCCTTGAT	AB559570
IL-4	S: GAGAGCATCCGGATAGTGAAG AS: TTCGCATAAGAGCTGGGTTC	AB559571
IL-13	S: CTGCAAGAAGGACTATGAGCCC AS: CAGTGCCGGCAAGAAGTT	AB5595764
β -Actina	S: CTGGCACCTAGCACAATGAA AS: CTGCTTGCTGATCCACATCT	AF199488

S: cebador sentido, AS: cebador anti-sentido, C: citosina, T: timina, G:guanina, A:adenina.

Una mezcla base de reacción de PCR en tiempo real con sybr green como reactivo se compone de los siguientes elementos: material genético producto de transcripción reversa, cebadores de la secuencia sentido y la secuencia anti-sentido, mezcla de reacción comercial (donde se encuentra buffer, enzima polimerasa, iones) y agua libre de ribo y desoxirbonucleasas. El volumen suele variar entre 10 y 20 μ l finales por pocillo de reacción. Lo primero que se realizó fue una réplica de reacciones en las condiciones descritas en la puesta a punto de la técnica. Como no se obtuvieron buenos resultados en los gráficos de amplificación se prosiguió a poner a punto las siguientes variables:

- Concentración de cebadores.
- Concentración de mezcla de reacción.
- Volumen final de reacción.
- Temperatura de “annealing”.

Las combinaciones de condiciones desarrolladas se pueden observar en la Tabla 4.6 y fueron realizadas todas para cada una de las 5 moléculas a amplificar (los 4 mediadores y la β -actina como control interno).

Tabla 4.6: Combinaciones de variables empleadas en la puesta a punto de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para material genético de aves de la especie *Coturnix coturnix*.

CONDICIÓN	PRODUCTO RT	CEBADORES (S + AS)	MEZCLA	AGUA	VOL. FINAL	Tº DE "ANNEALING"
1	0,5	1+1	5	12,5	20	
2	0,5	1+1	10	7,5	20	
3	0,5	1+1	15	2,5	20	
4	1	1+1	5	12	20	
5	1	1+1	10	7	20	
6	1	1+1	15	2	20	
7	1,5	1+1	5	11,5	20	
8	1,5	1+1	10	6,5	20	
9	1,5	1+1	15	1,5	20	
10	0,5	1+1	5	5	20	
11	0,5	1+1	10	1,5	20	
12	1	1+1	15	4,5	20	
13	1	1+1	5	2	20	
14	1,5	1+1	10	4	20	
15	1,5	1+1	15	1,5	20	

En todos los casos se empleó la temperatura informada en (Uno et al., 2012) y se la comparó con 60°C.

S: cebador sentido, AS: cebador anti-sentido, RT: transcripción reversa, MEZCLA: mezcla conteniendo enzima polimerasa, cofactores y nucleótidos di-fosfatados.

La condición que resultó ser la óptima para la amplificación de los genes fue la número 4, por ende fue la empleada en los experimentos relacionados.

4.5 Protocolos de estrés crónico.

Para poder cumplir los objetivos relacionados a efectos del estrés de tipo crónico sobre la distribución poblacional de FINEs en los modelos animales empleados se usaron diferentes protocolos en cada caso.

4.5.1 *Coturnix coturnix*.

En este modelo animal se empleó un estrés crónico, variado e impredecible (CVI). Para definir el protocolo de estrés crónico variado a emplear se analizaron diferentes

publicaciones que describiesen protocolos como el buscado (Calandreau et al., 2011; Guibert et al., 2011; D Hazard et al., 2008; Laurence et al., 2012; McFadden et al., 2011; Nazar and Marin, 2011; Richard et al., 2008). De cada una de las publicaciones se eligieron diferentes pruebas con el criterio de que el efecto como estresor de las mismas se encuentre confirmado de manera fisiológica o comportamental (como aumentos en los niveles de CORT plasmáticos, o bien por el desarrollo de comportamientos característicos de animales en condiciones de estrés). En la Tabla 4.7 se muestran los estresores empleados y la definición de los mismos.

Tabla 4.7: Nombre y descripción de cada estresor empleado en el diseño de un protocolo de estrés CVI desarrollado en aves de la especie *Coturnix coturnix* para conocer el efecto del mismo sobre la distribución poblacional de los FINEs.

NOMBRE DEL ESTRESOR	DESCRIPCIÓN DEL ESTRESOR.
Objeto novel.	<i>Introducción de un objeto extraño en la jaula durante 30 minutos.</i>
Rociado de aves con agua.	<i>Rociado de las aves en sus jaulas de cría con agua fría 3 veces en 10 minutos.</i>
Transporte.	<i>Colocación de los animales en grupos de 20 en canastos de plástico y transporte de los mismos durante 15 minutos. Este estresor combina los efectos del transporte con los del ambiente nuevo para los animales.</i>
Introducción de mano en jaula.	<i>Introducción de la mano del experimentador en jaula durante 30 segundos (3 veces en 3 minutos).</i>
Manipulación del ave.	<i>Manipulación del ave durante 30 segundos 2 veces en 2 minutos.</i>
Deprivación de alimento A.	<i>Deprivación total de alimento durante 3 hs. por quite de comederos.</i>
Deprivación de alimento B.	<i>Deprivación total de alimento durante 3 hs. por vaciado de los comederos.</i>
Pesado.	<i>Pesado de los animales introduciéndolos en una caja de cartón.</i>
Duplicación de animales en recinto.	<i>Los animales de la jaula inmediata inferior eran cambiados a la jaula superior por un período de 1 hora.</i>
Inmovilización mecánica parcial.	<i>Inmovilización mecánica parcial durante 15 minutos en dispositivo grupal. Se combinan los efectos de la inmovilización con el ambiente nuevo.</i>

Agitado de baterías donde se alojan.	<i>La batería completa donde las aves estaban alojadas se sacudió durante 15 segundos 3 veces en un minuto.</i>
Ambiente novel.	<i>Alojamiento por 40 minutos en un ambiente nuevo. Este estresor combina los efectos del ambiente nuevo y desconocido con el de la privación de agua y alimento.</i>
Oscuridad.	<i>Apagado de las luces del bioterio durante 4 horas, 1 hora después del comienzo de la fase de luz.</i>

A partir del comienzo del protocolo de estrés los estresores fueron desarrollados con el siguiente criterio: 2 estresores diferentes por día, en 2 franjas horarias distintas (antes de 12:00 y después de 12:00), todos los días en diferentes horario. De esta manera se buscó darle el carácter impredecible al protocolo para finalmente asegurar que se estaba trabajando con un protocolo de estrés CVI. A continuación (Tabla 4.8) se detallan los estresores empleados y los días correspondientes.

Tabla 4.8: Descripción del protocolo de estrés CVI desarrollado en aves de la especie *Coturnix coturnix* para conocer el efecto del mismo sobre la distribución poblacional de los FINEs.

DÍA	FRANJA HORARIA	ESTRESOR
1	Mañana	<i>Inmovilización mecánica parcial.</i>
	Tarde	<i>Rociado de aves con agua.</i>
2	Mañana	<i>Transporte.</i>
	Tarde	<i>Introducción de mano en jaula.</i>
3	Mañana	<i>Manipulación del ave.</i>
	Tarde	<i>Deprivación de alimento A.</i>
4	Mañana	<i>Ambiente novel.</i>
	Tarde	<i>Pesado.</i>
5	Mañana	<i>Duplicación de animales en recinto.</i>
	Tarde	<i>Inmovilización mecánica parcial.</i>
6	Mañana	<i>Sacudida de la batería de alojamiento.</i>
	Tarde	<i>Deprivación de alimento B.</i>
7	Mañana	<i>Oscuridad.</i>
	Tarde	<i>Objeto novel.</i>
8	Mañana	<i>Rociado de aves con agua.</i>
	Tarde	<i>Transporte.</i>
9	Mañana	<i>Introducción de mano en jaula.</i>

	Tarde	<i>Manipulación del ave.</i>
10	Mañana	<i>Deprivación de alimento A.</i>
	Tarde	<i>Ambiente novel.</i>
11	Mañana	<i>Duplicación de animales en recinto.</i>
	Tarde	<i>Inmovilización mecánica parcial.</i>

El análisis de las variables intervinientes en la determinación de los FINEs en aves de esta especie fue realizado tres días después de finalizado el protocolo de estrés.

4.5.2 *Gallus gallus.*

En este modelo animal se empleó un protocolo de estrés crónico social por alteración fenotípica. Ha sido demostrado que cambios en el fenotipo de las aves dentro de un grupo induce alteraciones comportamentales que incluyen aparición de agresiones (Dennis et al., 2008; Marin et al., 2014; McAdie and Keeling, 2000). Las alteraciones fenotípicas se realizaron mediante el siguiente procedimiento: en las poblaciones definidas como fenotípicamente homogéneas, es decir aquellas dónde todos los individuos presentaban el mismo fenotipo se modificó progresivamente la proporción de individuos “marcados” o “no marcados” del grupo. En los grupos con 0% de gallinas marcadas, cada 3 semanas se tiñeron progresivamente el 25, 50 y 75 % de los individuos. En los grupos 100% marcados también cada 3 semanas se desmarcó progresivamente el 25, 50 y 75% de los individuos. El desmarcado de los individuos se realizó mediante el desteñido de las plumas pintadas. Luego del marcado o desmarcado del 75% de los individuos de cada recinto, el protocolo de alteraciones fenotípicas se dio por finalizado y exactamente una semana después se procedió a determinar el FINE de cada animal. De esta manera los individuos fueron periódicamente expuestos a cambios en la conformación fenotípica de sus grupos con el consecuente disturbio social que ello originaba.

4.6 Análisis estadísticos.

A lo largo del desarrollo de la presente tesis se emplearon diferentes herramientas estadísticas cada una con fines particulares.

- Estadística descriptiva: análisis de medias, valores máximos y mínimos, desvío y error estándar, recorrido. Análisis de normalidad y homogeneidad de varianza.
- Análisis de componentes principales (ACP) para realizar una exploración de la variabilidad total de un determinado grupo de datos provenientes del análisis de diferentes variables en los animales en estudio. Esta técnica explora la variabilidad total de los datos en un hiperespacio definido por la cantidad total de variables en el análisis, las cuales se denominan variables clasificatorias.
- Análisis discriminante (AD) para hacer un análisis de las relaciones entre las variables analizadas en un grupo de animales categorizados a priori e intentar lograr de modo teórico hacer análisis predictivos.
- Análisis de proporciones para determinar si la frecuencia de ocurrencia de un fenómeno determinado es diferente en 2 situaciones en base a la proporción de ocurrencia del mismo en uno y otra circunstancia.
- Análisis de la varianza (ANOVA) de una o más vías para evaluar el efecto de uno o más factores y de su interacción sobre determinadas variables de respuesta. La prueba de Fisher LSD fue empleada para la comparación de medias individuales *a posteriori*.
- Análisis de correlación paramétrica o no paramétrica (Pearson o Spemann respectivamente) para poder caracterizar la relación entre variables cuantitativas continuas.

En todos los casos que correspondió de acuerdo al análisis, un valor de $P < 0,05$ es considerado representante de diferencias significativas.

Vale aclarar que según correspondiese en base al caso particular, se realizaron análisis estadísticos acordes para determinar si diferentes variables actuaban como variables “de confusión” de los resultados, como la ubicación de los animales en el bioterio, el orden o día de muestreo, la apariencia fenotípica, el tamaño de grupo, etc.

**5. Estudio sobre la interrelación
entre componentes del sistema INE
en *Coturnix coturnix*: Potencial
existencia y distribución poblacional
de fenotipos inmuno-
neuroendócrinos.**

5.1 Introducción.

Sólo se hará una pequeña reseña bibliográfica luego del amplio recorrido teórico desarrollado en la introducción de la presente tesis. Como se mencionara previamente, el estudio del sistema inmune en aves ha tenido un gran avance en los últimos años (Adelman and Ardia, 2014; Davison et al., 2011; Juul-Madsen et al., 2014; Oláh et al., 2014; Schultz and Magor, 2014; Toivanen and Toivanen, 1987). Muchos aspectos han sido profundizados y, por ejemplo, han sido estudiados y caracterizados el perfil Th1 y la respuesta de fase aguda inflamatoria entre otros (Berg, 2000; Koutsos and Klasing, 2001). Respecto al perfil Th2, hasta el momento se han caracterizado componentes del mismo como las IL-4 y 10, y se ha documentado la posibilidad de intercambio de perfiles Th1 a Th2 y viceversa (Degen et al., 2005). En este capítulo se avanza en el conocimiento evaluando si en base a la interrelación entre componentes del sistema INE en *Coturnix coturnix* es posible determinar fenotipos INE y conocer su distribución poblacional.

5.2 Materiales y métodos.

Los animales empleados en esta experiencia fueron de 2 linajes diferentes provenientes de 2 regiones geográficas de Argentina. Uno fue generado a partir de animales de cría del laboratorio de Ciencia Avícola, que se reproducen en el laboratorio de manera controlada para minimizar la endogamia en los cruzamientos. El otro linaje provenía de un establecimiento comercial de la provincia de Buenos Aires. En el laboratorio ambos fueron mantenidos separados para evitar cruzamientos y a su vez sus individuos estaban alojados al azar en diferentes áreas del bioterio para evitar que mínimas diferencias en condiciones ambientales de mantenimiento (gradiente de luz, corriente de aire, posicionamiento de claves ambientales, etc) pudieran involuntariamente “confundir” los resultados a obtener. Basados en el criterio de que la cruce entre los animales se encontraba impedida desde sus orígenes y así continuó en nuestro laboratorio, su probabilidad de identidad por descendencia sería igual a 0 y por lo tanto los grupos de aves de cada linaje fueron considerados como una población independiente.

En 60 animales (30 de cada línea) se realizaron las siguientes pruebas experimentales siguiendo los procedimientos descritos previamente (secciones 3.2 y 3.3):

- Linfoproliferación ante la inyección de PHA-P.
- Titulación de anticuerpos inducidos contra glóbulos rojos de oveja (GRO).
- Cuantificación de CORT en plasma.
- PCR en tiempo real para citoquinas pro y anti-inflamatorias.
- Citometría de flujo.

Para evitar potenciales variaciones o interferencias inducidas por diferencias en el desarrollo sexual entre individuos, las variables evaluadas fueron analizadas sólo cuando los animales alcanzaron los siguientes indicadores de madurez sexual: regularización diaria de postura de huevos en las hembras y, glándula cloacal con un volumen mínimo de 1000 mm³ así como producción de espuma en machos. Estas variables son consideradas clásicos indicadores no-invasivos de madurez sexual ya que no presentan o minimizan el disturbio de las aves durante su determinación (Luna et al., 2012; Marin and Satterlee, 2004; Nazar and Marin, 2011; Wall and Cockrem, 2010).

5.3 Resultados y Discusión.

En esta sección se presentan de forma completa los resultados del capítulo y un primer adelanto de sus principales implicancias y/o justificaciones. Una discusión más profunda se presenta en los capítulos finales integradores.

Una vez obtenidos los datos se procedió a descartar que el origen y la ubicación de los animales en el bioterio hayan influido en la respuesta a cada una de las variables analizadas y actuado como variables de “confusión” de resultados. Para esto se realizó un ANOVA de 2 vías donde se evaluaron los efectos de los factores Línea (lab vs. no lab), Batería (1 vs. 2) y su interacción. Como se puede observar en la Tabla 5.1, ninguno de los factores influyó de modo estadísticamente significativo sobre ninguna de las variables en análisis por lo que a partir de este momento, y a los efectos objetivos de la presente

tesis, las 2 líneas pueden ser consideradas estadísticamente como una única población de 60 individuos en lugar de 2 de 30.

Tabla 5.1: Efecto de los factores Línea (lab vs. no lab) y Batería (1 vs. 2) y su interacción sobre las variables: concentración plasmática de CORT, linfoproliferación in vivo ante la inyección de PHA-P, título de anticuerpos contra GRO, y FDL.

PARÁMETRO	Probabilidad		
	LÍNEA	BATERÍA	LÍNEA X BATERÍA
Linfoproliferación	0,72	0,91	0,93
Ac GRO	0,64	0,24	0,28
CORT	0,11	0,22	0,62
FDL	0,67	0,45	0,7

A continuación se analizaron los datos para determinar si había algún tipo de asociación entre las variables mencionadas previamente (linfoproliferación, Ac GRO, CORT y FDL) y el orden en que los animales fueron seleccionados para realizar el muestreo (orden de muestro). El principal objetivo de esta práctica fue descartar que las variables analizadas puedan reflejar una respuesta a la manipulación implicada en el proceso de toma de muestras, y para esto se realizaron correlaciones entre la variable “Orden de muestreo” y cada uno de los parámetros. A su vez, se determinó si el día en que se realizó la toma de muestras influyó en las variables analizadas, por lo que se realizó un ANOVA a 1 factor con 5 niveles: Día (1 vs. 2 vs. 3 vs. 4 vs. 5). En los resultados obtenidos se observa que no hay asociación entre ninguna de las variables y el orden de muestreo, así como tampoco es significativo el efecto del factor Día (Tabla 5.2) y por lo tanto se prosiguió al análisis estadístico de los datos con el objetivo de lograr una aproximación al posible perfil inmunoneuroendócrino de los animales.

Tabla 5.2: Análisis de correlación de la variable “Orden de muestro” con las variables: concentración plasmática de CORT, linfoproliferación ante la inyección de PHA-P, título de anticuerpos contra GRO, y cociente obtenido a partir de la citometría de flujo. Efecto del factor “Día” sobre las mismas variables de respuesta.

PARÁMETRO	CORRELACIÓN			DÍA
	R	R ²	Probabilidad	Probabilidad
Linfoproliferación	0,11	0,14	0,37	0,42
Ac GRO	0,11	0,01	0,39	0,19
CORT	0,07	0,005	0,56	0,44
FDL	0,04	0,002	0,71	0,14

En primer lugar se realizó un ACP en base a los datos estandarizados donde se muestra la distribución de la totalidad de los animales empleando las siguientes variables como clasificatorias: Linfoproliferación, Ac GRO, CORT y FDL. Esta técnica explora un hiperespacio definido por la cantidad total de variables en el análisis. Como no es posible la realización de una representación clara de este espacio de dimensión 4, se utiliza un gráfico de bi-plot donde se muestran como componentes principales los ejes sintéticos que mayor porcentaje de variabilidad total explican. El gráfico resultante del análisis estadístico se muestra en la Figura 5.1.

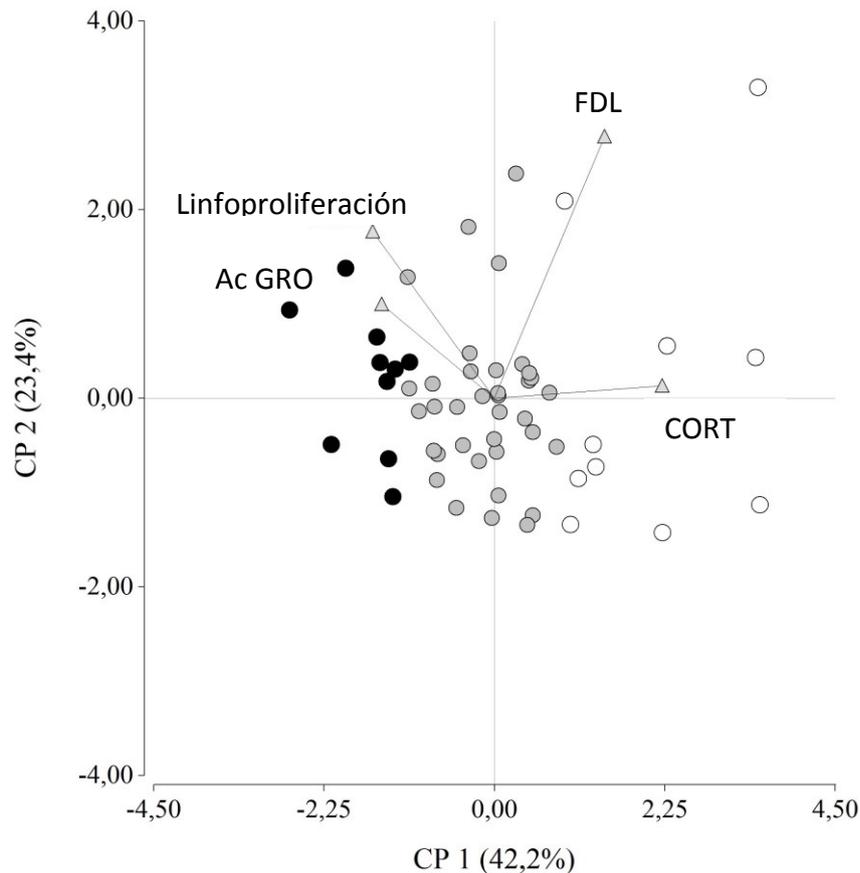


Figura 5.1: Gráfico de análisis de componentes principales empleando como variables clasificatorias a: la concentración plasmática de CORT, la linfoproliferación ante la inyección de PHA-P, el título de anticuerpos contra GRO, y el cociente obtenido a partir de la citometría de flujo. En negro, blanco y gris se representan respectivamente los animales que corresponderían al perfil A, B e intermedio (ver detalles de clasificación en perfiles más abajo en página siguiente). Número total de animales en análisis: 60. Número de animales por grupo: A: 10 (15%), B: 10 (15%), intermedio: 40 (70%).

Del análisis de los resultados estadísticos y la gráfica se observa que el CP1 explica el 42,2% de la variabilidad total presente en los datos, seguido por el CP2 que explica el 23,4%. Haciendo un análisis de autovectores se devela que la variable con mayor asociación al CP1 fue CORT, teniendo un autovector de 0,62. Por otro lado, los resultados en el gráfico de puntos que genera el ACP muestran algún tipo de correlación entre las variables explicatorias empleadas, por lo que se prosigue a hacer una correlación de Pearson para continuar la caracterización de la relación entre las variables. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 5.3.

Tabla 5.3: Coeficiente de correlación de Pearson entre las variables CORT, Linfoproliferación, Ac GRO y FDL.

	CORT	LINFOPROLIFERACIÓN	AC GRO
LINFOPROLIFERACIÓN	-0,35**		
AC GRO	-0,31*	0,21	
FDL	0,34*	-0,06	-0,09

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. Los análisis fueron realizados en base a 60 animales estudiados.

A través del análisis de los resultados resumidos en la Tabla 4.3, se destaca que la única variable que correlaciona de manera significativa con todas las demás es CORT. Por lo mencionado y sumado a la caracterización de la misma como variable más influyente en la configuración del CP1, se utilizó CORT como variable clasificadora para organizar todos los datos en base a este único parámetro. De este modo, se escogieron los animales ubicados en los extremos de la distribución que se obtuvo, eligiendo un número de aves equivalente al 15% de cada extremo, coincidiendo con los extremos en el gráfico de puntos del ACP (sabiendo que la expresión de FINEs en mamíferos sólo se manifiesta espontáneamente en aproximadamente el 10-15% de una población). A los animales correspondientes al extremo con mayor respuesta se los denominó arbitrariamente “de perfil A” y a los animales correspondientes al extremo con menores concentraciones de CORT se los llamó “de perfil B”. Una vez establecidos de esta manera los 2 potenciales grupos correspondientes a 2 posibles perfiles extremos, fue necesario determinar si estos animales se diferenciaban estadísticamente entre sí en todas las variables analizadas. Así se buscaba delimitar grupos de animales con respuestas comunes en todos los parámetros en estudio. Al mismo tiempo se corroboró nuevamente que la línea de la cual provenían los animales no fuese el factor subyacente a la diferenciación extrema de estos perfiles. Si bien este factor ya había sido analizado, fue necesario re-analizarlo puesto que era posible que luego de realizar la reorganización en base al orden creciente de la variable CORT, los extremos se hubiesen separado coincidiendo además con sus líneas de origen, en cuyo caso la principal variable subyacente a la diferenciación podría haber sido el origen de los animales. Para esto se realizaron ANOVAs de dos vías para conocer el efecto del factor Perfil (A vs. B) y del factor procedencia de la línea (laboratorio vs. Buenos

Aires) y su interacción sobre la concentración plasmática de CORT, la linfoproliferación ante la inyección de PHA-P, el título de anticuerpos contra GRO, y el cociente obtenido a partir de la citometría de flujo. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4: Efecto de los factores Línea (lab vs. no lab) y Perfil (A vs. B) y su interacción sobre las variables: concentración plasmática de CORT, linfoproliferación ante la inyección de PHA-P, título de anticuerpos contra GRO, y cociente obtenido a partir de la citometría de flujo (FDL).

PARÁMETRO	Probabilidad		
	PERFIL	LÍNEA	PERFIL X LÍNEA
CORT	0,001	0,584	0,601
Linfoproliferación	0,036	0,617	0,392
Ac GRO	0,001	0,726	0,626
FDL	0,044	0,855	0,687

Como se puede apreciar, el origen del animal no posee efectos significativos sobre las variables en estudio. Por otro lado, se observa que los perfiles seleccionados en base al procedimiento ya descrito se diferencian en todas las variables. De este modo, sería posible mencionar que en una población de 60 animales habría grupos extremos de aves que difieren biológica y estadísticamente en su concentración plasmática de CORT, en la linfoproliferación ante una inyección de una suspensión PHA-P, en el título de anticuerpos inducidos contra GRO, y en sus valores de glóbulos blancos obtenidos a partir de una citometría de flujo. Vale destacar (además de todas las salvedades consideradas respecto del origen, ubicación en el bioterio, orden de muestro de los animales, etc.) que estas aves no fueron sometidas deliberadamente a ningún tipo de tratamiento o estresor, por lo que estarían expresando de un modo natural (no inducido) 2 extremos de respuesta en las variables analizadas. Para caracterizar más adecuadamente los extremos mencionados, en la Tabla 5.5 se muestran las medias correspondientes a cada variable teniendo en cuenta los 2 grupos extremos de respuesta.

Tabla 5.5: Media (\pm error estándar) de variables INE determinadas en grupos de individuos con Perfil A o

B.

PARÁMETRO	PERFIL		
	A	B	Probabilidad
CORT	3,22 \pm 0,28 ^a	8,61 \pm 0,74 ^b	0,001
Linfoproliferación	30,73 \pm 5,96 ^a	14,74 \pm 3,97 ^b	0,036
Ac GRO	5,63 \pm 0,36 ^a	2,45 \pm 0,56 ^b	0,001
FDL	2,45 \pm 0,44 ^a	6,26 \pm 1,52 ^b	0,044

CORT: concentración plasmática de corticosterona [ng/ml]; Linfoproliferación: linfoproliferación ante la inyección de PHA-P [% de cambio]; Ac GRO: título de anticuerpos contra glóbulos rojos de oveja; FDL: cociente obtenido a partir de la citometría de flujo. Los valores se expresan como media \pm error estándar.

Para finalizar la caracterización de los 2 grupos extremos de animales, diferenciados en un principio por el nivel de CORT plasmática que los mismos poseían, se prosiguió a determinar los niveles de expresión de los diferentes mediadores pro y anti-inflamatorios. Así, se analizó en glóbulos blancos mononucleados de sangre periférica la expresión de ARNm para IFN- γ , IL-1 β , IL-13 e IL-4. En la Tabla 4.6 se puede apreciar que los 2 grupos que hasta el momento se diferenciaban en las variables ya analizadas también manifestaron diferencias estadísticamente significativas en 3 de los 4 mediadores analizados (IFN- γ , IL-1 β e IL-13). En la Tabla 5.6 se presenta un resumen completo de todas las variables estudiadas que permiten proponer la existencia de dos tipos de perfiles (FINE A y FINE B) en codornices.

Tabla 5.6: Resumen conjunto de todos los parámetros definidos como necesarios para la determinación de FINEs en aves de la especie *Coturnix coturnix*. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

PARAMETRO	PERFIL A	PERFIL B	Probabilidad	VECES DE CAMBIO
CORT	3,22 ± 0,28 ^a	8,61 ± 0,74 ^b	0,001	2,67
Linfoproliferación	30,73 ± 5,96 ^a	14,74 ± 3,97 ^b	0,036	2
Ac GRO	5,63 ± 0,36 ^a	2,45 ± 0,56 ^b	0,001	2,29
FDL	2,45 ± 0,44 ^a	6,26 ± 1,52 ^b	0,044	2,55
IFN-γ	33,4 ± 0,71 ^a	0,34 ± 0,14 ^b	< 0,0001	9,8
IL-1β	70,43 ± 2,65 ^a	4,49 ± 1,52 ^b	< 0,0001	15,6
IL-13	7,92 ± 0,38 ^a	45,27 ± 2,17 ^b	0,01	5,7
IL-4	0,46 ± 0,03 ^a	0,64 ± 0,57 ^a	0,79	NS

CORT: concentración plasmática de corticosterona [ng/ml]; Linfoproliferación: linfoproliferación ante la inyección de PHA-P [% de cambio]; Ac GRO: título de anticuerpos contra glóbulos rojos de oveja; FDL: cociente obtenido a partir de la citometría de flujo. IFN-γ, IL-1β, IL-13 e IL-4: amplificación de ARNm de interferón γ, interleucina 1β, 13 y 14 [relativizada a control interno de β-actina]. Veces de cambio: Perfil/Perfil. Los valores se expresan como media ± error estándar.

5.4 Conclusiones parciales.

En base a la información condensada en la Tabla 5.6 se pueden obtener las siguientes conclusiones fundamentadas en el análisis conjunto de las variables definidas como necesarias para la caracterización de FINEs en aves de la especie *Coturnix coturnix*: se encontraron dos subgrupos de individuos con altos o bajos niveles basales de CORT que mostraron perfiles de mediadores de la INE opuestos, y ergo respuestas efectoras divergentes, mostrando por primera vez en aves un nexo con el paradigma LEW/F344. Las aves que en nuestro estudio se corresponderían con el fenotipo similar al de ratas LEW manifiestan el siguiente conjunto de variables: bajos niveles de CORT, bajos niveles de FLD y elevados niveles de respuesta de linfoproliferación *in vivo* y de anticuerpos inducidos contra GRO, en conjunto con elevados niveles de los mediadores pro-inflamatorios: IFN-γ e IL-1β, pero bajos niveles de IL-13. Las aves con fenotipo similar a las ratas de la cepa F344 manifiestan opuestos niveles de CORT y de los demás parámetros en estudio.

6. Estrés crónico, variado e impredecible como modulador de la expresión y/o distribución de fenotipos inmunoneuroendócrinos en *Coturnix coturnix*.

6.1 Introducción.

Como se desprende de los antecedentes mencionados en el capítulo introductorio de esta Tesis, el estrés como fenómeno fisiológico podría modular la expresión y/o la distribución poblacional de los FINEs en estudio. Para responder este interrogante, se diseñó un estudio donde se evalúan variables de la interacción INE en aves que son sometidas a un protocolo de estrés de tipo crónico, variado e impredecible (CVI; sección 4.5) el cual comprende la aplicación a lo largo de días consecutivos de un conjunto de diferentes estresores, aplicado cada uno en diferentes horarios del día. En este capítulo se profundiza además en las características de la potencial modulación inducida por el estrés tanto a nivel individual como a nivel poblacional. Es decir que se plantea no solo conocer si el estrés modula la expresión a nivel poblacional de FINEs sino además caracterizar esta modificación analizando las subpoblaciones sobre las cuales impactan los efectos de protocolo empleado como desafío.

6.2 Materiales y métodos.

La cría de las aves en cautiverio se desarrolló del mismo modo en que se ha descrito para secciones previas donde el modelo animal son codornices (sección 4.1.1). Noventa y seis aves fueron criadas desde su eclosión en cajas destinadas a tal fin, alojadas en parejas en jaulas al alcanzar la adultez y mantenidas el tiempo que requirió el experimento con acceso *ad libitum* a agua y comida, con fotoperiodo controlado y temperatura constante.

6.2.1 Esquema experimental.

Las determinaciones del FINE de las aves (descritas previamente en la sección 1.3) se realizaron tanto antes (control de situación basal) como luego de finalizado el protocolo CVI de estrés (situación de estudio). Para asegurar que los potenciales cambios evaluados no se deban al efecto de cambios a corto plazo inducidos por crecimiento y maduración normal, se trabajó con animales que se encontraban en la misma etapa de desarrollo y por lo tanto se esperó a que las aves alcancen la adultez plena (120 días de edad).

6.2.1.1 Protocolo de estrés crónico, variado e impredecible.

En la Tabla 6.1 se muestra el diseño del protocolo de estrés CVI empleado en este experimento. La descripción detallada de cada estresor ya fue presentada en la sección 4.5.1.

Tabla 6.1: Protocolo de estrés CVI desarrollado en codornices para conocer el efecto del mismo sobre la distribución poblacional de los FINEs.

DÍA	FRANJA HORARIA	ESTRESOR
1	Mañana	<i>Inmovilización mecánica parcial.</i>
	Tarde	<i>Rociado de aves con agua.</i>
2	Mañana	<i>Transporte.</i>
	Tarde	<i>Introducción de mano en jaula.</i>
3	Mañana	<i>Manipulación del ave.</i>
	Tarde	<i>Deprivación de alimento A.</i>
4	Mañana	<i>Ambiente novel.</i>
	Tarde	<i>Pesado.</i>
5	Mañana	<i>Duplicación de animales en recinto.</i>
	Tarde	<i>Inmovilización mecánica parcial.</i>
6	Mañana	<i>Sacudida de la batería de alojamiento.</i>
	Tarde	<i>Deprivación de alimento B.</i>
7	Mañana	<i>Oscuridad.</i>
	Tarde	<i>Objeto novel.</i>
8	Mañana	<i>Rociado de aves con agua.</i>
	Tarde	<i>Transporte.</i>
9	Mañana	<i>Introducción de mano en jaula.</i>
	Tarde	<i>Manipulación del ave.</i>
10	Mañana	<i>Deprivación de alimento A.</i>
	Tarde	<i>Ambiente novel.</i>
11	Mañana	<i>Duplicación de animales en recinto.</i>
	Tarde	<i>Inmovilización mecánica parcial.</i>

Siguiendo de manera coherente los procedimientos seguidos en el desarrollo de la presente Tesis, una vez obtenidos los datos de cada una de las variables definidas como necesarias para determinar la distribución poblacional de FINEs en *Coturnix coturnix*, se procedió a caracterizarlas estadísticamente cada una de las variables y a corroborar que

no se encuentren factores que puedan actuar como variables de “confusión” de los resultados. Se estudiaron en este caso los potenciales efectos de la ubicación en el bioterio, el orden y el día de muestreo.

6.3 Resultados y discusión.

6.3.1 Determinación de FINEs previo estrés crónico variado.

La Tabla 6.2. resume los resultados del estudio de los efectos de variables de “confusión” donde se muestra que no se observan correlaciones entre el orden de muestreo, la ubicación de las aves dentro del bioterio, ni efectos del día de estudio sobre las variables INE estudiadas.

Tabla 6.2: Análisis de correlación entre el Orden de muestreo (ORDEN) y Ubicación en jaula (JAULA) y la concentración plasmática de CORT, la linfoproliferación ante la inyección de PHA-P, los título de anticuerpos contra GRO, y el cociente obtenido a partir de la citometría de flujo. Efecto del Día de muestreo sobre las mismas variables de respuesta.

PARÁMETRO	CORRELACIÓN				DÍA
	ORDEN	<i>Probabilidad</i>	JAULA	<i>Probabilidad</i>	<i>Probabilidad</i>
Linfoproliferación	0,05	0,63	-0,12	0,26	0,25
Ac GRO	0,15	0,15	-0,03	0,80	0,33
CORT	-0,17	0,11	-0,09	0,36	0,32
FDL	0,09	0,37	0,15	0,14	0,57

Habiendo confirmado la ausencia de efectos de variables de confusión se prosiguió a realizar un ACP empleando como variables clasificatorias Linfoproliferación, Ac GRO, CORT y FDL. El gráfico resultante (Figura 6.1) del análisis estadístico muestra la distribución de la totalidad de los animales en función de los ejes de ordenamiento (CP 1 y 2). Se observa que el CP1 explica el 48,2% de la variabilidad total presente en los datos, seguido por el CP2 que explica el 26,5% de la misma. Haciendo un análisis de autovectores se devela que la variable con mayor asociación al CP1 fue CORT nuevamente, teniendo un autovector de 0,59.

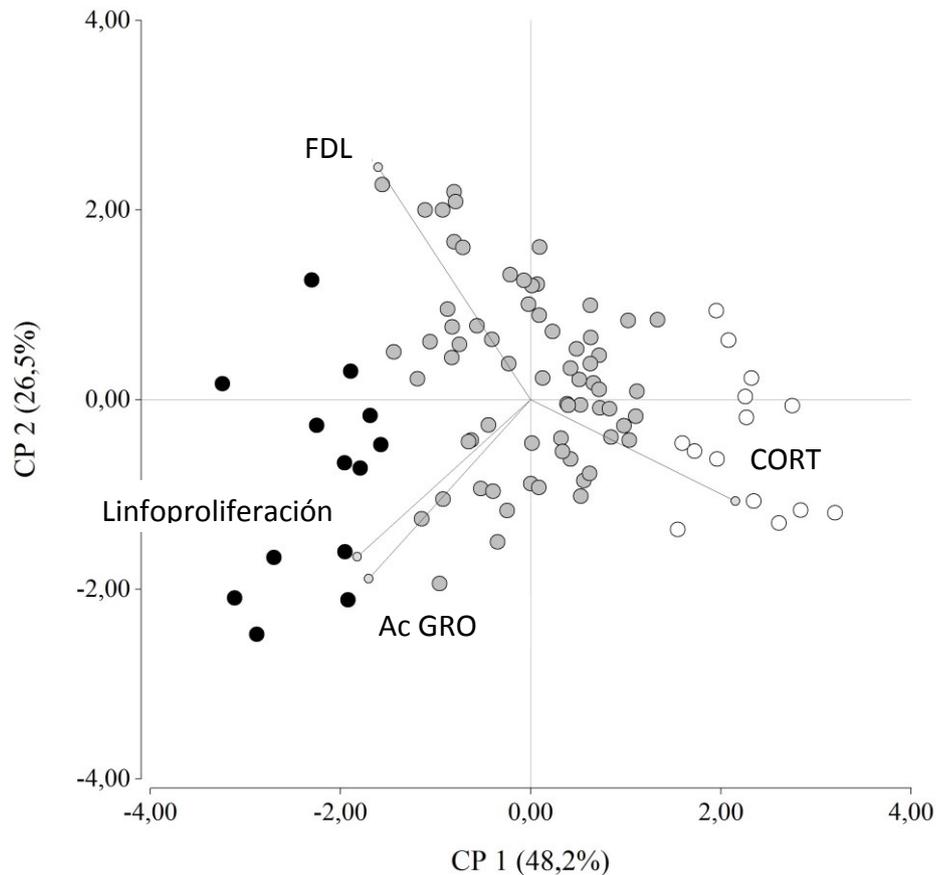


Figura 6.1: Gráfico de análisis de componentes principales de codornices adultas empleando como variables clasificatorias a: la concentración plasmática de CORT, la linfoproliferación ante la inyección de PHA-P, el título de anticuerpos contra GRO, y el cociente obtenido a partir de la citometría de flujo. Se muestran en diferentes colores los diferentes grupos de animales. En negro, blanco y gris se representan respectivamente los animales que corresponderían al perfil A, B e intermedio (ver detalles de clasificación en perfiles en página siguiente). Número de animales en análisis: 93. Número de animales por grupo: A: 13 (14%), B: 14 (15%), intermedio: 66 (71%).

El análisis de los resultados en el gráfico de puntos que genera el ACP indica la existencia de correlación entre las variables explicatorias empleadas, por lo que se prosiguió a hacer una correlación de Pearson para caracterizar la relación entre las variables. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 6.3.

Tabla 6.3: Coeficientes de correlación de Pearson entre las variables CORT, Linfoproliferación, Ac GRO y FDL.

	CORT	LINFOPROLIFERACIÓN	AC GRO
LINFOPROLIFERACIÓN	-0,37**		
AC GRO	-0,30**	0,42*	
FDL	-0,51**	0,12*	0,11

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. Los análisis fueron realizados en base a 96 animales estudiados.

A partir del análisis de los resultados se observa que consistentemente con los resultados mostrados en el capítulo anterior, CORT correlacionó significativamente con el resto de las variables INE estudiadas. Por ello y considerando que CORT fue nuevamente caracterizada como variable más influyente en la configuración del CP1, se utilizó CORT como variable clasificadora para ordenar todos los datos en base a este único parámetro. Se escogieron los animales ubicados en los extremos de la distribución que se obtuvo, eligiendo 2 grupos extremos. Se observó además que estos animales coincidían con posiciones divergentes en el gráfico de puntos del ACP. Nuevamente los animales correspondientes al extremo con mayor respuesta fueron denominados “de perfil A” (14% de la población en estudio) y los correspondientes al extremo con menores concentraciones de CORT “de perfil B” (15%). Una vez establecidos los 2 potenciales grupos, se determinó si estos animales se diferenciaban estadísticamente entre sí en todas las variables analizadas (Tabla 6.4).

Tabla 6.4: Media (\pm error estándar) de variables INE determinadas en grupos de individuos con Perfil A o

B.

PARÁMETRO	PERFIL		
	A	B	Probabilidad
CORT	$0,17 \pm 0,10^a$	$1,60 \pm 0,10^b$	$<0,0001$
Linfoproliferación	$48,75 \pm 2,98^a$	$16,39 \pm 2,87^b$	$<0,0001$
Ac GRO	$7,15 \pm 0,30^a$	$3,64 \pm 0,29^b$	$<0,0001$
FDL	$1,99 \pm 0,19^a$	$0,58 \pm 0,18^b$	$<0,0001$

CORT: concentración plasmática de corticosterona [ng/ml]; Linfoproliferación: linfoproliferación ante la inyección de PHA-P [% de cambio]; Ac GRO: título de anticuerpos contra glóbulos rojos de oveja; FDL: cociente obtenido a partir de la citometría de flujo. Los valores se expresan como media \pm error estándar.

Se observó que los perfiles seleccionados en base al procedimiento ya descrito se diferenciaban en todas las variables. De este modo, se observa consistentemente que en una población de animales de la especie *Coturnix coturnix* habría grupos extremos de aves que difieren biológica y estadísticamente en concentración plasmática de CORT, en linfoproliferación ante una inyección de una suspensión PHA-P, en título de anticuerpos inducidos contra GRO, y en FDL. Estas aves no fueron sometidas deliberadamente a ningún tipo de tratamiento o estresor, por lo que estarían expresando nuevamente de un modo natural 2 extremos de respuesta en las variables analizadas.

Para finalizar la caracterización de los 2 grupos extremos de animales, se prosiguió a caracterizar los niveles de expresión de los diferentes mediadores pro y anti-inflamatorios en glóbulos blancos mononucleados de sangre periférica (expresión de ARNm para IFN- γ , IL-1 β , IL-13 e IL-4). En la siguiente tabla se puede apreciar que los 2 grupos que hasta el momento se diferenciaban en las variables ya analizadas también manifiestan una diferencia estadísticamente significativa en 3 de los 4 parámetros analizados: IFN- γ , IL-1 β e IL-13. En la siguiente tabla se resumen todos los datos obtenidos en el estudio desarrollado.

Tabla 6.5: Resumen conjunto de todos los parámetros definidos como necesarios para la determinación de FINEs en aves de la especie *Coturnix coturnix*. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

PARAMETRO	PERFIL A	PERFIL B	Probabilidad	VECES DE CAMBIO
CORT	0,17 ± 0,10 ^a	1,60 ± 0,10 ^b	< 0,0001	9,4
Linfoproliferación	48,75 ± 2,98 ^a	16,39 ± 2,87 ^b	< 0,0001	2,97
Ac GRO	7,15 ± 0,30 ^a	3,64 ± 0,29 ^b	< 0,0001	1,96
FDL	1,99 ± 0,19 ^a	0,58 ± 0,18 ^b	< 0,0001	3,43
IFN-γ	72,08 ± 38,34 ^a	5,56 ± 2,85 ^b	0,0016	13
IL-1β	27,14 ± 7,56 ^a	1,57 ± 0,42 ^b	< 0,0001	17,28
IL-13	14,6 ± 6,89 ^a	199,8 ± 90 ^b	0,0004	15,26
IL-4	8,42 ± 6,21 ^a	15,2 ± 10,77 ^a	0,56	NS

CORT: concentración plasmática de corticosterona [ng/ml]; Linfoproliferación: linfoproliferación ante la inyección de PHA-P [% de cambio]; Ac GRO: título de anticuerpos contra glóbulos rojos de oveja; FDL: cociente obtenido a partir de la citometría de flujo. IFN-γ, IL-1β, IL-13 e IL-4: amplificación de ARNm de interferón γ, interleucina 1β, 13 y 14 [relativizada a control interno de β-actina]. Veces de cambio: Perfil/Perfil. Los valores se expresan como media ± error estándar.

En base a la información condensada en la tabla 5.5 se pueden hacer las siguientes conclusiones ahora fundamentadas en el análisis conjunto de las variables definidas como necesarias para la caracterización de FINEs en aves de la especie *Coturnix coturnix*: 1) Se encontraron dos subgrupos de individuos con altos o bajos niveles basales de CORT que mostraron perfiles de mediadores INE opuestos, y ergo respuestas efectoras divergentes, mostrando un nexo también con el paradigma LEW/F344. 2) Las aves que en nuestro estudio se corresponderían con el fenotipo similar al de ratas LEW manifiestan el siguiente conjunto de variables: bajos niveles de CORT, asociado a esto muestran bajos niveles de FLD y elevados niveles de respuesta de linfoproliferación *in vivo* y de anticuerpos inducidos contra GRO, en conjunto con elevados niveles de los siguientes mediadores pro-inflamatorios: IFN-γ e IL-1β, pero bajos los niveles de IL-13. Las aves con fenotipo similar a las ratas de la cepa F344 manifiestan opuestos niveles de CORT y de los demás parámetros en estudio.

6.3.2 Determinación de FINEs post estrés crónico variado.

Una vez concluido el protocolo de estrés previsto se repitió el proceso para determinación de FINE en las mismas aves evaluadas previamente. Nuevamente se corroboró la ausencia de variables de “confusión” (datos no mostrados) y se procedió a realizar un ACP con los datos empleando como variables clasificatorias: Linfoproliferación, Ac GRO, CORT y FDL. El gráfico resultante del análisis estadístico se muestra en la Figura 6.2.

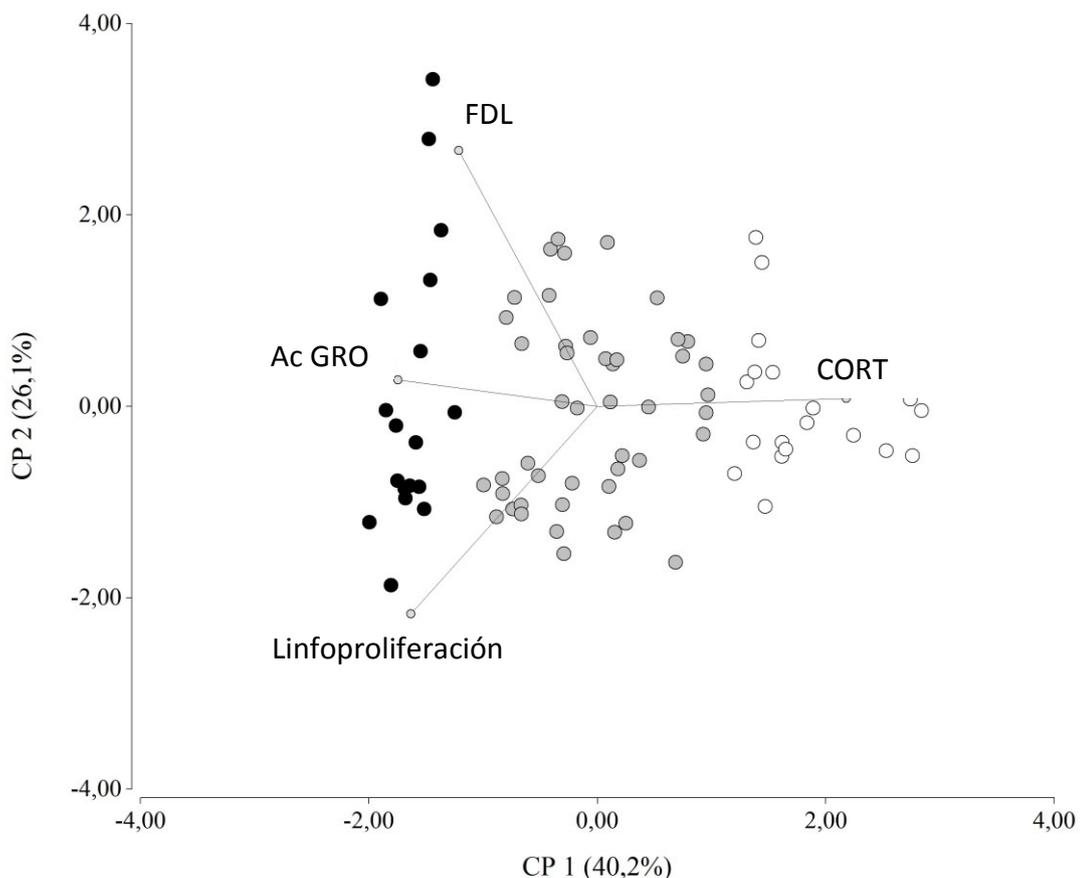


Figura 6.2: Gráfico de análisis de componentes principales de codornices adultas luego de haber sido sometidas a estrés crónico variado empleando como variables clasificatorias a: la concentración plasmática de CORT, la linfoproliferación ante la inyección de PHA-P, el título de anticuerpos contra GRO, y el cociente obtenido a partir de la citometría de flujo. Se muestran en diferentes colores los diferentes grupos de animales. En negro, blanco y gris se representan respectivamente los animales que corresponderían al perfil A, B e intermedio (ver detalles de clasificación en perfiles más abajo en página siguiente). Número de animales en análisis: 84. Número de animales por grupo: A: 19 (23%), B: 20 (24%), intermedio: 45 (53%).

El análisis de los resultados indicó que el CP1 explica el 40,2% de la variabilidad total presente en los datos, seguido por el CP2 (26,1%). La variable con mayor asociación al CP1 fue CORT, teniendo un autovector de 0,62. El análisis de los resultados en la Figura 6.2 indica existencia de correlación entre las variables, por lo que se continuó a realizar un análisis de correlación de Pearson para caracterizar la relación entre las mismas. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 6.6.

Tabla 6.6: Coeficientes de correlación de Pearson entre las variables CORT, Linfoproliferación, Ac GRO y FDL.

	CORT	LINFOPROLIFERACIÓN	AC GRO
LINFOPROLIFERACIÓN	-0,33**		
AC GRO	-0,29**	0,19	
FDL	-0,23**	-0,03	0,17

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. Los análisis fueron realizados en base a 96 animales estudiados.

A través del análisis de la tabla 6.6, se destaca que CORT nuevamente manifiesta una correlación con todas las variables empleadas incluso luego de un protocolo de estrés CVI. Por lo mencionado y sumado a la caracterización de la misma como variable más influyente en la configuración del CP1, y siguiendo el criterio empleado hasta el momento, se utilizó CORT como variable clasificadora para organizar todos los datos en base a este único parámetro. Se escogieron los animales ubicados en los extremos de la distribución que se obtuvo, eligiendo 2 grupos extremos que coincidieron con posiciones divergentes en el gráfico de puntos del ACP. Nuevamente los animales correspondientes al extremo con mayor respuesta fueron denominados “de perfil A” y correspondieron en este caso al 23% de la población analizada. Los animales clasificados en el extremo con menores concentraciones de CORT “de perfil B” se correspondieron con el 24% de la población. Una vez establecidos los 2 potenciales grupos, se determinó si estos animales se diferenciaban estadísticamente entre sí en todas las variables analizadas.

Tabla 6.7: Media (\pm error estándar) de variables INE determinadas en grupos de individuos con Perfil A o

B.

PARÁMETRO	PERFIL		
	A	B	Probabilidad
CORT	$0,23 \pm 0,11^a$	$1,17 \pm 0,11^b$	$<0,0001$
Linfoproliferación	$24,17 \pm 1,79^a$	$7,71 \pm 1,74^b$	$<0,0001$
Ac GRO	$4,68 \pm 0,24^a$	$2,10 \pm 0,23^b$	$<0,0001$
FDL	$12,74 \pm 1,26^a$	$5,94 \pm 1,23^b$	$<0,0001$

CORT: concentración plasmática de corticosterona [ng/ml]; Linfoproliferación: linfoproliferación ante la inyección de PHA-P [% de cambio]; Ac GRO: título de anticuerpos contra glóbulos rojos de oveja; FDL: cociente obtenido a partir de la citometría de flujo. Los valores se expresan como media \pm error estándar.

Se observa que los potenciales perfiles seleccionados en base al procedimiento ya descrito se diferenciaban consistentemente además en todas las variables en análisis sugiriendo en consecuencia que luego de haber sido sometidos a estrés de tipo CVI, en una población de aves se manifiestan grupos con respuestas INE extremas. Estas poblaciones difieren biológica y estadísticamente en concentración plasmática de CORT, en linfoproliferación ante una inyección de una suspensión PHA-P, en título de anticuerpos inducidos contra GRO, y en FDL.

Para finalizar la caracterización de los 2 grupos extremos de animales, se prosiguió a caracterizar los niveles de expresión de los diferentes mediadores pro y anti-inflamatorios (expresión de ARNm para IFN- γ , IL-1 β , IL-13 e IL-4). En la Tabla 6.8 se puede apreciar que los 2 grupos que hasta el momento se diferenciaban en las variables ya analizadas también manifiestan una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de todos los mediadores analizados: IFN- γ , IL-1 β , IL-13 e IL-4. En la siguiente tabla se resumen todos los datos obtenidos en el estudio desarrollado.

Tabla 6.8: Resumen conjunto de todos los parámetros propuestos como necesarios para la determinación de FINEs en aves de la especie *Coturnix coturnix* luego de haber sido sometidas a un estrés CVI. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

PARAMETRO	PERFIL A	PERFIL B	Probabilidad	VECES DE CAMBIO
CORT	0,23 ± 0,11 ^a	1,17 ± 0,11 ^b	<0,001	5
Linfoproliferación	24,17 ± 1,79 ^a	7,71 ± 1,74 ^b	<0,001	3,13
Ac GRO	4,68 ± 0,24 ^a	2,10 ± 0,23 ^b	<0,001	2,22
FDL	12,74 ± 1,26 ^a	5,94 ± 1,23 ^b	<0,001	2,14
IFN-γ	85,21 ± 19,32 ^a	3,48 ± 0,77 ^b	<0,001	24
IL-1β	17,71 ± 4,15 ^a	0,97 ± 0,23 ^b	<0,001	18,25
IL-13	14,17 ± 6,43 ^a	187,36 ± 80,61 ^b	<0,001	13,22
IL-4	0,13 ± 0,05 ^a	1,88 ± 0,78 ^a	<0,001	14,46

CORT: concentración plasmática de corticosterona [ng/ml]; Linfoproliferación: linfoproliferación ante la inyección de PHA-P [% de cambio]; Ac GRO: título de anticuerpos contra glóbulos rojos de oveja; FDL: cociente obtenido a partir de la citometría de flujo. IFN-γ, IL-1β, IL-13 e IL-4: amplificación de ARNm de interferón γ, interleucina 1β, 13 y 14 [relativizada a control interno de β-actina]. Veces de cambio: Perfil/Perfil. Los valores se expresan como media ± error estándar.

Una vez caracterizados totalmente los grupos extremos en todas las variables de la interacción INE se realizó un análisis de proporciones para caracterizar las modificaciones inducidas por el estrés en relación a la distribución poblacional de los perfiles en la población de aves de la especie *Coturnix coturnix*. Los resultados se resumen en la Tabla 6.9.

Tabla 6.9: Proporciones de perfiles expresados en una población de aves de la especie *Coturnix coturnix* previo y post estrés CVI.

	Previo estrés	Post estrés	Probabilidad	Efecto post estrés
Animales expresando perfil A	0,14	0,23	0,067	Aumenta
Animales expresando perfil B	0,15	0,24	0,069	Aumenta
Animales de población intermedia	0,71	0,54	<0,01	Disminuye
Animales expresando algún perfil	0,29	0,46	<0,01	Aumenta

Por último, para poder describir más adecuadamente el fenómeno de cambio en las frecuencias relativas de expresión de perfiles extremos, se comparó la proporción de individuos que producto del estrés CVI modificaban su perfil de algún extremo al intermedio y viceversa. Esta información se resume en la tabla 6.10.

Tabla 6.10: Proporciones de cambios de perfiles expresados en una población de aves de la especie *Coturnix coturnix* producto de un estrés CVI.

Cambio fenotípico	Proporción de individuos	Cambio fenotípico	Proporción de individuos	Probabilidad
De perfil extremo (A o B) a población intermedia.	2/84 (2%)	De población intermedia a perfil extremo (A o B)	14/84 (16%)	0,008

6.4 Conclusiones parciales.

En base a la información condensada en las tablas 6.5 y 6.8 se pueden hacer las siguientes conclusiones referidas a la caracterización de FINEs en aves de la especie *Coturnix coturnix* previo y posterior a un estrés de tipo CVI:

Previo al desarrollo del protocolo de estrés se encontraron dos subgrupos de individuos con FINEs extremos. Las respuestas encontradas en cada grupo incluyen animales con altos o bajos niveles basales de CORT que mostraron perfiles de mediadores de la interacción INE opuestos, y ergo respuestas efectoras divergentes, mostrando un nexo también en este caso con el paradigma LEW/F344. Vale destacar que en comparación con los FINEs encontrados en el capítulo precedente, ahora se encuentra (tanto previo como post estrés) una diferencia a nivel de respuesta de la variable FDL (correlacionando la misma inversamente con CORT en el estudio informado en este capítulo). La diferencia principal entre ambos casos podría ser asignado a la edad de los animales ya que los resultados presentados en el capítulo anterior fueron obtenidos estudiando una población de animales que se encontraban en un período de desarrollo gonadal correspondiente a una primera etapa de haber alcanzado la madurez sexual (52 días de edad; equivalente a adolescencia tardía de mamíferos) y este capítulo se basó en el estudio de una población de animales estudiada en una edad (120 días de edad) donde las codornices son estables fisiológicamente y en adultez plena (Marin and Satterlee, 2004). El cambio en la respuesta de FDL no invalida el nexo planteado con el paradigma

LEW/F344 ya que la inversión de la fórmula leucocitaria es un dato registrado en la ontogenia de vertebrados superiores. De esta manera, las aves que en nuestro estudio se corresponderían con el fenotipo similar al de ratas LEW manifiestan en este caso el siguiente conjunto de variables: bajos niveles de CORT, asociado a esto muestran elevados niveles de FLD, de respuesta de linfoproliferación *in vivo* y de anticuerpos inducidos contra GRO, en conjunto con elevados niveles de los siguientes mediadores pro-inflamatorios: IFN- γ e IL-1 β , pero bajos los niveles de IL-13. Las aves con fenotipo similar a las ratas de la cepa F344 manifestaron niveles opuestos tanto de CORT como de los demás variables estudiadas.

Una vez desarrollado el protocolo de estrés y analizados los resultados se observa que en la población se encuentran los mismos FINEs extremos previo y post estrés CVI. Si bien, los fenotipos se configuran poblacionalmente de la misma manera en ambos casos, se observa sin embargo un incremento en el número de individuos que expresan cada uno de los extremos en la población en estudio, lógicamente en detrimento de los individuos que expresarían un fenotipo intermedio como se puede observar en el análisis de proporciones efectuado. El número de individuos que expresaron uno u otro FINE previo al protocolo de estrés se corresponde con aproximadamente el 15% (29% de individuos expresando algún FINE extremo) y luego del estrés el número de aves expresando cada FINE extremo corresponde al 23% lo que sugiere que una situación de estrés CVI induciría una polarización hacia la expresión de FINEs extremos dentro de la población de *Coturnix coturnix* adultas y en este caso, un 47% de la población total expresaría algún FINE extremo. Caracterizando aún más el fenómeno que tiene lugar luego del estresor empleado, se puede mencionar que del 100% de los individuos que poseían algún perfil en situaciones basales (sin estrés crónico), un 93% lo conserva formando parte luego del estresor de la misma subpoblación que se asocia a uno y otro FINE y un 7% manifiesta ahora un perfil intermedio. Resumiendo vale mencionar que el aumento en los animales expresando FINEs es significativo luego del estrés CVI empleado y, al mismo tiempo, la disminución en los animales que componen la población intermedia es significativa también. Al hacer un seguimiento de cada individuo previo y post estrés se confirma que el aumento de los grupos que expresan FINEs extremos es a expensas de individuos que componían la población intermedia. De esta manera se

caracteriza la modulación inducida por el estrés como inductora de la expresión de FINes de modo disruptivo.

**7. Evaluación de la interrelación
entre componentes del sistema INE
en *Gallus gallus*: estudio sobre
existencia y potencial distribución
poblacional de fenotipos
inmunoneuroendócrinos.**

7.1 Introducción.

Gallus gallus es la especie modelo de aves de granja por excelencia. El estudio de la biología de los sistemas inmune, nervioso y endócrino en aves de esta especie ha revelado información referida a vías de comunicación, mediadores, células, y otros componentes, comunes entre estos tres sistemas de integración (Carsia and Harvey, 2000; Kaiser et al., 2009; Mumma et al., 2006; Shini et al., 2010a, 2009). Esta información se ha detallado en las secciones correspondientes a la introducción general. Tanto en este capítulo como en el siguiente, se amplían los alcances de la Tesis a una especie de ave de granja que en comparación con la especie *Coturnix coturnix* estudiada en capítulos anteriores posee muchos más años de domesticación y de procesos dirigidos de selección genética orientados a la obtención de aves con desempeños biológicos extremos para maximizar la obtención de “productos” de consumo humano. De este modo se complementan los estudios con el objeto de aportar mayor solidez a las posibles conclusiones que se desprendan.

Como se mencionara en la sección 4.1.2, las aves empleadas en este estudio fueron parte de un experimento que evaluaba los efectos de la apariencia fenotípica y del tamaño de grupo sobre variables productivas y comportamentales. En este capítulo se describirán los aspectos referidos al estudio de variables de la interacción INE, con el objetivo de conocer si la interfaz de estos 3 sistemas confluye en la configuración de FINEs en aves de esta especie.

7.2 Materiales y métodos.

7.2.1 Determinación de FINE.

Para determinar el FINE de cada animal se realizaron las siguientes pruebas conforme lo detallado previamente (ver secciones 4.2 y 4.3):

- Linfoproliferación ante inyección de PHA-P.
- Titulación de Ac GRO.
- Cuantificación de CORT en suero.
- ELISA para citoquinas pro y anti-inflamatorias (IFN- γ e IL-4).
- Recuento leucocitario en extendido de sangre.

En base a lo desarrollado en capítulos previos en que se trabajó con aves de la especie *Coturnix coturnix* y para mantener un hilo coherente en el desarrollo de la presente Tesis, el análisis de los resultados se realizó de modo tal que siguiese los mismos lineamientos generales. Los datos obtenidos de cada variable (respuesta de linfoproliferación, Ac GRO, cociente Inn/Adq, concentración de CORT, IL-4 e IFN- γ) fueron caracterizados estadísticamente y se prosiguió del mismo modo que el descrito en el capítulo precedente.

La familia de análisis pertenecientes a la estadística multivariada permite realizar caracterización o estudios de variabilidad de un grupo de datos mediante la reducción de dimensionalidad que poseen los mismos, como se ha realizado hasta el momento con el ACP. Además y de modo complementario, con los datos de todas las variables analizadas en las aves de la especie *Gallus gallus* se desarrolló un análisis discriminante (AD), para caracterizar la población en base a una diferenciación pre-establecida. Estos análisis buscan alcanzar carácter predictivo en base al comportamiento de los datos teniendo siempre en consideración la clasificación pre-establecida y, por ende, en base al comportamiento de las variables de individuos estudiados. Se buscó a la vez construir una ecuación que relacione las variables de tal modo que posibilite la asignación con cierto grado de certeza de un nuevo individuo en alguno de los grupos definidos (ver desarrollo completo en la sección siguiente).

7.3 Resultados y discusión.

Una vez obtenidos los datos se descartó que el tamaño de grupo, la apariencia fenotípica y la ubicación de los animales en el bioterio influyeran en la respuesta a cada una de las variables analizadas, actuando de este modo como variables de “confusión” de resultados. Un ANOVA de 2 vías reveló que ninguno de los factores influyó de modo estadísticamente significativo sobre ninguna de las variables en análisis por lo que a partir de ese momento, y a los objetivos de la presente Tesis, los animales fueron considerados estadísticamente como una única población de 72 individuos (ver tabla 7.1).

Tabla 7.1: Efecto del tamaño de grupo (10 vs. 40), apariencia fenotípica (marcado vs. no marcado) y su interacción, y efecto de la ubicación sobre la respuesta de linfoproliferación in vivo, titulación de anticuerpos contra GRO, cociente Inn/Adq concentración de CORT, IL-4 e IFN- γ .

PARÁMETRO	<i>Probabilidad</i>			
	TAMAÑO de GRUPO	FENOTIPO	TAMAÑO x FENOTIPO	UBICACIÓN
CORT	0,34	0,69	0,95	0,78
Linfoproliferación	0,22	0,87	0,77	0,45
Ac GRO	0,91	0,96	0,94	0,28
Inn/Adq	0,58	0,65	0,63	0,36
IFN- γ	0,48	0,14	0,58	0,24
IL-4	0,93	0,51	0,12	0,54

Una vez contemplados los puntos previamente mencionados, se prosiguió al análisis estadístico de los datos con el objetivo de lograr una aproximación al posible perfil FINE de los animales. Se realizó un ACP donde se muestra la distribución de la totalidad de los datos estandarizados de las variables analizadas en los animales empleando como variables clasificatorias la concentración de CORT, linfoproliferación, cociente Inn/Adq, Ac GRO, IL-4 e IFN- γ . El gráfico resultante del análisis estadístico se muestra en la Figura 6.1.

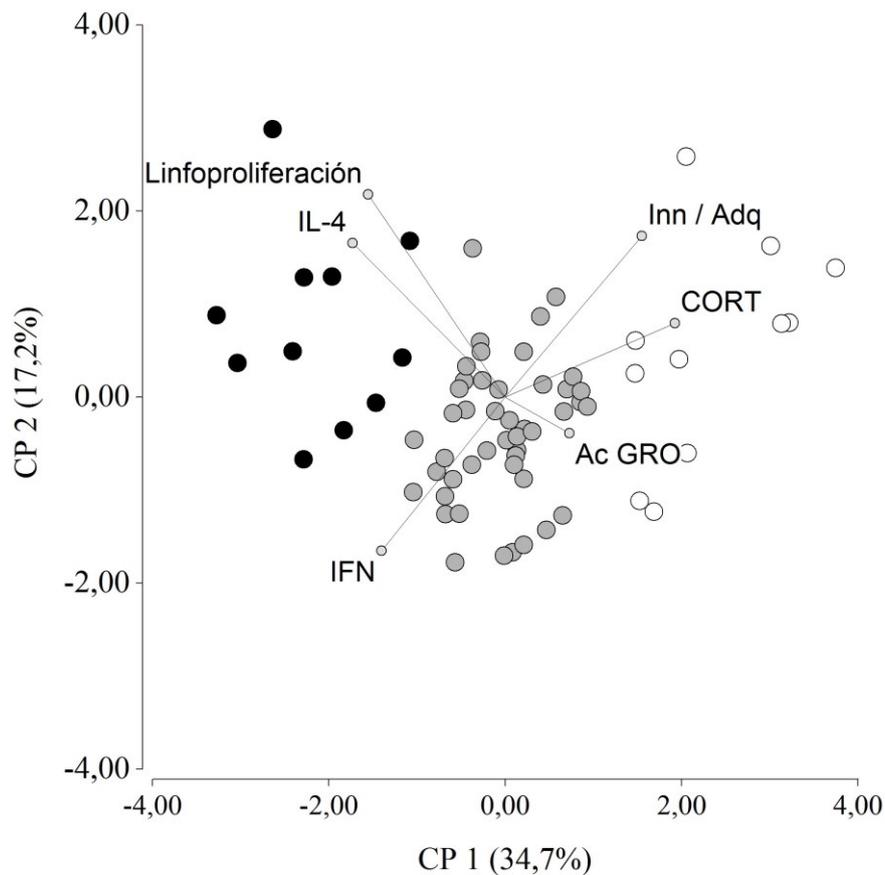


Figura 7.1: Gráfico de análisis de componentes principales empleando como variables clasificatorias la linfoproliferación, la titulación de Ac contra GRO, cociente Inn/Adq, concentración de CORT, IL-4 e IFN- γ . Los colores representan el potencial fenotipo extremo del animal. Se muestran en diferentes colores los diferentes grupos de animales. En negro, blanco y gris se representan respectivamente los animales que corresponderían al perfil A, B e intermedio (ver detalles de clasificación en perfiles más abajo en página siguiente). Número de animales en análisis: 72. Número de animales por grupo: A: 12 (16%), B: 12 (16%), intermedio: 48 (68%).

El análisis de los resultados en la Figura 7.1 indica existencia de correlación entre las variables, por lo que se prosigue a hacer una correlación de Pearson para caracterizar la relación entre las mismas. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 7.2.

Tabla 7.2: Coeficiente de correlación de Pearson entre CORT, Linfoproliferación, Ac GRO, cociente

	Inn/Adq, IL-4 e IFN- γ .				
	CORT	LINFOPROLIFERACIÓN	Ac GRO	Inn/Adq	IL-4
LINFOPROLIFERACIÓN	-0,33*				
Ac GRO	-0,29	-0,10			
Inn/Adq	0,39**	-0,16	0,03		
IL-4	-0,32**	0,42	-0,06	-0,19	
IFN- γ	-0,30*	0,12	-0,07	-0,25*	0,18

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. Los análisis fueron realizados en base a 72 animales estudiados.

El análisis de los resultados estadísticos y del gráfico que generó el ACP indica lo siguiente: el CP1 explica un 34,6% de la variabilidad total de los datos y el CP 2 explica un 17,4% de la variabilidad total. Se totaliza de esta manera un 52% de la variabilidad total de los datos explicada por estos 2 componentes. Nuevamente el análisis de los autovectores asociados a las variables de clasificación demuestra que CORT es la variable con mayor influencia positiva en la configuración del CP1 (autovector de 0,54), como sucedió también en la configuración del CP1 del análisis de FINEs en aves de la especie *Coturnix coturnix*. Basándose entonces en el valor de CORT y en la disposición de los puntos en el gráfico que el análisis arroja, se seleccionaron nuevamente dos grupos extremos de animales que pudiesen expresar los fenotipos buscados. A los animales correspondientes al extremo con mayor respuesta de CORT se los denominó arbitrariamente “de perfil A” y a los pertenecientes al grupo opuesto “de perfil B”. Una vez establecidos los 2 grupos representativos de 2 potenciales perfiles distintos, se corroboró mediante un ANOVA que el fenotipo y el tamaño de grupo no fuesen factores subyacentes a la diferenciación extrema de los mismos. Si bien estos factores ya habían sido analizados previamente, fue necesario re-analizarlos puesto que era posible que luego de realizada la clasificación mencionada, los extremos se hubiesen separado coincidiendo además con el fenotipo y el tamaño de grupo, en cuyo caso la principal variable subyacente a la diferenciación no sería necesariamente el potencial FINE (Tabla 7.2).

Tabla 7.3: Efecto del tamaño de grupo (10 vs. 40) y fenotipo (marcado vs. no marcado) sobre la variable perfil.

PARÁMETRO	Probabilidad		
	TAMAÑO DE GRUPO	FENOTIPO	TAMAÑO X FENOTIPO
Perfil	0,484	0,484	0,305

Posteriormente, se determinó si estos animales se diferenciaban estadísticamente entre sí en todas las variables analizadas, intentando de esta manera delimitar grupos de animales con respuestas comunes dentro del grupo y opuestas entre grupos en todos los parámetros en estudio (Tabla 7.3). Se realizaron ANOVAs para conocer el efecto de los factores perfil (A vs. B) sobre las variables concentración plasmática de CORT, linfoproliferación ante la inyección de PHA-P, título de anticuerpos contra GRO, cociente Inn/Adq y concentración de citoquinas pro y anti-inflamatorias (IFN- γ e IL-4 respectivamente).

Tabla 7.4: Efecto del perfil (A vs. B) sobre la concentración plasmática de CORT, la linfoproliferación, el título de anticuerpos contra GRO, el cociente Inn/Adq y la concentración de citoquinas pro y anti-inflamatorias (IFN- γ e IL-4, respectivamente).

PARÁMETRO	Probabilidad
	PERFIL
CORT	0,0001
Linfoproliferación	0,0001
Inn/Adq	0,045
Ac GRO	0,0002
IFN- γ	0,0001
IL-4	0,0066

Como se puede observar en la Tabla 7.3, los perfiles seleccionados en base al procedimiento ya descrito se diferenciaron en todas las variables estudiadas. Vale destacar (además de todas las salvedades consideradas respecto del tamaño de grupo, orden de muestro de los animales, etc.) que salvo el potencial efecto que pudieran inducir los cambios fenotípicos realizados al primer día de vida, estas aves no fueron sometidas deliberadamente a otro tipo de tratamiento o estresor, por lo que estarían expresando de un modo natural 2 extremos de respuesta en las variables analizadas

potencialmente afectados solo por el cambio a edad muy temprana de sus fenotipo. Vale destacar que cambios fenotípicos al momento del nacimiento, si bien pueden inducir cambios comportamentales, se ha observado que sus efectos son a corto plazo y posiblemente las aves se adaptan rápidamente o dejan de percibir las diferencias en sus fenotipos, ya que todas parecen comportarse de acuerdo a la teoría de parentesco (Guhl and Ortman, 1953; Guhl, 1958; Marin et al., 2014). Para caracterizar más adecuadamente los extremos mencionados, en la Tabla 7.4 se muestran los valores medios correspondientes a cada variable teniendo en cuenta los 2 grupos extremos de respuesta.

Tabla 7.5: Media (\pm error estándar) de variables INE determinadas en grupos de individuos con Perfil A o B.

PARÁMETRO	PERFIL		Probabilidad	VECES DE CAMBIO
	A	B		
CORT	$0,2 \pm 0,25^a$	$2,4 \pm 0,25^b$	0,0001	12
Linfoproliferación	$92,92 \pm 7,22^a$	$29,58 \pm 7,22^b$	0,0001	3
Inn/Adq	$0,58 \pm 0,29^a$	$2,42 \pm 0,29^b$	0,0002	4,17
Ac GRO	$5,33 \pm 0,57^a$	$7,33 \pm 0,67^b$	0,045	1,37
IFN- γ	$348,9 \pm 41,7^a$	$171,8 \pm 41,7^b$	0,0001	2
IL-4	$82,82 \pm 6,9^a$	$32,92 \pm 6,9^b$	0,0066	2,56

CORT: concentración plasmática de corticosterona [ng/ml]; Linfoproliferación: linfoproliferación ante la inyección de PHA-P [% de cambio]; Ac GRO: título de anticuerpos contra glóbulos rojos de oveja; Inn/Adq: cociente obtenido a partir del análisis de extendidos de sangre. IFN- γ : concentración plasmática de interfeferón- γ [pg/ml]. IL-4: concentración plasmática de interleucina 4 [pg/ml]. Veces de cambio: Perfil/Perfil.

Con el objetivo de profundizar en la relación entre las variables en la configuración de los FINEs encontrados en esta especie animal y para desarrollar teóricamente la posibilidad de la asignación de un individuo nuevo a alguno de los fenotipos extremos (o a la subpoblación de individuos con fenotipo intermedio) se realizó un AD empleando como variables aquellas usadas para determinar los perfiles. El resultado del análisis se resume en la Figura 7.2.

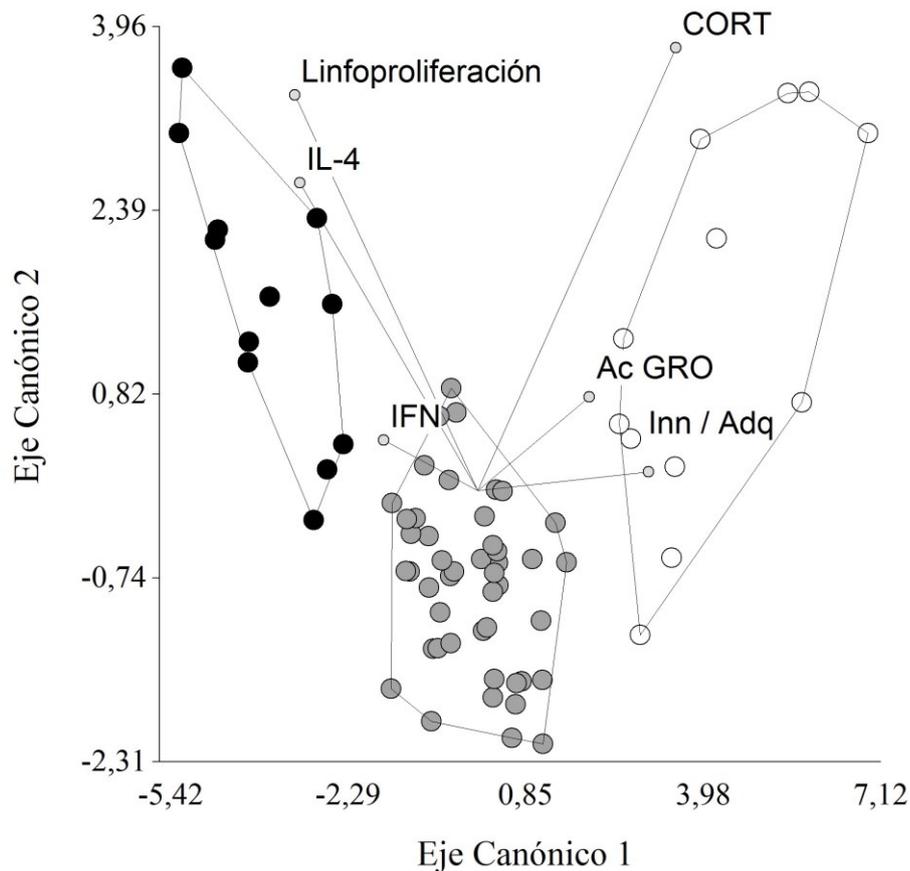


Figura 7.2: Gráfico de análisis discriminante empleando como variables linfoproliferación, titulación de Ac GRO, cociente Inn/Adq, concentración de CORT, IL-4 e IFN- γ . Se muestran en diferentes colores los diferentes grupos de animales definiéndolos además mediante líneas de contorno. Color negro, blanco y gris indican grupos de animales de perfil A, B e intermedio respectivamente. Número de animales en análisis: 72. Número de animales por grupo: A: 12, B: 12, intermedio: 48.

El análisis del gráfico obtenido en el espacio discriminante conformado por los dos ejes canónicos (EC) indica que la diferenciación de los individuos según el desarrollo del EC1 logra explicar el 82% de la variabilidad encontrada, siendo el eje que asegura la máxima diferenciación entre los grupos conformados *a priori*. El EC2 explica el 18% restante y no es un buen predictor para la asignación de un nuevo individuo a un grupo determinado, lo cual se puede apreciar proyectando los puntos del gráfico sobre el EC2. En base al análisis de tablas de clasificación cruzada se determina que el error de clasificación empleando la función obtenida del EC1 es nulo. La siguiente función discriminante lineal permite describir la relación entre variables:

$$Y = 0,63 (\text{CORT}) + 0,55 (\text{Inn/Adq}) + 0,36 (\text{Ac GRO}) - 0,58 (\text{Linfoproliferación}) - 0,57 (\text{IL-4}) - 0,3 (\text{IFN-}\gamma).$$

Función 7.1: Función discriminante obtenida a partir de los coeficientes indicados en el análisis discriminante realizado con las variables: linfoproliferación in vivo, titulación de anticuerpos contra GRO, cociente Inn/Adq, concentración de CORT, IL-4 e IFN- γ .

Este estudio informa que la variable CORT es la de mayor incidencia en la configuración del EC1. Este dato reviste suma importancia porque al ser la variable empleada en la definición de los fenotipos extremos, debe manifestar un peso significativo a la hora de definir el EC1. De esta manera ante la eventual situación de repetición de una experiencia en igualdad de condiciones a las que tuvieron lugar para el desarrollo de este experimento, se podría a partir del valor de cada variable y empleando la función descrita predecir la ubicación de cada uno de los individuos en los grupos correspondientes a cada FINE definido en principio con un 100% de certeza en este procedimiento de asignación. Sería interesante evaluar si esta capacidad predictiva de fenotipos INE continúa con tan alto nivel bajo otras condiciones de cría o situaciones ambientales. Vale además realizar la salvedad que para poder desarrollar un análisis discriminante todas las variables empleadas en la construcción de la función deben estar analizadas en todos los individuos de la población. Esta es la razón por la cual este tipo de metodología no pudo ser introducida o propuesta en los capítulos anteriores.

7.4 Conclusiones parciales.

Una vez caracterizadas las variables estamos en condiciones de mencionar que en un estudio realizado en una población de 72 aves de granja perteneciente a la especie *Gallus gallus* criadas en condiciones control se encontraron 2 grupos extremos que difieren consistentemente en su respuesta a los parámetros analizados. Estos grupos extremos de aves difieren en su concentración de CORT, respuesta de linfoproliferación *in vivo*, título de anticuerpos inducidos contra GRO, cociente de células de la inmunidad innata / adquirida, IL-4 e IFN- γ . En esta población de aves nuevamente se ha encontrado entonces un nexo con el paradigma LEW/F344. Específicamente en la distribución poblacional estas aves se corresponden con el 15% extremo del total de la población (12 individuos cada grupo) y la caracterización de cada grupo sería la siguiente: los animales

correspondientes al perfil de respuesta A o símil-LEW poseen (en comparación con los de un perfil de respuesta B o símil-F344) niveles plasmáticos de CORT bajos, respuestas de linfoproliferación *in vivo*, un cociente de células de inmunidad innata/adquirida y títulos contra GRO bajos y niveles altos de citoquinas, con predominio de IFN- γ . Esto indicaría que la existencia de un perfil o FINE en una población determinada sería un rasgo común de las especies *Gallus gallus* y *Coturnix coturnix*, manifestándose espontáneamente sin manipulaciones de tipo inductivas. Esto implicaría que en una población dada de las especies estudiadas se desarrollaría una categorización poblacional en subpoblaciones (correspondiente con el 30% de sus individuos, 15% correspondiente a cada FINE particular) que manifiestan características diferenciales de la interacción inmunoneuroendócrina, como producción de citoquinas anti/pro-inflamatorias y niveles de mediadores, lo cual conlleva una distinta actividad en los efectores asociados (respuestas proliferativas o síntesis de anticuerpos específicos).

8. Evaluación de un estrés crónico social como modulador de la expresión y distribución de fenotipos inmunoneuroedócrinos en *Gallus gallus*.

8.1 Introducción.

Las aves empleadas en esta experiencia corresponden al mismo lote de animales de la especie *Gallus gallus* que se utilizó en el experimento anterior y por lo tanto, el análisis previo al estrés ya fue presentado en la sección anterior y el análisis post-estrés se presenta en este capítulo. De este modo, cronológicamente, luego de haber caracterizado sus variables INE y propuesto la clasificación en FINEs divergentes, las aves fueron en edad adulta sometidas a un estresor de cambio en el fenotipo artificial de una proporción de individuos dentro del grupo social y por lo tanto, generando interacciones sociales que sugerían que las aves claramente estuvieron sometidas a un estrés crónico social (Liste, Campderich, Estevez, datos no publicados). La primera determinación previa al estrés fue considerada como representante de la situación basal (capítulo 6) y la nueva valoración y clasificación de los animales al finalizar el protocolo de estrés es presentada en este capítulo. En la introducción de la presente tesis se presenta información que avala que los estresores sociales pueden influir en las respuestas inmuno-neuroendócrinas y, de hecho, es en base a uno de ellos (alteración de grupo social) que se desarrollan en aves los primeros experimentos que relacionan la respuesta de estrés con variables inmunológicas (Gross, 1989, 1972).

El objetivo particular de este capítulo se enfoca en estudiar el potencial efecto modulador de un estrés crónico de tipo social sobre la expresión a nivel poblacional de los FINEs en gallinas. Una vez determinado si existe algún tipo de modulación en la expresión de FINEs a nivel poblacional se intentará profundizar en la caracterización de la modulación existente, comparando además la misma con lo descrito en el capítulo donde se analizaron y presentaron los efectos de un estrés CVI sobre la expresión de FINEs en codornices (capítulo 6).

8.2 Materiales y Métodos.

8.2.1 Caracterización del estresor crónico social.

La caracterización del estresor fue desarrollada ya en la sección correspondiente (4.5.2) en el capítulo de material y métodos generales (4). De todos modos se recordará que el estresor social se basó en que los individuos fueron periódicamente expuestos a cambios en la conformación fenotípica de sus grupos con el consecuente disturbio social

que ello originaba. Vale nuevamente aclarar que con el principal objetivo de mantener coherencia en el desarrollo de los métodos sobre los cuales se sustenta el desarrollo del presente escrito, el análisis de los datos es idéntico al realizado en los experimentos descritos en los capítulos precedentes.

8.3 Resultados y discusión.

Se procedió a descartar la existencia de variables de “confusión”, para lo que se hicieron diferentes pruebas estadísticas que demostraron que no existía efecto significativo sobre las variables de respuesta del tamaño de grupo, del marcaje de las aves, ni de la ubicación de los animales en el bioterio. Luego de corroborado lo previo, se realizó un ACP con los datos empleando como variables clasificatorias Linfoproliferación, titulación de Ac GRO, cociente Inn/Adq, concentración de CORT, IL-4 e IFN- γ , el gráfico obtenido se muestra en la Figura 8.1.

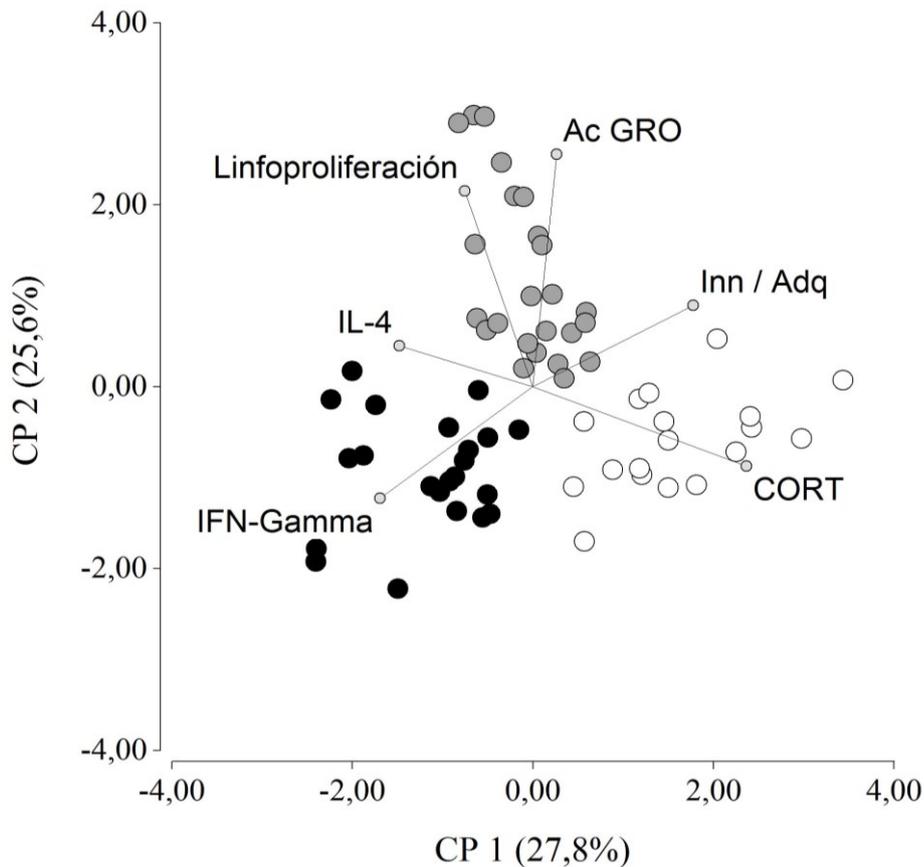


Figura 8.1: Gráfico de análisis de componentes principales empleando como variables clasificatorias Linfoproliferación, titulación de Ac GRO, cociente Inn/Adq, concentración de CORT, IL-4 e IFN- γ . Se muestran en diferentes colores los diferentes grupos de animales. En negro, blanco y gris se representan respectivamente los animales que corresponderían al perfil A, B e intermedio (ver detalles de clasificación en perfiles en página siguiente). Número de animales en análisis: 69. Número de animales por grupo: A: 19 (28%), B: 21 (30%), intermedio: 29 (42%).

El ACP indica que el CP1 explica el 27,8% de la variabilidad total de los datos y el CP2 el 25,6%. La variable con mayor influencia en la configuración del CP1 es nuevamente CORT con un autovector de 0,62. El análisis de los resultados presentados en la Figura 7.1 indica existencia de correlación entre las variables, por lo que se prosigue a hacer una correlación de Pearson para caracterizar la relación entre las mismas. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 8.1.

Tabla 8.1: Coeficiente de correlación de Pearson entre CORT, Linfoproliferación, Ac GRO, cociente Inn/Adq, IL-4 e IFN- γ .

	CORT	LINFOPROLIFERACIÓN	Ac GRO	Inn/Adq	IL-4
LINFOPROLIFERACIÓN	-0,26*				
Ac GRO	-0,17	0,32			
Inn/Adq	0,34**	0,07*	0,19		
IL-4	-0,26*	0,07	0,04	-0,08	
IFN- γ	-0,25*	0,01	-0,30	-0,16	0,12

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. Los análisis fueron realizados en base a 69 animales estudiados.

Luego de la caracterización de las relaciones entre las variables y luego de la caracterización de CORT en base al ACP, nuevamente se hace un ordenamiento de los datos empleando esta variable. Se escogen animales extremos según este ordenamiento y según su distribución en el gráfico de puntos producto del ACP y se los vuelve a denominar de perfil A y B de acuerdo posean el mayor o menor nivel de CORT respectivamente. Se corrobora nuevamente que no haya efecto de los factores fenotipo o tamaño de grupo ni interacción sobre la variable perfil. El efecto de la categorización de los animales en los 2 grupos sobre las demás variables en análisis se muestra en la Tabla 8.2.

Tabla 8.2: Media (\pm error estándar) de variables INE determinadas en grupos de individuos con Perfil A o

B.

PARÁMETRO	PERFIL		Probabilidad	VECES DE CAMBIO
	A	B		
CORT	0,58 \pm 0,02 ^a	3,1 \pm 0,02 ^b	0,0001	5,34
Linfoproliferación	17,45 \pm 1,53 ^a	10,84 \pm 1,65 ^b	0,0056	1,61
Ac GRO	4,73 \pm 0,22 ^a	5,63 \pm 0,23 ^b	0,0074	1,19
Inn/Adq	1,68 \pm 0,24 ^a	3 \pm 0,27 ^b	0,0008	1,78
IFN- γ	501,5 \pm 55 ^a	111,2 \pm 58 ^b	0,0001	4,5
IL-4	149,3 \pm 7 ^a	116,2 \pm 7,5 ^b	0,0027	1,28

CORT: concentración plasmática de corticosterona [ng/ml]; Linfoproliferación: linfoproliferación ante la inyección de PHA-P [% de cambio]; Ac GRO: título de anticuerpos contra glóbulos rojos de oveja; Inn/Adq: cociente obtenido a partir del análisis de extendidos de sangre. IFN- γ : concentración plasmática de interfeferón- γ [pg/ml]. IL-4: concentración plasmática de interleucina 4 [pg/ml]. Veces de cambio: Perfil/Perfil.

Como se puede observar, el fenómeno de expresión de FINes se evidencia también en aves de *Gallus gallus* que fueron sometidas al protocolo de estrés crónico social y encontrándose nuevamente la misma configuración de variables efectoras y mediadoras de la INE asociadas el nivel basal de CORT que se encontró previo al estrés (ver capítulo 6). Una vez caracterizados totalmente los grupos extremos en todas las variables de la interacción INE se realizó un análisis de proporciones para caracterizar la modulación inducida por el estrés en relación a la distribución poblacional de los perfiles en la población de aves de la especie *Gallus gallus*. Los resultados se resumen en la Tabla 8.3.

Tabla 8.3: Análisis de proporciones de perfiles expresados en una población de aves de la especie *Gallus gallus* previo y post estrés social.

	Previo estrés	Post estrés	Probabilidad	Efecto post Estrés
Animales expresando perfil A	0,17	0,28	0,05	Aumenta
Animales expresando perfil B	0,17	0,30	<0,02	Aumenta
Animales de población intermedia	0,67	0,42	<0,01	Disminuye
Animales expresando algún perfil extremo	0,33	0,58	<0,01	Aumenta

Para poder describir más adecuadamente el fenómeno de cambio en las frecuencias relativas de expresión de perfiles extremos como se realizó en el análisis de los efectos de un estrés CVI en codornices, se comparó la proporción de individuos producto del estrés social en una población de gallinas modificaban su perfil de algún extremo al intermedio y viceversa. Esta información se resume en la tabla 8.4.

Tabla 8.4: Proporciones de cambios de perfiles expresados en una población de aves de la especie *Gallus gallus* producto de un estrés social.

Cambio fenotípico	Proporción de individuos	Cambio fenotípico	Proporción de Individuos	Probabilidad
De perfil extremo (A o B) a población intermedia.	3/69 (4%)	De población intermedia a perfil extremo (A o B)	19/69 (27%)	0,02

Con el objetivo de caracterizar el cambio ante un desafío ambiental de la población intermedia de aves de la especie *Coturnix coturnix* en comparación con la especie *Gallus gallus*, se realizó un análisis de proporciones comparando la proporción de individuos que en ambas especies cambiaron por efecto del estrés de una población intermedia a un perfil extremo (A o B). Los resultados se condensan en la Tabla 8.5.

Tabla 8.5: Proporciones de cambios de individuos de una población intermedia a perfil extremo en la especies *Coturnix coturnix* y *Gallus gallus* producto de un protocolo de estrés*.

Especie	Proporción de individuos	Especie	Proporción de Individuos	Probabilidad
<i>Coturnix coturnix</i>	14/84 (16%)	<i>Gallus gallus</i>	19/69 (27%)	0,05

**Coturnix coturnix*: protocolo de estrés crónico, variado e impredecible. *Gallus gallus*: protocolo de estrés crónico social.

Para cerrar el conjunto de resultados obtenidos a partir de la experiencia en análisis, en la Figura 8.2 se plasman los resultados que arrojó el AD.

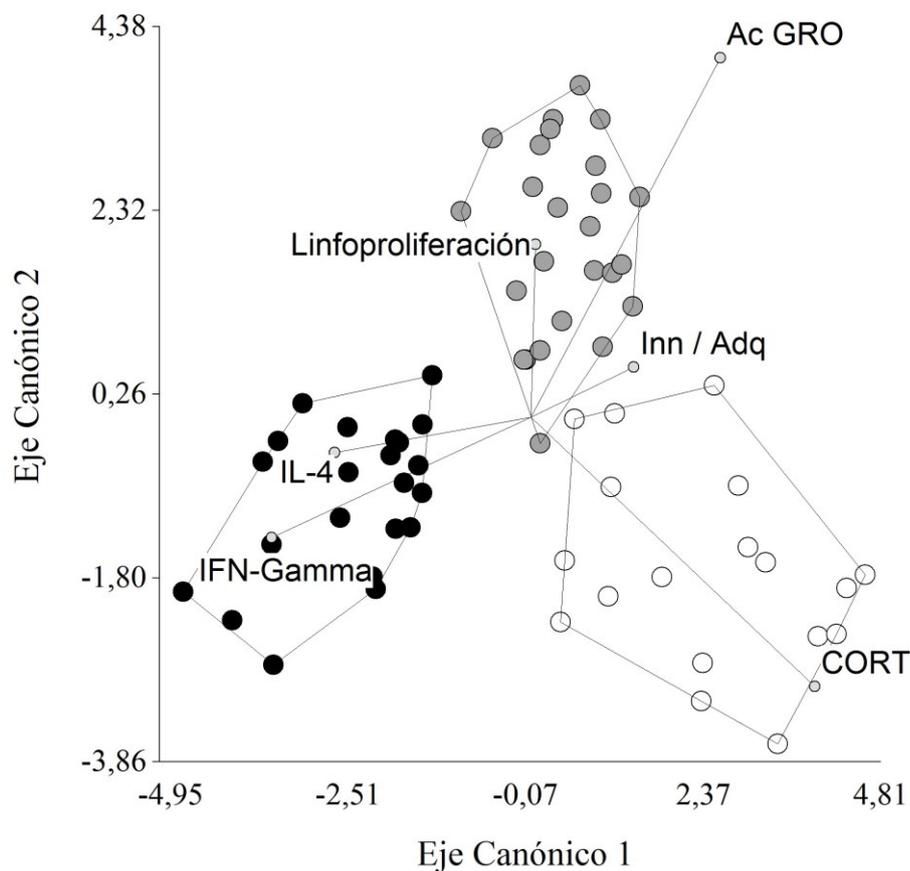


Figura 8.2: Gráfico de análisis discriminante empleando como variables linfoproliferación, titulación de Ac GRO, cociente Inn/Adq, concentración de CORT, IL-4 e IFN- γ . Se muestran en diferentes colores los diferentes grupos de animales definiéndolos además mediante líneas de contorno. Color negro, blanco y gris indican grupos de animales de perfil A, B e intermedio respectivamente. Número de animales en análisis: 69. Número de animales por grupo: A: 19, B: 21, intermedio: 29.

El análisis del gráfico obtenido en el espacio discriminante indica que la diferenciación de los individuos según el desarrollo del EC1 explica el 60% de la variabilidad encontrada, siendo el eje que asegura la máxima diferenciación entre los grupos conformados a priori. Si bien luego del estrés se observa un mayor porcentaje explicado por el EC2 que en situación basal (40% vs. 18 %, respectivamente), no se considera que sea un buen predictor para la asignación de un nuevo individuo a un grupo determinado. En base al análisis de tablas de clasificación cruzada se determina que el error de clasificación empleando la función obtenida del EC1 es del 3,08%. La función que se obtiene y que relaciona las variables entre sí de manera lineal es la siguiente:

$$Y = 0,71 (\text{CORT}) + 0,26 (\text{Inn/Adq}) + 0,47 (\text{Ac GRO}) - 0,01 (\text{Linfoproliferación}) - 0,49 (\text{IL-4}) - 0,65 (\text{IFN-}\gamma).$$

Función 8.1. Función discriminante obtenida a partir de los coeficientes indicados en el análisis discriminante realizado con las variables: linfoproliferación in vivo, titulación de anticuerpos contra GRO, cociente Inn/Adq, concentración de CORT, IL-4 e IFN- γ .

Este estudio informa que la variable CORT es la de mayor incidencia en la configuración del EC1. De esta manera se podría a partir del valor de cada variable, ante la eventual situación de repetición de una experiencia en igualdad de condiciones a las que tuvieron lugar para el desarrollo de este experimento, emplear la función 2 para predecir la ubicación de cada uno de los individuos en los grupos correspondientes a cada FINE definido.

8.4 Conclusiones parciales.

Luego de analizar los resultados obtenidos se basará esta conclusión en la **comparación de los perfiles que se expresaron en la población antes del desarrollo del estrés y luego del mismo**. Se encontró que los FINes están presentes luego del estrés, y más aún, éstos se encuentran representados por un número mayor de individuos que antes. Otro dato que reviste importancia es el hecho de que los fenotipos se configuran nuevamente en torno a niveles basales de CORT. En concreto en cuanto a la caracterización de cada variable, los animales correspondientes al perfil símil-LEW (perfil A) poseen, en comparación con los de un perfil símil-F344 (perfil B): niveles plasmáticos de CORT bajos, respuestas de linfoproliferación *in vivo* y un cociente de células de inmunidad innata/adquirida bajo, títulos contra GRO bajos y niveles altos de citoquinas, con predominio de IFN- γ . Luego del estrés, la agrupación de aves que manifiestan uno u otro perfil extremo se corresponde con un porcentaje de individuos igual al 58% de la población (28 y 30%, Perfil A y B, respectivamente). Este dato no es menor y posiblemente implicaría que luego de un evento estresante los perfiles no sólo se mantienen en la población sino que el número de individuos que presentan esos perfiles extremos se incrementa. Para caracterizar aún más el fenómeno que ocurre luego del estresor empleado, se puede mencionar lo siguiente: del 100% de los individuos que poseían algún perfil en situaciones basales (sin estrés crónico), un 88% lo conserva

formando parte luego del estresor de la misma subpoblación que se asocia a uno y otro FINE; un 4% invierte su perfil al opuesto y un 8% manifiesta ahora un perfil intermedio. De la población intermedia, un 40% manifiesta ahora un perfil extremo. Teniendo en cuenta el estudio de proporciones realizado, en la población de aves de esta especie también se observa que el aumento en la proporción de animales que expresa un FINE extremo es significativo luego del estrés social empleado. La disminución en los animales que componen la población intermedia es significativa luego del estrés. Al hacer un seguimiento de cada individuo previo y post estrés se confirma nuevamente que el aumento de los grupos que expresan FINEs extremos es a expensas de esta población intermedia. De esta manera se caracteriza en esta especie también la modulación por el estrés como inductora de la expresión de FINEs de modo disruptivo, de la misma manera que sucedió en el caso del estudio de los efectos de un estrés de tipo CVI sobre la distribución poblacional de FINE en aves de la especie *Coturnix coturnix*. Además se observa que el porcentaje de individuos que cambian de la población intermedia a un perfil extremo luego del protocolo de estrés correspondiente es mayor en aves de la especie *Gallus gallus*.

Haciendo referencia a la información brindada por los análisis multivariados y la función discriminante que se obtiene, se puede notar un aumento en el error probable observado en las pruebas de análisis discriminantes post-estrés. De una manera práctica esto implica que en condiciones control los animales podrían ser asignados a uno u otro perfil de manera probablemente inequívoca (error 0%), pero luego de un protocolo de estrés la asignación de aves a alguna categoría lleva aparejado un error del 3%. Por otro lado, a través de la interpretación del porcentaje de variabilidad que explicaría cada EC, se puede mencionar que previo al estrés el EC1 explicaba el 80% de la misma y luego el 60%. Esto implica que luego del estrés se puede explicar un 20% menos de variabilidad poblacional.

9. Discusión general, conclusiones finales y construcciones futuras.

9.1 Discusión General.

9.1.1 Definición de variables para caracterizar un FINE en aves.

El primer aporte que reviste importancia de esta tesis consiste en la definición de las variables cuyo análisis posibilitaría definir un FINE en dos especies de aves de granja que difieren en su grado de domesticación y que han sido sometidas a diferentes procesos de selección por caracteres de interés: *Coturnix coturnix* y *Gallus gallus*. Si bien este aporte se corresponde con un alcance principalmente teórico es éste el que sustenta el desarrollo de la presente Tesis. Para su realización fue necesaria una extensa búsqueda y revisión bibliográfica referida a desarrollos teóricos en las áreas de la inmuno-neuroendocrinología de especies de vertebrados superiores (Besedovsky and del Rey, 2013; Besedovsky et al., 1975; Correa et al., 2007; Davison et al., 2011; Downing and Miyani, 2000; Elenkov et al., 2008, 2000; Koolhaas, 2008; Ligier and Sternberg, 1999; Mumma et al., 2006; Puvadolpirod and Thaxton, 2000; Shini et al., 2010a; Sternberg et al., 1989). De este modo se logró establecer un conjunto de variables principales y se implementó la metodología necesaria para su valoración y posterior análisis. En la Figura 8.1 se pueden visualizar de modo comparativo las variables empleadas en uno y otro modelo de ave.



Coturnix coturnix

CORT
Linfoproliferación
Ac GRO
FLD
IFN- γ e IL-1 β
IL-13 e IL-4



Gallus gallus

CORT
Linfoproliferación
Ac GRO
Inn/Adq
IFN- γ
IL-4

Figura 9.1: Resumen de las variables empleadas en cada modelo animal objeto de la presente tesis para definir y estudiar los FINEs. Hormonales: niveles basales de corticosterona (CORT). Efectores de la interacción INE: linfoproliferación ante la inyección de PHA-P, título de Ac inducidos por la inyección de GRO, cocientes representativos de poblaciones leucocitarias (FLD o Inn/Adq). Mediadores de la interacción INE: IFN- γ , IL-1 β (pro-inflamatorios), IL-13 e IL-4 (anti-inflamatorios).

9.1.2 Expresión de FINEs en condiciones basales en dos especies de aves de granja: *Coturnix Coturnix* y *Gallus gallus*.

Para comenzar se resumirá la configuración de los perfiles en ambas especies de aves empleadas como modelo en la presente tesis, en situaciones en que los animales no fueron sometidos a estresores. Con este fin se han realizado las siguientes imágenes a modo ilustrativo de los fenómenos descriptos.

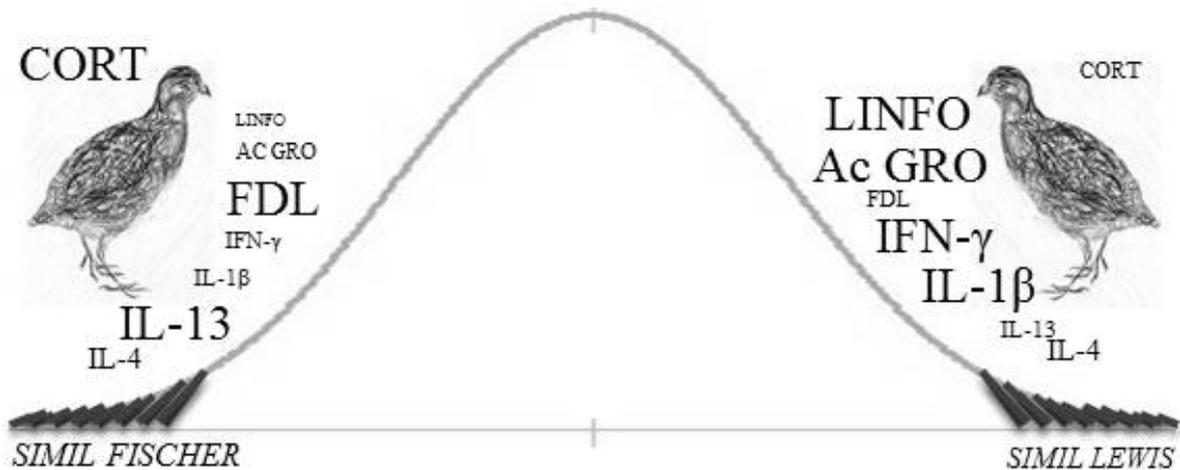


Figura 9.2: Representación esquemática de los grupos extremos de animales que expresan uno u otro FINE en aves de la especie *Coturnix coturnix*. Las variables seleccionadas para determinar la existencia de FINE se encuentran rodeando cada animal y su tamaño relativo representa si ese grupo posee alto o bajo nivel de respuesta en la variable citada. Hormonales: niveles basales de corticosterona (CORT). Efectores de la interacción INE: linfoproliferación ante la inyección de PHA-P (LINFO), título de Ac inducidos por la inyección de GRO, cocientes de poblaciones leucocitarias (FLD). Mediadores de la interacción INE (ARNm): IFN- γ , IL-1 β (pro-inflamatorios), IL-13 e IL-4 (anti-inflamatorios).



Figura 9.3: Representación esquemática de los grupos extremos de animales que expresan uno u otro FINE en aves de la especie *Gallus gallus*. Las variables seleccionadas para determinar la existencia de FINE se encuentran rodeando cada animal y su tamaño comparativo representa si ese grupo posee alto o bajo nivel de respuesta en la variable dada. Hormonales: niveles basales de corticosterona (CORT). Efectores de la interacción INE: linfoproliferación ante la inyección de PHA-P (LINFO), título de Ac inducidos por la inyección de GRO, cocientes de poblaciones leucocitarias (Inn/Adq). Mediadores de la interacción INE (proteínas séricas): IFN- γ (pro-inflamatorio) e IL-4 (anti-inflamatorio).

Los hallazgos resumidos en las Figuras 9.2 y 9.3 amplían el alcance hasta donde la noción FINE podría ser aplicada y considerada en futuros estudios. Haciendo una comparación entre las respuestas de las variables definidas para la caracterización de los FINEs resulta importante destacar diversos aspectos comunes. En primer lugar, la respuesta encontrada tanto de los efectores como de los mediadores INE se da en torno al nivel basal de CORT. Esta hormona es un representante clave del eje HPA y por ende resulta vital en las interacciones INE y además es la misma hormona considerada basal en la configuración del paradigma LEW/F344 (Bhatnagar and Meaney, 1995; Dominique Hazard et al., 2008; Koolhaas, 2008; Sternberg et al., 1989). En segundo lugar, la proporción de la población que expresa uno u otro perfil respecto al total poblacional es siempre cercana al 15% (30% en conjunto), independientemente de la especie animal con la que se trabaje, lo que podría ser considerado como una estrategia fisiológica común en los grupos animales estudiados hasta el momento. En tercer lugar, amerita destacar el hecho que ambos tipos de perfiles caracterizados en las 2 especies de aves estudiadas se manifiestan de modo tal que desarrollan un paralelo o nexo existente en aves con el paradigma LEW/F344 de mamíferos (Elenkov et al., 2008; Sternberg and Hill, 1989; Sternberg et al., 1989).

Las consecuencias de la ocurrencia de FINEs como un fenómeno en las especies aviares podría revestir gran importancia como una estrategia evolutiva (ver más abajo). Este hecho sugiere la existencia de animales adultos dentro de una población con diferente disposición de las interacciones INE. La ventaja de distintos y coexistentes FINEs puede ser una mayor capacidad como grupo para hacer frente a una amplia gama de desafíos que exijan respuestas plásticas en el contexto de la interacción INE. En este sentido una población homogénea que expresara un solo FINE podría encontrar esta posibilidad plástica de respuesta limitada, lo que representaría una gran desventaja.

Haciendo una aproximación desde la perspectiva de la ecología de poblaciones, existe la posibilidad de considerar los grupos de aves en análisis en el marco de la propuesta de Pedersen y Fenton (2007) de sistemas de multi-huéspedes con potenciales multi-patógenos (Cox, 2001; Kaufman, 2010; May, 2006; Pedersen and Fenton, 2007). Si bien el modelo planteado en 2007 hace referencia principalmente a patógenos parasitarios, para la discusión presente se propone ampliar la gama de patógenos para

incluir virus, bacterias, protozoos además de parásitos. De esta manera, si se piensa a las relaciones entre los patógenos y los huéspedes como una cadena trófica se podrían modelar a los primeros como presas y a los segundos como predadores. Para ser más específicos, los predadores serían los componentes de defensa del huésped que entran en juego para defenderse del patógeno y “consumirlo”. Estos últimos ocuparían el lugar de presas en el contexto en el cual nos basaremos para la siguiente discusión. La riqueza del eslabón trófico de predadores estará dada por las capacidades de cada individuo si se hace un análisis a escala individual, o por las capacidades de la población si esa es la escala escogida para el análisis. A escala individual, los diversos componentes del sistema de respuesta de los animales serían comparables a predadores diferentes en el gradiente de especialista a generalista, con potenciales interacciones entre ellos. Por ejemplo una respuesta sistémica de aumento de temperatura (fiebre) sería una estrategia generalista, mientras que la respuesta especialista opuesta se daría por anticuerpos contra un determinado antígeno. La riqueza de las presas en estas interacciones tróficas sería la carga patogénica del ambiente en donde se analice la interacción (Cox, 2001; Kaufman, 2010; Pedersen and Fenton, 2007). Además que también existe la posibilidad de diversas interacciones entre los componentes de este eslabón como la competencia, la facilitación (mecánica o fisiológica), etc. Resulta de importancia destacar un concepto: el nivel trófico correspondiente a la presas consumiría y obtendría energías de un nivel basal que está constituido por los recursos del huésped que los patógenos buscan (May, 2006; Pedersen and Fenton, 2007). Trasladando estos conceptos a la expresión poblacional de diferentes FINEs en una población de aves como las analizadas en la presente tesis, como estrategia poblacional resulta beneficioso ampliar la gama de predadores para una estrategia de control de patógenos. Esta estrategia clasificable como “de arriba hacia abajo” (del inglés “Top-down”) se basaría en la existencia de una diversidad de predadores que amplifica la gama de recursos para enfrentar un mayor número de desafíos. Estos diferentes predadores se traducen fisiológicamente en los diversos arreglos INE plasmados en distintos FINEs.

No es posible hacer juicios evolutivos basados en los resultados obtenidos ya que los métodos nos limitan y sería demasiado pretencioso. Sin embargo, vale la pena proponer que la expresión poblacional de FINEs parece ser compartida en 4 especies de animales vertebrados superiores que pertenecen a dos linajes evolutivos diferentes:

Homo sapiens sapiens, *Ratus norvegicus* (ambos mamíferos), *Gallus gallus* y *Coturnix coturnix* (aves). Merece destacar que la estrategia fisiológica que subyace a los FINEs se ha manifestado de modo consistente en un mismo porcentaje. Los reportes de investigadores que trabajan con modelos animales mamíferos también indican que los fenotipos se expresan de modo espontáneo en el 14 a 16% de una población (Elenkov et al., 2008; Sternberg et al., 1989). Intentando darle una explicación a la consistencia del fenómeno se hará un análisis desde un punto de vista energético, contextualizando la discusión ahora en el marco del “presupuesto” que los animales poseen en cuanto a recursos y las demandas en las que finalmente lo invierten. Según la “teoría de asignación de recursos” planteada en 1993, los recursos disponibles en un ambiente favorable se invierten en incrementar el *fitness* (Eraud et al., 2008; McNamara, 2005; Rauw, 2012; Schültz and Jensen, 2001; van der Most et al., 2011). Las respuestas finales del sistema INE que impliquen estados pro-inflamatorios, es decir aquellas donde predomine un perfil Th1 se han descrito como respuestas más costosas de activar y mantener por la maquinaria fisiológica que requieren que las respuestas opuestas donde la estrategia sea menos inflamatoria. Sin embargo, la ontogenia y crecimiento de los animales cuya polarización se encuentra balanceada hacia Th2 sería más demandante de llevar a cabo que la ontogenia de los organismos con respuestas opuestas (Kogut and Klasing, 2009; Rauw, 2012; Viney et al., 2005). Consecuentemente las aves simil-Lewis tendrían una mayor demanda metabólica a la hora de responder a los desafíos que aquellas simil-Fischer, siendo las Fischer las que tendrían mayor demanda a lo largo de su desarrollo/crecimiento. En este contexto el porcentaje basal de FINEs polarizados expresados en una población de animales en condiciones “control” (más bajo comparado con el que se observa luego de la exposición a estresores) podría considerarse como un balance de gasto energético, donde se compensarían los efectos de la demanda metabólica de cada fenotipo con las funciones potenciadas de las diferentes ramas de la INE que preponderan en cada uno. En este mismo sentido, se sabe que mantener un sistema en una determinada polarización, sea cual fuera, tiene una demanda metabólica determinada, la cual es producto de la movilización de células, producción de moléculas, etc. que involucra la misma (Adelman and Ardia, 2014; Colditz, 2008; Degen et al., 2005; Murphy, 2009; Viney et al., 2005). Así, el porcentaje de individuos que en situación control no pertenecen a los grupos que manifiestan FINEs extremos estarían en

condiciones de consumo de recursos menores a los grupos extremos, lo que podría interpretarse quizás como una compensación a nivel poblacional del gasto energético. Es decir, en la población, un grupo menor de animales permanecerá fisiológicamente en uno u otro extremo de polarización siendo beneficioso poder responder de manera más rápida a una invasión del tipo que requiera respuesta de uno u otro perfil presente. Como ese estado de polarización demanda mayor energía que la no-polarización INE, sólo se debería expresar en un porcentaje relativamente menor de la población (30%). Esto estaría sustentado por trabajos teóricos que indican que partiendo de la base de que la respuesta inmune tiene un costo, una respuesta inmune que sea parcialmente efectiva (no totalmente polarizada) podría asegurar el mayor “fitness” a la población (DeWitt et al., 1998; McNamara, 2005; Medley, 2002; Viney et al., 2005). En la sección posterior se presenta una discusión sobre los potenciales beneficios o implicancias que podría tener la modulación de la expresión de los fenotipos por situaciones de estrés. Pensando los resultados desde un punto de vista evolutivo nuevamente, los estudios futuros podrán confirmar si la expresión de FINEs constituye una estrategia compartida entre mamíferos, aves y su ancestro común reptiliano o si en realidad constituyen los resultados independientes de la interacción de los sistemas inmunológico, nervioso y endocrino en cada linaje. Teniendo en cuenta los avances que se han logrado en materia de interacciones INE en base al paradigma LEW/F344 (Sternberg et al., 1989; Wei et al., 2003; Zelazowski et al., 1992)., es posible pensar en alcances similares en el estudio de los mismos en modelos de aves. Es decir, utilizando cepas de aves criadas y seleccionadas por sus perfiles INE se podría avanzar en el conocimiento relacionado a la susceptibilidad a diversas infecciones, o bien a enfermedades autoinmunes y también a tumores inducidos de manera experimental

9.1.3 Expresión de FINEs y modulación por estrés crónico en aves de granja que poseen diferente tiempo de domesticación: *Coturnix coturnix* y *Gallus gallus*.

A partir de los resultados obtenidos en cada experiencia en particular y las conclusiones obtenidas, vale la pena hacer una comparación entre las experiencias que involucraron estrés de tipo crónico. Teniendo en cuenta **la distribución de cada FINE**

extremo, el estresor podría haber funcionado como una fuerza de tipo disruptiva en cuanto a la manifestación de fenotipos en las poblaciones de aves estudiadas (Carroll et al., 2004; Futuyma, 1998; Hartl and Clark, 2007). Esto se señala principalmente debido a que los animales que en un comienzo representaban un FINE polarizado dado abarcaban aproximadamente el 14-16% (cada uno) del total de individuos de las poblaciones estudiadas. Luego de los protocolos de estrés crónico empleados, los mismos están representados por aproximadamente un 24-28% (cada uno) de la población. Esto va en detrimento del número de individuos que no manifiesta un perfil polarizado (sobre el grupo de animales que poseen respuestas intermedias de las variables analizadas para determinar los FINEs). Esto sugiere que el estresor produce un cambio en las frecuencias relativas de animales expresando uno u otro FINE. El carácter disruptivo estaría definido entonces en base a que los aumentos de los fenotipos extremos se dan de modo balanceado, no pudiendo diferenciarse de manera significativa entre uno u otro perfil. Merece la pena rescatar que el aumento observado en la frecuencia de los FINEs extremos fue a expensas del grupo de animales clasificados como población intermedia. Este grupo entonces podría estar funcionando como un “reservorio” poblacional, a partir del cual se pueden derivar configuraciones extremas de la interacción INE cuando sea requerido. Una situación que lo requiera puede ser por ejemplo el desafío a la interfaz INE que implica un estresor crónico como los empleados en la presente Tesis. En este sentido, vale destacar que los estímulos empleados como desafíos ambientales fueron estresores que estimularon los componentes del macro-sistema INE de una manera parcialmente direccionada. En este sentido y como se describiera en la introducción teórica, los estresores son integrados a nivel del eje HPA como representante por excelencia de la interacción INE. Por ende este eje y su respuesta podrían ser considerados como el punto de partida del impacto de los estímulos empleados, que luego se transmitieron de acuerdo a las particulares interacciones fisiológicas a las demás variables intervinientes en la configuración de los fenotipos en estudio. Se menciona esto ya que existe la posibilidad de que otro tipo de desafío estimule diferencialmente el “reservorio” poblacional obteniendo como resultado una inducción de características no disruptivas. Podría por ejemplo suceder que la modificación en la distribución de FINEs se dé de modo direccional hacia uno u otro FINE extremo. Este escenario de respuesta fisiológica podría suceder en el caso de que se emplee como desafío la inducción de una

patología como una parasitosis. Esta requiere principalmente de la movilización de mecanismos anti-inflamatorios y de una polarización de tipo Th2 marcada (Cox, 2001; Degen et al., 2005; Ruff, 1999; Scott, 1989). En este caso, probablemente el fenómeno encontrado a nivel poblacional sería una inducción de tipo direccional con aumento de la frecuencia relativa de las aves *símil-Fischer*, ya que estas serían las más aptas para la resolución de la situación propuesta como desafío. Nueva experimentación debe ser realizada para confirmar dichas hipótesis.

Teniendo en cuenta **el conjunto total de individuos que expresan algún FINE extremo** y analizando la distribución de los mismos en cada una de las poblaciones estudiadas se encontró que aproximadamente un 30% de los animales expresa alguno de los FINEs extremos de modo basal (capítulos 5, 6 y 7). Luego de un estrés crónico como el que los animales atravesaron, un mayor porcentaje (cercano al 50%) de la población expresó alguno de los FINEs extremos en la población (capítulos 6 y 8). Por ende podríamos mencionar, con todas las precauciones del caso, que un estresor de tipo crónico sería un inductor de la expresión de FINE en una población de aves como la estudiada. El estudio estadístico de las proporciones previo y post-estrés indicó que las mismas cambiaron por ende el carácter inductivo estaría fundamentado en que el porcentaje de población expresando algún fenotipo extremo aumenta de manera significativa luego del estrés. Las implicancias de este fenómeno a nivel de una población se han mencionado en la sección correspondiente, y se retomarán los puntos más relevantes. La presión que implica el estresor en la población tendría como consecuencia casi una duplicación de los individuos manifestando este fenómeno y puede presentar implicancias de tipo adaptativo/evolutivas. Se resalta este concepto pensándolo como una posible estrategia de afrontamiento a desafíos, ya que ante un cambio en las condiciones ambientales y las demandas fisiológicas que esto implica, se ven modificadas las frecuencias de expresión los perfil como respuesta plástica final que resume el impacto sobre cada una de las variables que están involucradas en la definición de los FINEs.

Viney et al. (2005) plantean que una de las situaciones biológicamente más relevantes sucede cuando los recursos disponibles se encuentran de modo limitante. Es en este momento cuando la elección del gasto de esos recursos se vuelve más difícil para los individuos que atraviesan dichas situaciones (Viney et al., 2005). De esta manera, las

diversas consecuencias de una disponibilidad sub-óptima de recursos se hacen manifiestas. La situación de estrés crónico a las que las aves fueron sometidas de modo deliberado podría considerarse una situación de recursos limitantes y de desafíos en la asignación de los mismos, partiendo de la base de que fueron alteraciones en la homeostasis de los individuos (Cannon, 1915; Dohms and Metz, 1991; Jones, 1989; Siegel, 1980). Frente a esta situación la respuesta poblacional fue la maximización en la expresión de FINEs, lo cual podría ser entonces una estrategia para compensar la alterada disponibilidad de recursos. Podríamos enmarcar esta respuesta en la teoría de “Defensa Real” planteada por Buehler *et. al* en el año 2010 para animales que a lo largo de tiempos ecológicos o evolutivos encuentran desafíos con los que deben lidiar. En general, y en particular, en cuanto a respuestas INE existiría un capital energético en base al cual responder a diversos desafíos, los cuales serán resueltos en función de las capacidades reales de respuesta (Buehler et al., 2010; Scheiner and Willig, 2007). Las poblaciones de aves estudiadas y sometidas a estrés de tipo crónico encontraron una situación de presión frente a la cual la respuesta consistente fue el aumento del porcentaje de individuos expresando ambos FINEs extremos. Es decir esta sería la respuesta real en el contexto INE de las poblaciones estudiadas. Las consecuencias de esta respuesta pueden ser analizadas nuevamente en el marco poblacional (May, 2006; Pedersen and Fenton, 2007). Luego de haber atravesado una situación de desafío, la alteración de las frecuencias relativas de individuos expresando uno u otro perfil podría fomentar que ante una potencial amenaza a la población el eslabón que correspondería a las diversas opciones de defensa de la población como un todo se encuentre más balanceado en las frecuencias relativas de sus representantes.

Teniendo en cuenta las posibles situaciones a suceder luego de la alteración de las frecuencias relativas de los FINEs en las poblaciones de aves producto del estrés de tipo crónico, plantearemos a modo de situación hipotética un cuello de botella. Así, un mayor número de individuos de los FINEs extremos podría superar una situación de desafío, reduciendo las potenciales consecuencias de un fenómeno de este tipo y favoreciendo por ende la continuidad en la expresión de simultáneos y diversos FINEs de la especie (Carroll et al., 2004; Futuyma, 1998; Hartl and Clark, 2007). Esto es muy importante ya que cada grupo de animales con uno u otro FINE característico es a su vez un conjunto de aves en el cual la interacción de los sistemas inmune, nervioso y endócrino funcionaría de

modo cohesivo, con características diferentes y particulares. Esta idea implicaría entonces que ante un estresor de tipo crónico las frecuencias relativas de cada FINE extremo aumentan. De esa manera el sustrato fisiológico sobre el cual los desafíos ambientales actúan tiene mejor representados los posibles FINEs existentes en la variabilidad poblacional total, por estar numéricamente más balanceados los representantes de cada FINE en la población.

9.1.4 Domesticación y expresión de FINEs en aves de la especie *Coturnix coturnix* y *Gallus gallus*.

La domesticación ha sido definida como el proceso a través del cual una población de animales es genéticamente modificada (fenotípicamente por ende) como resultado de una selección artificial producida por el hombre (Schültz and Jensen, 2001). Se ha informado que estos procesos de selección por determinados caracteres de interés han llevado aparejada la modificación de otros caracteres que podrían considerarse secundarios frente al de interés (Adriaansen-Tennekes et al., 2009; Bayyari et al., 1993). Esto podría estar fundamentado en que la selección artificial puede resultar en una asignación preferencial de recursos a los caracteres de importancia, dejando a los animales sin la posibilidad de responder adecuadamente a otras demandas, en particular aquellas relacionadas a caracteres no perseguidos por el proceso de selección (Rauw et al., 1998; Rauw, 2012). Un meta-análisis indica que la selección en aves de granja por crecimiento acelerado ha tenido un efecto negativo sobre la función inmune (van der Most et al., 2011). Por ejemplo, la selección de pavos por mayor masa corporal y producción de huevos culminó en una población de individuos con su función inmune reducida y con mayor susceptibilidad a infecciones (Bayyari et al., 1993) y a su vez la selección de pollos parrilleros por tasa de crecimiento acelerada muestra reducida su respuesta humoral a GRO (Miller et al., 1992). En el caso de la presente tesis, se registra una diferencia en el porcentaje de expresión de FINEs que existe en la población de aves de la especie *Gallus gallus* (58%) y de la especie *Coturnix coturnix* (46%) luego del estrés de tipo crónico empleado. Los procesos de domesticación han sido largos para ambas especies de aves empleadas en la presente tesis, pero la especie *Gallus gallus* ha sido criada en cautiverio desde mucho tiempo antes que *Coturnix coturnix* y bajo una muy

significativamente mayor presión de selección a través de empresas comerciales (por ej. Cobb, Ross, Arbor Acres o Hy-Line como en el caso de esta Tesis) dedicadas directamente a la producción de aves con genotipos que permitan una mejor productividad bajo cría intensiva. Se podría plantear que la diferencia en el porcentaje poblacional de animales de ambas especies que manifiestan FINEs luego de un estrés de tipo crónico (58 vs. 46%) podría ser una variable que esté afectada por el tiempo de domesticación de las aves. Los análisis realizados implican que estos valores se diferencian entre sí mediante una fuerte tendencia estadística. Lo mencionado implica indirectamente que las variables seleccionadas para definir y caracterizar cada FINE también han sido modificadas de manera diferencial por el proceso de domesticación y cuanto más domesticada o seleccionada ha sido la especie, mayor es el porcentaje de la población que muestra fenotipos extremos cuando es sometida a algún estresor de tipo crónico. Esto tendría sentido además en el marco de uso de recursos planteado previamente ya que según Buehler *et al.* el capital en base al cual se responde a los desafíos ambientales tiene dos componentes: el ecológico y el evolutivo (Buehler et al., 2010; Scheiner and Willig, 2007). El primero debe analizarse en tiempos y espacios de la ontogenia de los individuos de la población, considerando los recursos energéticos presentes, los procesos de reproducción, forrajeo, etc. El segundo se analiza en tiempos generacionales o evolutivos y tiene en cuenta el efecto materno, el pool génico, los procesos de cuello de botella, selección direccional, etc. Es factible pensar que ambos capitales sean diferentes hoy para las 2 especies en análisis, ya que sus procesos de domesticación no han sido fenómenos idénticos y tampoco lo son las condiciones de cría que se consideran óptimas para cada una en la actualidad. Esto último podría explicar su diferencia en la respuesta como población al estrés de tipo crónico. Sin embargo, también podría pensarse que las diferencias numéricas observadas en los porcentajes de fenotipos extremos puede ser una respuesta que depende de cómo las aves perciben a los estresores y/o a la diferencia en las características de los estresores aplicados en esta Tesis. En un caso estrés crónico variado e impredecible, en el otro es un estresor de tipo social, fijo y en algunos períodos de tiempo también aplicados impredeciblemente. Evidentemente, más experimentación es necesaria para dar más sustento a una u otra hipótesis, lo cual podría incluir un experimento exclusivo que respete las condiciones de cría de cada especie y que unifique el estresor empleado.

9.1.5 Variabilidad, estrés crónico y expresión de FINEs.

Haciendo referencia a la información brindada por cada uno de los análisis multivariados empleados, se puede notar un aumento en el error que predicen las pruebas de análisis discriminante post-estrés (luego del protocolo sería mayor el error en la asignación de un nuevo individuo a uno u otro FINE). De una manera práctica esto implica que en condiciones control los hipotéticos animales nuevos serían asignados a uno u otro perfil de manera prácticamente inequívoca (error de asignación de 0% según el análisis discriminante) mientras que un protocolo de estrés modificaría de manera tal las relaciones entre las variables que la población se vuelve más difícil de predecir. Por otro lado, interpretando el porcentaje de variabilidad que explica cada eje canónico, previo al estrés el EC1 explicaba el 82% de la misma y luego el 60%. Así, luego del estrés se puede explicar un 22% menos de variabilidad poblacional a través de la función que sintetiza el EC1, que es la mejor función para explicar el mayor porcentaje de variabilidad en base a los datos. Continuando con la información brindada por el análisis de componentes principales, vale recordar que esta metodología estadística siempre resume en el primer componente la mayor cantidad de variabilidad posible (en base a las variables clasificatorias empleadas). Resulta interesante destacar que en ambos modelos animales estudiados el CP1 previo estrés siempre logra explicar mayor porcentaje de la variabilidad total entre los datos que el mismo CP luego del protocolo de estrés. En el caso de *Gallus gallus* el detrimento numérico en la capacidad explicativa del CP1 es del 34,7 al 27,8%, esto implica que el CP1 disminuye en un 7% su capacidad. Para el caso de *Coturnix coturnix* la disminución es del 48,2 al 40,2% (8%). Este dato refuerza la idea de que el estrés tornaría a la población más difícil de explicar, por ende sería lógico también que como consecuencia de esto, sea más difícil efectuar predicciones en base a los datos y sus relaciones. Considerando el grado de domesticación de las especies estudiadas, cuanto más domesticada o seleccionada ha sido la especie, parecería que es más difícil de predecir el perfil fenotípico que mostraran las aves dentro de la población. Desde esta perspectiva, la domesticación como proceso puede a su vez pensarse como un “cuello de botella forzado y dirigido”, impuesto artificialmente. A lo largo de este proceso, las presiones ambientales siempre favorecerían en principio aquellas características que de modo deliberado se persiguen, pero como ya se ha mencionado, muchas veces se han

encontrado detrimentos en las capacidades de respuesta de otras variables que no constituían el objeto de la presión (Bayyari et al., 1993; van der Most et al., 2011). En este caso, podría especularse que la respuesta de la población sometida a un cuello de botella de este tipo podría estar manifestando algún tipo de mecanismo compensatorio a nivel INE favoreciendo la maximización de fenotipos disponibles dentro de la población y por ende, permitiendo que responda de una forma más eficiente ante un futuro desafío ambiental que implique un nuevo cuello de botella. El análisis realizado comparando la proporción de población intermedia que luego del estrés cambia a un fenotipo extremo indicó que esta proporción es significativamente mayor en las aves de la especie *Gallus gallus*. Esto complementaría lo argumentado previamente ya que el tiempo de domesticación de las especies implicaría mayor tiempo frente al “cuello de botella forzado y dirigido”, por ende una posible respuesta de las aves a esta condición puede quizás haber sido la posibilidad incrementada de cambio de una población intermedia a un FINE extremo para de este modo contrarrestar los efectos de la presión direccionada que implica la domesticación.

9.2 Discusión final.

Como cuerpo de información generado y a partir del proceso que implica el desarrollo de los conocimientos científicos se puede mencionar que se ha logrado *contribuir al conocimiento general sobre la potencial existencia de FINEs y su relación con el estado de estrés en aves, empleando como modelos animal 2 especies de aves que difieren notablemente en su grado de domesticación: Coturnix coturnix (codorniz) y Gallus gallus (gallina)*. El enunciado citado constituye el objetivo general de la presente tesis y al haber sido cumplido se ha ampliado el alcance del conocimiento sobre la biología de este fenómeno en aves de granja. El hecho de haber descripto los FINEs en 2 especies de aves pone por primera vez de manifiesto estas asociaciones entre los diferentes sistemas y componentes de la interacción INE y en ambas de un modo consistente.

En la literatura se han empleado diferentes términos como “personalidad”, “temperamento” o “estilo de afrontamiento” para definir conjuntos de respuestas comportamentales y fisiológicas características de un animal frente a situaciones de estrés (Cockrem, 2007; Dingemanse et al., 2007; Dominique Hazard et al., 2008; Jones et

al., 2000; Koolhaas, 2008). Un concepto similar a éste pero que hace referencia al fenómeno a nivel poblacional es el de “síndrome comportamental” (SC). Los individuos de la misma especie, a la misma edad y en similares condiciones, generalmente difieren en su comportamiento (Wilson, 1998). Por ejemplo algunos son más agresivos que otros frente a diversos estímulos ambientales. Los SC tienen lugar cuando esas diferencias se hacen manifiestas de modo consistente a través de diferentes contextos a lo largo de la ontogenia (Dingemanse et al., 2007). Al hacer referencia a respuestas que poseen un rango de variabilidad que se mantiene a lo largo del tiempo y de diferentes situaciones, la respuesta de cada individuo es el “tipo de comportamiento” y el conjunto de individuos que expresan de manera consistente determinado “tipo de comportamiento” constituyen el síndrome (Bell, 2007). De este modo queda claro cómo los SC son una propiedad poblacional que se basa en la variabilidad de respuestas posibles y la consistencia de las mismas a lo largo del tiempo. Interpretando los resultados obtenidos en la presente tesis en este marco conceptual podríamos hacer una interpretación fisiológica de los SC. Se han evaluado poblaciones de congéneres de aves en diferentes situaciones, como ser: una situación basal y una situación de estrés crónico. En ambas situaciones se han encontrado individuos que difieren en su respuesta en todas las variables analizadas de la interacción INE (variabilidad), lo cual se traduce en individuos con diferentes FINEs caracterizados como simil-Fischer y simil-Lewis (haciendo un paralelismo con modelos animales mamíferos). Este conjunto de respuestas se ha mantenido de modo consistente a través de estas situaciones en ambas poblaciones, siendo la gran mayoría de las aves, las mismas que expresan previo y post-estrés uno u otro FINE (consistencia). Luego de todos los análisis realizados hasta aquí, podría considerarse a los fenotipos en estudio una característica poblacional, manifestada de manera sostenida en las diversas situaciones analizadas. Por ende y realizando un paralelismo con la bibliografía existente podrían constituir un “síndrome fisiológico” si se permite proponer el uso del término. Un carácter fundamental en la definición de estos síndromes a nivel comportamental es la consistencia del fenómeno a nivel individual. El análisis de proporciones de aves expresando uno u otro FINE extremo previo y post estrés indicó que para el caso de *Gallus gallus* el 88% de las aves mantienen su fenotipo y en el caso de *Coturnix coturnix* el porcentaje aumenta hasta alcanzar el 93% de los animales. Estos datos sustentan entonces la idea de “síndrome fisiológico” propuesta evidenciando la consistencia de la

expresión de FINEs como características emergentes en la interacción INE de las especies de aves estudiadas.

Según el análisis de diversos autores, en una situación ideal los individuos serían ilimitadamente plásticos y se ajustarían a las situaciones en que se encuentren sean cuales fueran (Bell, 2007; Kaufman, 2010). La existencia de asociaciones de respuestas que se mantienen consistentemente dentro de ciertos rangos como los fenotipos que se han descrito hasta el momento implica que la situación real dista de la ideal planteada previamente. Es decir que los individuos no son infinitamente plásticos, quizás principalmente por el elevado costo que tendría la maquinaria sensorial y regulatoria de la plasticidad (DeWitt et al., 1998). Al tener las posibilidades de respuesta parcialmente limitadas dentro de uno u otro conjunto de FINEs, la presencia persistente de diversos arreglos a lo largo del tiempo sería quizás una buena estrategia a nivel poblacional para enfrentar diversos desafíos. Se definiría entonces a la presencia de diferentes y coexistentes FINEs como una estrategia poblacional para lidiar con los constantes y diversos desafíos y demandas ambientales que implica el desarrollo de los organismos. Sin embargo, vale en este punto hacer una salvedad importante referida a la plasticidad a nivel poblacional. En la sección 9.1.3 se hizo referencia al grupo de animales intermedio en las poblaciones de aves estudiadas como un “reservorio” poblacional. A partir del mismo, nuevos individuos con FINE extremo se hacían manifiestos luego de las alteraciones fisiológicas que el desafío ambiental de un estresor implicó. Estos individuos que previo estrés pertenecen a la población intermedia y que luego del mismo expresan algún FINE extremo son aquellos que hacen patente el fenómeno de plasticidad en la interfaz INE, modificando de modo tal la interacción entre las variables constitutivas del fenotipo ante una situación de estrés, que luego del mismo dejan de pertenecer a la población intermedia y expresan un FINE extremo. Evidentemente los animales significativamente más plásticos son los que componen la población intermedia denominada “reservorio”, ya que los animales extremos cambian su fenotipo en un porcentaje significativamente más bajo (solo del 2 al 5%) que los del “reservorio” (del 35 al 40%). Entonces, el hecho de que aún después de un fenómeno de presión ambiental como cualquiera de los estresores empleados el grupo más abundante sea el intermedio puede ser interpretado también como una estrategia poblacional. La mencionada estrategia aseguraría que aún luego del desafío el grupo más abundante siga siendo el

que posee la mayor plasticidad de respuesta. Es decir que después de una presión ambiental la población no se polariza totalmente a dos extremos en la interacción INE, sino que se encuentra en una nueva situación de compromiso. En esta nueva situación el grupo más abundante, es decir el de respuestas intermedias o balanceadas en la interacción INE, aseguraría por lo ya discutido a nivel poblacional el mayor fitness.

9.3 Conclusión final.

A modo de conclusión se podría mencionar que el estudio de vertebrados superiores como aves y mamíferos ha llevado a la descripción, profundización y caracterización de grupos animales con FINEs como una característica emergente de las interacciones entre los sistemas inmune, nervioso y endócrino. Estos fenotipos pueden ser considerados como una estrategia que abarca desde el nivel individual hasta el poblacional. Vale la pena destacar entonces que la resolución de todas aquellas situaciones que demandan respuestas de la interacción INE, consistentemente pueden analizarse como el resultado de un necesario compromiso entre diversas características individuales que luego podrán ser integradas en un nivel de análisis superior a nivel poblacional. En concreto en el caso de la presente Tesis y analizando poblaciones de animales como las caracterizadas hasta aquí, se concluirá mencionando que las interacciones INE que tienen lugar en cada individuo poseen determinadas características de suma importancia, como ser:...

...Cierta *nivel de variabilidad basal* en las respuestas de los diferentes sistemas que integran la relación INE, sobre el cual se sustenta la manifestación de FINEs a nivel poblacional. Estos fenotipos podrían ser considerados entonces la traducción a nivel poblacional de la variabilidad a nivel individual.

...Cierta *nivel de consistencia* sobre el cual se funda el fenómeno de síndrome fisiológico que se propone y sustenta en la presente Tesis y que se correspondería con los diversos FINEs encontrados, coexistiendo en simultáneo en un momento dado de la ontogenia de las aves y además a través del tiempo.

...Cierta *capacidad de respuesta a estímulos ambientales* que se constituye en el sustrato de las modificaciones en las interacciones en la interfaz INE. Esta capacidad de respuesta a desafíos podría plantearse entonces como la base de la plasticidad descrita.

Este conjunto de características analizadas constituirían un gradiente de posibilidades de análisis que recorre desde la escala individual hasta la poblacional, siendo aspectos a tener en cuenta necesariamente para la aproximación a cualquier fenómeno biológico que se intente describir en la interacción común del macro-sistema inmune-neuroendócrino.

9.4 Potenciales construcciones futuras.

A partir de estas conclusiones surgen nuevos interrogantes por develar, relacionados a diferentes aspectos de la naturaleza de los fenotipos en estudio y que hacen a la biología de los mismos. Muchas son las puertas que se abren en este momento en relación a potencialidades futuras, pero en particular resultaría interesante complementar los conocimientos referidos a diversas áreas, como ser:

- **Producción:** podrían estudiarse los FINEs de diferentes animales en condiciones variadas de cría intensiva para conocer y caracterizar la posible susceptibilidad diferencial de las aves en diversas situaciones y bajo variados procesos de manipulación a los que son sometidas de modo rutinario y que ocasionan estrés en las mismas, así como a diferentes enfermedades relacionadas con la cría.

- **Fisiología animal y fisiología comparada:** completando estudios a nivel celular y molecular de los modelos descritos en la presente tesis se lograrían estudiar las relaciones entre un modelo *in vivo* de FINE y su correlato en estudios *in vitro*. El conocimiento sobre las relaciones entre los 2 niveles de aproximación permitiría hacer comparaciones más complejas con las descripciones que ya existen para animales de otro linaje evolutivo: mamíferos. En este sentido podrían profundizarse en aspectos que ya se manejan para mamíferos como por ejemplo: develar si la base de la diferencia encontrada en CORT es producto de un defecto a nivel hipotalámico en la secreción de hormonas inductoras de síntesis y liberación de corticoides adrenal. Estudiar también si el mecanismo puede ser direccionado desde cada uno de los componentes del sistema INE o si uno de ellos es troncal a la modulación de los otros.

- **Salud y bienestar:** estarían desarrolladas las bases para el estudio de diversas enfermedades que cursen con desbalances inmunológicos en modelos animales con características polarizadas como los descritos en este estudio.

- **Evolutivo:** sería de sumo interés complementar los estudios en niveles diferentes de la escala evolutiva que se maneja actualmente, estudiando la presencia o ausencia de estas configuraciones fisiológicas en reptiles, anfibios o peces. Más aún se podría intentar determinar si en aves que no sean empleadas en procesos de producción estos fenotipos se también se expresan. Es decir si la expresión de FINEs como tales se asocia del alguna manera al proceso de domesticación al que tanto *Gallus gallus* como *Coturnix coturnix* han sido sometidas.

- **Ontogenia y heredabilidad:** se ha determinado que los FINEs existen en los modelos estudiados y que son susceptibles de variar ante situaciones como un estrés de tipo crónico. Sería de gran interés determinar si la ontogenia de un animal es acompañada a lo largo de su desarrollo por diferentes FINEs o si un animal posee un único fenotipo expresado a lo largo de todo su desarrollo y es solo susceptible de modificarlo ante presiones ambientales como un estresor. Esto daría además un punto de conexión con los síndromes comportamentales estudiados actualmente en ecología donde se analizan las consistencias de diferentes respuestas a lo largo de la ontogenia de los animales. A nivel de transmisibilidad de los arreglos inmunoneuroendócrinos estudiados, sería interesante conocer si existe heredabilidad de un determinado perfil o fenotipo.

10. Bibliografía.

- Adcock, I.M., Caramori, G., 2001. Cross-talk between pro-inflammatory transcription factors and glucocorticoids. *Immunol. Cell Biol.* 79, 376–84. doi:10.1046/j.1440-1711.2001.01025.x
- Adelman, J.S., Ardia, D.R., 2014. *Avian Immunology Ecoinmunology*, Avian Immunology. Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-396965-1.00022-4
- Adriaansen-Tennekes, R., Decuypere, E., Parmentier, H.K., Savelkoul, H.F.J., 2009. Chicken lines selected for their primary antibody response to sheep red blood cells show differential hypothalamic-pituitary-adrenal axis responsiveness to mild stressors. *Poult. Sci.* 88, 1879–82. doi:10.3382/ps.2009-00150
- Akana, S.F., Hanson, E.S., Horsley, C.J., Strack, A.M., Bhatnagar, S., Bradbury, M.J., Milligan, E.D., Dallman, M.F., 1996. Clamped Corticosterone (B) Reveals the Effect of Endogenous B on Both Facilitated Responsivity to Acute Restraint and Metabolic Responses to Chronic Stress. *Stress* 1, 33–49.
- Alheim, K., 1997. Hyperresponsive febrile reactions to interleukin (IL) 1 and IL-1 , and altered brain cytokine mRNA and serum cytokine levels , in IL-1 -deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 2681–2686.
- Anisman, H., Glazier, S.J., Sklar, L.S., 1981. Cholinergic influences on escape deficits produced by uncontrollable stress. *Psychopharmacology (Berl)*. 74, 81–7.
- Anisman, H., Zacharko, R.M., 1990. Multiple neurochemical and behavioral consequences of stressors: implications for depression. *Pharmacol. Ther.* 46, 119–36.
- Anne McNabb, F.M., 2000. *Sturkie’s Avian Physiology*, *Sturkie’s Avian Physiology*. Elsevier. doi:10.1016/B978-012747605-6/50018-3
- Baumgartner, J., 1994. Japanese quail production, breeding and genetics. *Worlds. Poult. Sci. J.* 50, 227–235.
- Bayyari, G.R., Huff, W.E., Rath, N.C., Balog, J.M., Newberry, L.A., Villines, J.D., 1993. Effect of the Genetic Selection of Turkeys for Increased Body Weight and Egg Production on Immune and Physiological Responses 1 Bleeding and Necropsy Cutaneous basophil hypersensitivity was determined.
- Bell, A.M., 2007. Future directions in behavioural syndromes research. *Proc. Biol. Sci.* 274, 755–61. doi:10.1098/rspb.2006.0199
- Berg, T.P., 2000. Acute infectious bursal disease in poultry: a review. *Avian Pathol.* 29, 175–94. doi:10.1080/03079450050045431

- Besedovsky, H., 1981. Lymphokine-containing supernatants from con A-stimulated cells increase corticosterone blood levels. *J. Immunol.* 126, 385–387.
- Besedovsky, H., del Rey, A., 2013. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr. Rev.* 17, 64–102. doi:10.1210/edrv-17-1-64
- Besedovsky, H., del Rey, A., Sorkin, E., 1979. Immunoregulation mediated by the sympathetic nervous system. *Cell. Immunol.* 48, 346–355.
- Besedovsky, H., del Rey, A., Sorkin, E., Da Prada, M., Burri, R., Honegger, C., 1983. The immune response evokes changes in brain noradrenergic neurons. *Science (80-)*. 221, 564–566. doi:10.1126/science.6867729
- Besedovsky, H., del Rey, A., Sorkin, E., Dinarello, C., 1986. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science (80-)*. 233, 652–654. doi:10.1126/science.3014662
- Besedovsky, H., Sorkin, E., Keller, M., Muller, J., 1975. Changes in Blood Hormone Levels during the Immune Response. *Exp. Biol. Med.* 150, 466–470. doi:10.3181/00379727-150-39057
- Bhatnagar, S., Dallman, M., 1998. Neuroanatomical basis for facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to a novel stressor after chronic stress. *Neuroscience* 84, 1025–39.
- Bhatnagar, S., Meaney, M.J., 1995. Hypothalamic-pituitary-adrenal function in chronic intermittently cold-stressed neonatally handled and non handled rats. *J. Neuroendocrinol.* 7, 97–108.
- Bhatnagar, S., Vining, C., 2003. Facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to novel stress following repeated social stress using the resident/intruder paradigm. *Horm. Behav.* 43, 158–65.
- Blalock, J.E., 1994. The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunol. Today* 15, 504–11. doi:10.1016/0167-5699(94)90205-4
- Blalock, J.E., 2002. Harnessing a neural-immune circuit to control inflammation and shock. *J. Exp. Med.* 195, F25–8.
- Bordeu, T. de, 1775. *Recherches sur les maladies chroniques.*
- Borovikova, L. V, Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G.I., Watkins, L.R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J.W., Tracey, K.J., 2000. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405, 458–62. doi:10.1038/35013070

- Buehler, D.M., Tieleman, B.I., Piersma, T., 2010. How do migratory species stay healthy over the annual cycle? A conceptual model for immune function and for resistance to disease. *Integr. Comp. Biol.* 50, 346–57. doi:10.1093/icb/icq055
- Butts, C.L., Sternberg, E.M., 2008. Neuroendocrine factors alter host defense by modulating immune function. *Cell. Immunol.* 252, 7–15. doi:10.1016/j.cellimm.2007.09.009
- Calandreau, L., Bertin, A., Boissy, A., Arnould, C., Constantin, P., Desmedt, A., Guémené, D., Nowak, R., Leterrier, C., 2011. Effect of one week of stress on emotional reactivity and learning and memory performances in Japanese quail. *Behav. Brain Res.* 217, 104–110. doi:10.1016/j.bbr.2010.10.004
- Calogero, A.E., Sternberg, E.M., Bagdy, G., Smith, C., Bernardini, R., Aksentijevich, S., Wilder, R.L., Gold, P.W., Chrousos, G.P., 1992. Neurotransmitter-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis responsiveness is defective in inflammatory disease-susceptible Lewis rats: in vivo and in vitro studies suggesting globally defective hypothalamic secretion of corticotropin-releasing hormone. *Neuroendocrinology* 55, 600–8.
- Cannon, W.B., 1915. *Bodily Changes In Pain Hunger Fear And Rage.*
- Carroll, S.B., Grenier, J.K., Weatherbee, S.D., 2004. *From DNA to Diversity: Molecular Genetics and the Evolution of Animal Design.* Wiley.
- Carsia, R.V., Harvey, S., 2000. *Sturkie's Avian Physiology, Sturkie's Avian Physiology.* Elsevier. doi:10.1016/B978-012747605-6/50020-1
- Cawadias, A.P., 1941. The History of Endocrinology: (Section of the History of Medicine). *Proc. R. Soc. Med.* 34, 303–8.
- Cimino, G., 1999. Reticular theory versus neuron theory in the work of Camillo Golgi. *Physis. Riv. Int. Stor. Sci.* 36, 431–72.
- Cockrem, J.F., 2007. Stress, corticosterone responses and avian personalities. *J. Ornithol.* 148, 169–178. doi:10.1007/s10336-007-0175-8
- Cohen, I.R., Harel, D., 2007. Explaining a complex living system: dynamics, multi-scaling and emergence. *J. R. Soc. Interface* 4, 175–82. doi:10.1098/rsif.2006.0173
- Colditz, I.G., 2008. Six costs of immunity to gastrointestinal nematode infections. *Parasite Immunol.* 30, 63–70. doi:10.1111/j.1365-3024.2007.00964.x
- Correa, S.G., Maccioni, M., Rivero, V.E., Iribarren, P., Sotomayor, C.E., Riera, C.M., 2007. Cytokines and the immune-neuroendocrine network: What did we learn from infection and autoimmunity? *Cytokine Growth Factor Rev.* 18, 125–34. doi:10.1016/j.cytogfr.2007.01.011

- Cox, F.E., 2001. Concomitant infections, parasites and immune responses. *Parasitology* 122 Suppl, S23–38.
- Crainz, F., 1982. The editions and translations of Dr. Matthew Baillie's *Morbid Anatomy*. *Med. Hist.* 26, 443–52.
- Dantzer, R., 1991. Stress, stereotypies and welfare. *Behav. Processes* 25, 95–102. doi:10.1016/0376-6357(91)90012-O
- Davison, F., Kaspers, B., Schat, K., Kaiser, P., 2011. *Avian immunology*. Academic Press.
- De Bosscher, K., Vanden Berghe, W., Vermeulen, L., Plaisance, S., Boone, E., Haegeman, G., 2000. Glucocorticoids repress NF-kappa B-driven genes by disturbing the interaction of p65 with the basal transcription machinery, irrespective of coactivator levels in the cell. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 3919–3924. doi:10.1073/pnas.97.8.3919
- De Groote, D., Zangerle, P.F., Gevaert, Y., Fassotte, M.F., Beguin, Y., Noizat-Pirenne, F., Pirenne, J., Gathy, R., Lopez, M., Dehart, I., 1992. Direct stimulation of cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, IL-2, IFN-gamma and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation. *Cytokine* 4, 239–48.
- Degen, W.G.J., Daal, N. Van, Rothwell, L., Kaiser, P., Schijns, V.E.J.C., 2005. Th1/Th2 polarization by viral and helminth infection in birds. *Vet. Microbiol.* 105, 163–7. doi:10.1016/j.vetmic.2004.12.001
- Dehnhard, M., Schreer, A., Krone, O., Jewgenow, K., Krause, M., Grossmann, R., 2003. Measurement of plasma corticosterone and fecal glucocorticoid metabolites in the chicken (*Gallus domesticus*), the great cormorant (*Phalacrocorax carbo*), and the goshawk (*Accipiter gentilis*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 131, 345–352. doi:10.1016/S0016-6480(03)00033-9
- Dennis, R.L., Newberry, R.C., Cheng, H.-W., Estevez, I., 2008. Appearance matters: artificial marking alters aggression and stress. *Poult. Sci.* 87, 1939–46. doi:10.3382/ps.2007-00311
- Descartes, R., 2011. *Obra completa*. Editorial Gredos, Madrid.
- DeWitt, T.J., Sih, A., Wilson, D.S., 1998. Costs and limits of phenotypic plasticity. *Trends Ecol. Evol.* 13, 77–81. doi:10.1016/S0169-5347(97)01274-3
- Dhabhar, F.S., 2009. Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection and immunopathology. *Neuroimmunomodulation* 16, 300–17. doi:10.1159/000216188
- Dhabhar, F.S., McEwen, B.S., 1997. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. *Brain. Behav. Immun.* 11, 286–306. doi:10.1006/brbi.1997.0508

- Dhabhar, F.S., Miller, A.H., McEwen, B.S., Spencer, R., 1996. Stress-Induced Changes in Blood leukocyte Distribution. *J. Immunol.* 1638–1644.
- Dhabhar, F.S., Miller, A.H., McEwen, B.S., Spencer, R.L., 1995. Effects of stress on immune cell distribution. Dynamics and hormonal mechanisms. *J. ...* 154, 5511–5527.
- Dingemans, N.J., Wright, J., Kazem, A.J.N., Thomas, D.K., Hickling, R., Dawnay, N., 2007. Behavioural syndromes differ predictably between 12 populations of three-spined stickleback. *J. Anim. Ecol.* 76, 1128–38. doi:10.1111/j.1365-2656.2007.01284.x
- Dohms, J.E., Metz, A., 1991. Stress--mechanisms of immunosuppression. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 30, 89–109.
- Dougherty, T., Frank, J., 1953. The quantitative and qualitative responses of blood lymphocytes to stress stimuli. *J Lab Clin Med.*
- Downing, J., Miyan, J., 2000. Neural immunoregulation: emerging roles for nerves in immune homeostasis and disease. *Immunol. Today* 5699, 281–289.
- Doyle, J.B., 1939. Santiago Ramón y Cajal. *Cal. West. Med.* 51, 97–9.
- Drugan, R.C., Wiedholz, L.M., Holt, A., Kent, S., Christianson, J.P., 2007. Environmental and immune stressors enhance alcohol-induced motor ataxia in rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 86, 125–31. doi:10.1016/j.pbb.2006.12.016
- Du Pasquier, L., 2005. Meeting the demand for innate and adaptive immunities during evolution. *Scand. J. Immunol.* 62 Suppl 1, 39–48. doi:10.1111/j.1365-3083.2005.01608.x
- Ehrlich, P., 1893. Constitution, Vertheilung und Wirkung chemischer Koerper Aeltere und neuere arbeiten.
- Elenkov, I.J., 2008. Neurohormonal-cytokine interactions: implications for inflammation, common human diseases and well-being. *Neurochem. Int.* 52, 40–51. doi:10.1016/j.neuint.2007.06.037
- Elenkov, I.J., Kvetnansky, R., Hashiramoto, A., Bakalov, V.K., Link, A.A., Zachman, K., Crane, M., Jezova, D., Rovinsky, J., Dimitrov, M.A., Gold, P.W., Bonini, S., Fleisher, T., Chrousos, G.P., Wilder, R.L., 2008. Low- versus high-baseline epinephrine output shapes opposite innate cytokine profiles: presence of Lewis- and Fischer-like neurohormonal immune phenotypes in humans? *J. Immunol.* 181, 1737–1745.
- Elenkov, I.J., Wilder, R.L., Chrousos, G.P., Vizi, E.S., 2000. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol. Rev.* 52, 595–638.

- Entzian, P., Linnemann, K., Schlaak, M., Zabel, P., 1996. Obstructive sleep apnea syndrome and circadian rhythms of hormones and cytokines. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153, 1080–6. doi:10.1164/ajrccm.153.3.8630548
- Eraud, C., Trouvé, C., Dano, S., Chastel, O., Faivre, B., 2008. Competition for resources modulates cell-mediated immunity and stress hormone level in nestling collared doves (*Streptopelia decaocto*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 155, 542–51. doi:10.1016/j.ygcen.2007.09.008
- Fair, J.M., Hansen, E.S., Ricklefs, R.E., 1999. Growth, developmental stability and immune response in juvenile Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). *Proc. Biol. Sci.* 266, 1735–42. doi:10.1098/rspb.1999.0840
- Flajnik, M., Kasahara, M., 2010. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat. Rev. Genet.* 11, 47–59. doi:10.1038/nrg2703.Origin
- Fowler, K.C., Pesti, G.M., Howarth, B., 1983. The determination of plasma corticosterone of chickens by high pressure liquid chromatography. *Poult. Sci.* 62, 1075–9.
- Futuyma, D.J., 1998. *Evolutionary Biology*. Sinauer Associates.
- Gallowitsch-Puerta, M., Pavlov, V. a, 2007. Neuro-immune interactions via the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Life Sci.* 80, 2325–9. doi:10.1016/j.lfs.2007.01.002
- Gartner, L.P., Hiatt, J.L., 2001. *Texto Atlas de Histología*, 2^o ed.
- Grant, G., 2007. How the 1906 Nobel Prize in Physiology or Medicine was shared between Golgi and Cajal. *Brain Res. Rev.* 55, 490–8. doi:10.1016/j.brainresrev.2006.11.004
- Grissom, N., Bhatnagar, S., 2009. Habituation to repeated stress: get used to it. *Neurobiol. Learn. Mem.* 92, 215–24. doi:10.1016/j.nlm.2008.07.001
- Grissom, N., Kerr, W., Bhatnagar, S., 2008. Struggling behavior during restraint is regulated by stress experience. *Behav. Brain Res.* 191, 219–226. doi:10.1016/j.bbr.2008.03.030
- Gross, W.B., 1972. Effect of social stress on occurrence of Marek's disease in chickens. *Am. J. Vet. Res.* 33, 2275–9.
- Gross, W.B., 1989. Effect of adrenal blocking chemicals on viral and respiratory infections of chickens. *Can. J. Vet. Res.* 53, 48–51.
- Gross, W.B., Siegel, P.B., 1985. Selective Breeding of Chickens for Corticosterone Response to Social Stress. *Poult. Sci.* 64, 2230–2233. doi:10.3382/ps.0642230
- Grossman, I.W., 1971. The diagnosis of neoplasm in Matthew Baillie's atlas of anatomy (1812). *Bull. N. Y. Acad. Med.* 47, 1504–8.

- Guhl, A.M., 1958. The development of social organisation in the domestic chick. *Anim. Behav.* 6, 92–111. doi:10.1016/0003-3472(58)90016-2
- Guhl, A.M., Ortman, L.L., 1953. Visual patterns in the recognition among chickens. *Condor* 55, 287–297.
- Guibert, F., Richard-Yris, M.-A., Lumineau, S., Kotrschal, K., Bertin, A., Petton, C., Möstl, E., Houdelier, C., 2011. Unpredictable mild stressors on laying females influence the composition of Japanese quail eggs and offspring's phenotype. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 132, 51–60. doi:10.1016/j.applanim.2011.03.012
- Guzman, D.A., Satterlee, D.G., Kembro, J.M., Schmidt, J.B., Marin, R.H., 2009. Effect of the density of conspecifics on runway social reinstatement behavior of male Japanese quail genetically selected for contrasting adrenocortical responsiveness to stress. *Poult. Sci.* 88, 2482–90. doi:10.3382/ps.2009-00156
- Gwinner, E., Hau, M., 2000. *Sturkie's Avian Physiology*, *Sturkie's Avian Physiology*. Elsevier. doi:10.1016/B978-012747605-6/50022-5
- Harris, G., 1948. Neural control of the pituitary gland. *Physiol. Rev.* 28, 139.
- Harris, G.W., 1948. Electrical stimulation of the hypothalamus and the mechanism of neural control of the adenohipophysis. *J. Physiol.* 107, 418–429.
- Harris, G.W., 1950. Oestrous rhythm. Pseudopregnancy and the pituitary stalk in the rat. *J. Physiol.* 111, 347–60.
- Hartl, D.L., Clark, A.G., 2007. *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates.
- Harvey, S., Phillips, J.G., Rees, A., Hall, T.R., 1984. Stress and adrenal function. *J. Exp. Zool.* 232, 633–45. doi:10.1002/jez.1402320332
- Hazard, D., Couty, M., Richard, S., Guémené, D., 2008. Intensity and duration of corticosterone response to stressful situations in Japanese quail divergently selected for tonic immobility. *Gen. Comp. Endocrinol.* 155, 288–97. doi:10.1016/j.ygcen.2007.05.009
- Hazard, D., Leclaire, S., Couty, M., Guémené, D., 2008. Genetic differences in coping strategies in response to prolonged and repeated restraint in Japanese quail divergently selected for long or short tonic immobility. *Horm. Behav.* 54, 645–53. doi:10.1016/j.yhbeh.2008.07.002
- Heijnen, C.J., 2007. Receptor regulation in neuroendocrine-immune communication: current knowledge and future perspectives. *Brain. Behav. Immun.* 21, 1–8. doi:10.1016/j.bbi.2006.08.008

- Hofmann, T.G., Schmitz, M.L., 2002. The promoter context determines mutual repression or synergism between NF-kappaB and the glucocorticoid receptor. *Biol. Chem.* 383, 1947–51. doi:10.1515/BC.2002.219
- Huss, D., Poynter, G., Lansford, R., 2008. Japanese quail (*Coturnix japonica*) as a laboratory animal model. *Lab Anim. (NY)*. 37, 513–9. doi:10.1038/labani1108-513
- Hy-Line, B., 2014. Hy-Line Management Guide.
- Ishigami, T., 1919. The influence of psychic acts on the progress of pulmonary tuberculosis. *Am Rev TBC* 2, 470–484.
- Isobe, T., Lillehoj, H.S., 1992. Effects of corticosteroids on lymphocyte subpopulations and lymphokine secretion in chickens. *Avian Dis.* 36, 590–6.
- Jones, R.B., 1989. Chronic stressors, tonic immobility and leucocytic responses in the domestic fowl. *Physiol. Behav.* 46, 439–442. doi:10.1016/0031-9384(89)90017-6
- Jones, R.B., 1996. Fear and adaptability in poultry: Insights, implications and imperatives. *Worlds. Poult. Sci. J.* 52, 131–174. doi:10.1079/WPS19960013
- Jones, R.B., Marin, R.H., Garcia, D.A., Arce, A., 1999. T-maze behaviour in domestic chicks: a search for underlying variables. *Anim. Behav.* 58, 211–217. doi:10.1006/anbe.1999.1147
- Jones, R.B.B., Satterlee, D.G., Waddington, D., Cadd, G.G., 2000. Effects of repeated restraint in Japanese quail genetically selected for contrasting adrenocortical responses. *Physiol. Behav.* 69, 317–324. doi:10.1016/S0031-9384(00)00204-3
- Juul-Madsen, H.R., Viertlböck, B., Härtle, S., Smith, A.L., Göbel, T.W., 2014. Avian Immunology Innate Responses, *Avian Immunology*. Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-396965-1.00007-8
- Kaiser, P., Wu, Z., Rothwell, L., Fife, M., Gibson, M., Poh, T.-Y., Shini, A., Bryden, W., Shini, S., 2009. Prospects for understanding immune-endocrine interactions in the chicken. *Gen. Comp. Endocrinol.* 163, 83–91. doi:10.1016/j.ygcen.2008.09.013
- Kaufman, J., 2010. Evolution and immunity. *Immunology* 130, 459–62. doi:10.1111/j.1365-2567.2010.03294.x
- Keele, K.D., 1969. ADDISON ON THE 'SUPRA-RENAL CAPSULES'. *Med. Hist.*
- Kelso, A., Munck, A., 1984. Glucocorticoid inhibition of lymphokine secretion by alloreactive T lymphocyte clones. *J. Immunol.* 133, 784–91.
- Klasing, K.C., 1998. Nutritional modulation of resistance to infectious diseases. *Poult. Sci.* 77, 1119–25.

- Klimovsky, G., 1997. *Las desventuras del conocimiento científico.*, 3^o ed. Bueno Aires, Argentina.
- Kogut, M.H., Klasing, K., 2009. An immunologist's perspective on nutrition, immunity, and infectious diseases: Introduction and overview. *J. Appl. Poult. Res.* 18, 103–110. doi:10.3382/japr.2008-00080
- Koolhaas, J.M., 2008. Coping style and immunity in animals: making sense of individual variation. *Brain. Behav. Immun.* 22, 662–7. doi:10.1016/j.bbi.2007.11.006
- Korte, S.M., Beuving, G., Ruesink, W., Blokhuis, H.J., 1997. Plasma catecholamine and corticosterone levels during manual restraint in chicks from a high and low feather pecking line of laying hens. *Physiol. Behav.* 62, 437–41.
- Koutcherov, Y., Mai, J.K., Ashwell, K.W., Paxinos, G., 2000. Organization of the human paraventricular hypothalamic nucleus. *J. Comp. Neurol.* 423, 299–318.
- Koutsos, E. a, Klasing, K.C., 2001. The acute phase response in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 128, 255–63.
- Koutsos, E.A., Klasing, K.C., 2014. *Avian Immunology Non-Genetic Factor Influence*, *Avian Immunology*. Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-396965-1.00017-0
- Kudielka, B.M., Kirschbaum, C., 2005. Sex differences in HPA axis responses to stress: a review. *Biol. Psychol.* 69, 113–32. doi:10.1016/j.biopsycho.2004.11.009
- Kuenzel, W.J., 2000. *Sturkie's Avian Physiology*, *Sturkie's Avian Physiology*. Elsevier. doi:10.1016/B978-012747605-6/50008-0
- Kuenzel, W.J., Jurkevich, A., 2010. Molecular neuroendocrine events during stress in poultry. *Poult. Sci.* 89, 832–40. doi:10.3382/ps.2009-00376
- Lábaque, M.C., Kembro, J.M., Guzmán, D. a, Nazar, F.N., Marin, R.H., 2008. Ontogeny of copulatory behaviour in male Japanese quail classified by their T-maze performance as hatchlings. *Br. Poult. Sci.* 49, 409–17. doi:10.1080/00071660802262050
- Langdon-Brown, W., 1935. *The Integration of the Endocrine System*.
- Langerhans, P., 1869. *Beitrage zur Mikroscoischer Anatomzie der Batuchs Peicheidrutse*. Inaug. Diss. Berlin.
- Lara, L., Rostagno, M., 2013. Impact of Heat Stress on Poultry Production. *Animals* 3, 356–369. doi:10.3390/ani3020356
- Laurence, A., Houdelier, C., Petton, C., Calandreau, L., Arnould, C., Favreau-Peigné, A., Leterrier, C., Boissy, A., Richard-Yris, M.-A., Lumineau, S., 2012. Japanese quail's genetic background modulates effects of chronic stress on emotional reactivity but not spatial learning. *PLoS One* 7, e47475. doi:10.1371/journal.pone.0047475

- Lay, D.C., Fulton, R.M., Hester, P.Y., Karcher, D.M., Kjaer, J.B., Mench, J.A., Mullens, B.A., Newberry, R.C., Nicol, C.J., O'Sullivan, N.P., Porter, R.E., 2011. Hen welfare in different housing systems. *Poult. Sci.* 90, 278–94. doi:10.3382/ps.2010-00962
- Le Fanu, W., 1962. A primitive anatomy: Johann Peyligk's "Compendiosa Declaratio". *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* 31, 115–9.
- Lèche, A., Busso, J.M., Hansen, C., Navarro, J.L., Marín, R.H., Martella, M.B., 2009. Physiological stress in captive Greater rheas (*Rhea americana*): highly sensitive plasma corticosterone response to an ACTH challenge. *Gen. Comp. Endocrinol.* 162, 188–91. doi:10.1016/j.ygcen.2009.03.014
- Lechner, O., Dietrich, H., Wieggers, G.J., Vacchio, M., Wick, G., 2001. Glucocorticoid production in the chicken bursa and thymus. *Int. Immunol.* 13, 769–76.
- Lee, K. a, Klasing, K.C., 2004. A role for immunology in invasion biology. *Trends Ecol. Evol.* (Personal Ed. 19, 523–9. doi:10.1016/j.tree.2004.07.012
- Li, Q., Verma, I.M., 2002. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 725–34. doi:10.1038/nri910
- Ligier, S., Sternberg, E.M., 1999. Neuroendocrine host factors and inflammatory disease susceptibility. *Environ. Health Perspect.* 107, 701–707.
- Loeper, M., Crouzon, O., 1904. L'action de l'adrenaline sur le sang. *Arch Med Exp Anat Pathol* 16, 83–108.
- Luna, A., Dambolena, J.S., Zygadlo, J.A., Marin, R.H., Labaque, M.C., 2012. Effects of thymol and isoeugenol feed supplementation on quail adult performance, egg characteristics and hatching success. *Br. Poult. Sci.* 53, 631–9. doi:10.1080/00071668.2012.721536
- Magariños, A.M., McEwen, B.S., 1995. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. *Neuroscience* 69, 89–98.
- Malisch, J.L., Satterlee, D.G., Cockrem, J.F., Wada, H., Breuner, C.W., 2010. How acute is the acute stress response? Baseline corticosterone and corticosteroid-binding globulin levels change 24h after an acute stressor in Japanese quail. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 345–50. doi:10.1016/j.ygcen.2009.08.003
- Marin, R.H., Benavidez, E., Garcia, D.A., Satterlee, D.G., 2002. Sex differences in central benzodiazepine receptor densities and circulating corticosterone release after acute stress in broiler chicks. *Poult. Sci.* 81, 261–4.
- Marin, R.H., Freytes, P., Guzman, D., Bryan Jones, R., 2001. Effects of an acute stressor on fear and on the social reinstatement responses of domestic chicks to cagemates and strangers. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 71, 57–66. doi:10.1016/S0168-1591(00)00167-2

- Marin, R.H., Liste, M.G., Campderrich, I., Estevez, I., 2014. The impact of phenotypic appearance on body weight and egg production in laying hens: a group-size- and experience-dependent phenomenon. *Poult. Sci.* 93, 1623–35. doi:10.3382/ps.2013-03705
- Marin, R.H., Satterlee, D.G., 2004. Cloacal gland and testes development in male Japanese quail selected for divergent adrenocortical responsiveness. *Poult. Sci.* 83, 1003–10.
- Marsh, J.A., Scanes, C.G., 1994. Neuroendocrine-immune interactions. *Poult. Sci.* 73, 1049–1061. doi:10.3382/ps.0731049
- Martijena, I.D., Salvatierra, N.A., Arce, A., 1992. Benzodiazepine receptor recruitment after acute stress in synaptosomal membranes from forebrain of young chicks: action of Triton X-100. *J. Neural Transm. Gen. Sect.* 87, 97–104.
- Martin, L.B., Gilliam, J., Han, P., Lee, K., Wikelski, M., 2005. Corticosterone suppresses cutaneous immune function in temperate but not tropical House Sparrows, *Passer domesticus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 140, 126–35. doi:10.1016/j.ygcen.2004.10.010
- Mashaly, M.M., Trout, J.M., Hendricks, G., al-Dokhi, L.M., Gehad, a, 1998. The role of neuroendocrine immune interactions in the initiation of humoral immunity in chickens. *Domest. Anim. Endocrinol.* 15, 409–22.
- Mashaly, M.M., Trout, J.M., Hendricks, G.L., 1993. The endocrine function of the immune cells in the initiation of humoral immunity. *Poult. Sci.* 72, 1289–93.
- Masson, P., 1914. La glande endocrine de l'intestin chez l'homme. *Compt. Rend. Acad. Ciencia.* 158, 59.
- Matuszewich, L., Karney, J.J., Carter, S.R., Janasik, S.P., O'Brien, J.L., Friedman, R.D., 2007. The delayed effects of chronic unpredictable stress on anxiety measures. *Physiol. Behav.* 90, 674–81. doi:10.1016/j.physbeh.2006.12.006
- May, R.M., 2006. Network structure and the biology of populations. *Trends Ecol. Evol.* 21, 394–9. doi:10.1016/j.tree.2006.03.013
- Mazzarello, P., 1998. Camillo Golgi (1843-1926). *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 64, 212.
- McAdie, T., Keeling, L., 2000. Effect of manipulating feathers of laying hens on the incidence of feather pecking and cannibalism. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 68, 215–229.
- McFadden, L.M., Paris, J.J., Mitzelfelt, M.S., McDonough, S., Frye, C.A., Matuszewich, L., 2011. Sex-dependent effects of chronic unpredictable stress in the water maze. *Physiol. Behav.* 102, 266–75. doi:10.1016/j.physbeh.2010.10.022
- McMenemey, W.H., 1953. Santiago Ramón y Cajal; 1852-1934. *Proc. R. Soc. Med.* 46, 173–8.

- McNamara, J.M., 2005. Stress, resource allocation, and mortality. *Behav. Ecol.* 16, 1008–1017. doi:10.1093/beheco/ari087
- Medley, G.F., 2002. The epidemiological consequences of optimisation of the individual host immune response. *Parasitology* 125 Suppl, S61–70.
- Medvei, V.C., 1993. *The History of Clinical Endocrinology: A Comprehensive Account of Endocrinology from Earliest Times to the Present Day.*
- Metal'Nikov, S., Chorine, V., 1920. Rôle des réflexes conditionnels dans l'immunité. *Ann. Inst. Pasteur.*
- Miller, L.L., Siegel, P.B., Dunnington, E.A., 1992. Inheritance of antibody response to sheep erythrocytes in lines of chickens divergently selected for fifty-six-day body weight and their crosses. *Poult. Sci.* 71, 47–52.
- Mølvg, J., Baek, L., Christensen, P., Manogue, K.R., Vlassara, H., Platz, P., Nielsen, L.S., Svejgaard, A., Nerup, J., 1988. Endotoxin-stimulated human monocyte secretion of interleukin 1, tumour necrosis factor alpha, and prostaglandin E2 shows stable interindividual differences. *Scand. J. Immunol.* 27, 705–16.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., Coffman, R.L., 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136, 2348–57.
- Mumma, J.O., Thaxton, J.P., Vizzier-Thaxton, Y., Dodson, W.L., 2006. Physiological stress in laying hens. *Poult. Sci.* 85, 761–9.
- Murphy, K., 2009. *Inmunobiología de Janeway*, 7^o ed. Interamericana de México.
- Nazar, F.N., Magnoli, a P., Dalcero, a M., Marin, R.H., 2012. Effect of feed contamination with aflatoxin B1 and administration of exogenous corticosterone on Japanese quail biochemical and immunological parameters. *Poult. Sci.* 91, 47–54. doi:10.3382/ps.2011-01658
- Nazar, F.N., Marin, R.H., 2011. Chronic stress and environmental enrichment as opposite factors affecting the immune response in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Stress* 14, 166–73. doi:10.3109/10253890.2010.523093
- Neeck, G., 2002. Fifty years of experience with cortisone therapy in the study and treatment of rheumatoid arthritis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 966, 28–38.
- Oláh, I., Nagy, N., Vervelde, L., 2014. *Avian Immunology Techniques*, Avian Immunology. Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-396965-1.00002-9
- Otsuka, M., 2007. Contributions to the field of neurotransmitters by Japanese scientists, and reflections on my own research. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 83, 47–64.

- Padgett, D.A., Glaser, R., 2003. How stress influences the immune response. *Trends Immunol.* 24, 444–448. doi:10.1016/S1471-4906(03)00173-X
- Palme, R., Rettenbacher, S., Touma, C., El-Bahr, S.M., Möstl, E., 2005. Stress hormones in mammals and birds: comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1040, 162–71. doi:10.1196/annals.1327.021
- Parham, P., 2006. *Inmunología*. Ed. Médica Panamericana.
- Pavlov, V.A., Tracey, K.J., 2005. The cholinergic anti-inflammatory pathway. *Brain. Behav. Immun.* 19, 493–9. doi:10.1016/j.bbi.2005.03.015
- Pedersen, A.B., Fenton, A., 2007. Emphasizing the ecology in parasite community ecology. *Trends Ecol. Evol.* 22, 133–9. doi:10.1016/j.tree.2006.11.005
- Popper, K.R., 2005. *El Mito del marco común: en defensa de la ciencia y la racionalidad*. Editorial Paidós.
- Praga, D., 2010. CÉLULAS DE PURKINJE Johannes Evangelista Purkinje (1787-1869).
- Puvadolpirod, S., Thaxton, J.P., 2000. Model of physiological stress in chickens 1. Response parameters. *Poult. Sci.* 79, 363–9.
- Raisman, G., 1997. An urge to explain the incomprehensible: Geoffrey Harris and the discovery of the neural control of the pituitary gland. *Annu. Rev. Neurosci.* 20, 533–66. doi:10.1146/annurev.neuro.20.1.533
- Raju, T.N., 1999. The Nobel chronicles. 1936: Henry Hallett Dale (1875-1968) and Otto Loewi (1873-1961). *Lancet* 353, 416.
- Rasoli, M., Yeap, S.K., Tan, S.W., Moeini, H., Ideris, A., Bejo, M.H., Alitheen, N.B.M., Kaiser, P., Omar, A.R., 2014. Alteration in lymphocyte responses, cytokine and chemokine profiles in chickens infected with genotype VII and VIII velogenic Newcastle disease virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 37, 11–21. doi:10.1016/j.cimid.2013.10.003
- Rauw, W., Kanis, E., Noordhuizen-Stassen, E., Grommers, F., 1998. Undesirable side effects of selection for high production efficiency in farm animals: a review. *Livest. Prod. Sci.* 56, 15–33. doi:10.1016/S0301-6226(98)00147-X
- Rauw, W.M., 2012. Immune response from a resource allocation perspective. *Front. Genet.* 3, 267. doi:10.3389/fgene.2012.00267
- Reese, E.P., Reese, T.W., 1962. The quail, *Coturnix coturnix* as a laboratory animal. *J. Exp. Anal. Behav.* 5, 265–70. doi:10.1901/jeab.1962.5-265

- Rettenbacher, S., Möstl, E., Hackl, R., Ghareeb, K., Palme, R., 2004. Measurement of corticosterone metabolites in chicken droppings. *Br. Poult. Sci.* 45, 704–11. doi:10.1080/00071660400006156
- Reveron, R.R., 2007. Andreas Vesalius (1514-1564): Fundador de la Anatomía Humana Moderna. *Int. J. Morphol.* 25, 847–850.
- Richard, S., Wacrenier-Ceré, N., Hazard, D., Saint-Dizier, H., Arnould, C., Faure, J.M., 2008. Behavioural and endocrine fear responses in Japanese quail upon presentation of a novel object in the home cage. *Behav. Processes* 77, 313–9. doi:10.1016/j.beproc.2007.07.005
- Romano, T.A., Felten, S.Y., Olschowka, J.A., Felten, D.L., 1994. Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid organs in the beluga, *Delphinapterus leucas*: an anatomical link between the nervous and immune systems. *J. Morphol.* 221, 243–59. doi:10.1002/jmor.1052210302
- Romero Reveron, R., Reveron, R.R., 2007. Andreas Vesalius (1514-1564): Fundador de la Anatomía Humana Moderna. *Int. J. Morphol.* 25, 847–850. doi:10.4067/S0717-95022007000400026
- Rubolini, D., Romano, M., Boncoraglio, G., Ferrari, R.P., Martinelli, R., Galeotti, P., Fasola, M., Saino, N., 2005. Effects of elevated egg corticosterone levels on behavior, growth, and immunity of yellow-legged gull (*Larus michahellis*) chicks. *Horm. Behav.* 47, 592–605. doi:10.1016/j.yhbeh.2005.01.006
- Ruff, M.D., 1999. Important parasites in poultry production systems. *Vet. Parasitol.* 84, 337–347. doi:10.1016/S0304-4017(99)00076-X
- Saito, S., Tachibana, T., Choi, Y.-H., Denbow, D.M., Furuse, M., 2005. ICV CRF and isolation stress differentially enhance plasma corticosterone concentrations in layer- and meat-type neonatal chicks. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 141, 305–9. doi:10.1016/j.cbpb.2005.05.054
- Salaberria, C., Muriel, J., de Luna, M., Gil, D., Puerta, M., 2013. The PHA test as an indicator of phagocytic activity in a passerine bird. *PLoS One* 8, e84108. doi:10.1371/journal.pone.0084108
- Satterlee, D.G., Marin, R.H., 2004. Photoperiod-induced changes in cloacal gland physiology and testes weight in male Japanese quail selected for divergent adrenocortical responsiveness. *Poult. Sci.* 83, 1003–10.
- Scanes, C.G., 2000. *Sturkie's Avian Physiology*, *Sturkie's Avian Physiology*. Elsevier. doi:10.1016/B978-012747605-6/50017-1
- Scanes, C.G., 2009. Perspectives on the endocrinology of poultry growth and metabolism. *Gen. Comp. Endocrinol.* 163, 24–32. doi:10.1016/j.ygcen.2009.04.013

- Schaaf, M.J.M., Cidlowski, J.A., 2002. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 83, 37–48.
- Scharrer, E., Scharrer, B., 1945. NEUROSECRETION. *Physiol Rev* 25, 171–181.
- Scharrer, B. V, 1998. 1906—1995.
- Scheiner, S.M., Willig, M.R., 2007. A general theory of ecology. *Theor. Ecol.* 1, 21–28. doi:10.1007/s12080-007-0002-0
- Schültz, K.E., Jensen, P., 2001. Effects of resource allocation on behavioural strategies: a comparison of red junglefowl (*Gallus gallus*) and two domesticated breeds of poultry. *Ethology* 765, 753–765.
- Schultz, U., Magor, K.E., 2014. *Avian Immunology Agricultural, Avian Immunology*. Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-396965-1.00021-2
- Scott, P., 1989. The role of TH1 and TH2 cells in experimental cutaneous leishmaniasis. *Exp. Parasitol.* 68, 369–372. doi:10.1016/0014-4894(89)90120-3
- Selye, H., 1936. Immunoregulation mediated by the sympathetic nervous system. *Br. J. Exp. Pathol.* 17, 234.
- Sever, J., 1962. Application of a microtechnique to viral serological investigations. *J. Immunol.*
- Shampo, M.A., Kyle, R.A., 1995. Ulf von Euler--norepinephrine and the Nobel Prize. *Mayo Clin. Proc.* 70, 273.
- Shini, S., Huff, G.R., Shini, A., Kaiser, P., 2010a. Understanding stress-induced immunosuppression: exploration of cytokine and chemokine gene profiles in chicken peripheral leukocytes. *Poult. Sci.* 89, 841–51. doi:10.3382/ps.2009-00483
- Shini, S., Kaiser, P., 2009. Effects of stress, mimicked by administration of corticosterone in drinking water, on the expression of chicken cytokine and chemokine genes in lymphocytes. *Stress* 12, 388–99. doi:10.1080/10253890802526894
- Shini, S., Shini, A., Huff, G.R., 2009. Effects of chronic and repeated corticosterone administration in rearing chickens on physiology, the onset of lay and egg production of hens. *Physiol. Behav.* 98, 73–7. doi:10.1016/j.physbeh.2009.04.012
- Shini, S., Shini, A., Kaiser, P., 2010b. Cytokine and chemokine gene expression profiles in heterophils from chickens treated with corticosterone. *Stress* 13, 185–94. doi:10.3109/10253890903144639
- Siegel, H.S., 1980. Physiological Stress in Birds. *Bioscience* 30, 529–534. doi:10.2307/1307973

- Smans, L.C.C.J., Zelissen, P.M.J., 2012. Thomas Addison and the adrenal gland. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 156, A4788.
- Smith, E.M.G., 1994. Neuropeptides and Immunoregulation. doi:10.1007/978-3-642-78480-4
- Smits, J.E.G., Baos, R., 2005. Evaluation of the antibody mediated immune response in nestling American kestrels (*Falco sparverius*). *Dev. Comp. Immunol.* 29, 161–70. doi:10.1016/j.dci.2004.06.007
- Stadecker, M., Lukic, M., 1977. The cutaneous basophil response to phytohemagglutinin in chickens. *J. Immunol.* 1564–1568.
- Sternberg, E.M., 2001. Neuroendocrine regulation of autoimmune/inflammatory disease. *J. Endocrinol.* 429–435.
- Sternberg, E.M., Hill, J., 1989. Inflammatory mediator-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation is defective in streptococcal cell wall arthritis-susceptible Lewis rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 2374–2378.
- Sternberg, E.M., Young, W.S., Bernardini, R., Calogero, A.E., Chrousos, G.P., Gold, P.W., Wilder, R.L., 1989. A central nervous system defect in biosynthesis of corticotropin-releasing hormone is associated with susceptibility to streptococcal cell wall-induced arthritis in Lewis rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 4771–5.
- Summers, C.H., 2002. Social interaction over time, implications for stress responsiveness. *Integr. Comp. Biol.* 42, 591–9. doi:10.1093/icb/42.3.591
- Szentivanyi, A., 1968. The beta adrenergic theory of the atopic abnormality in bronchial asthma. *J. Allergy* 42, 203–232. doi:10.1016/S0021-8707(68)90117-2
- Toivanen, A., Toivanen, P., 1987. *Avian immunology: basis and practice* 481.
- Tonelli, L.H., Maeda, S., Rapp, K.L., Sternberg, E.M., 2003. Differential induction of interleukin-1 β mRNA in the brain parenchyma of Lewis and Fischer rats after peripheral injection of lipopolysaccharides. *J. Neuroimmunol.* 140, 126–136. doi:10.1016/S0165-5728(03)00171-1
- Tonkoff, W., 1899. Zur Kenntnis der Nerven der Lymphdrüsen. *Anat Anz.*
- Tracey, K.J.,. The inflammatory reflex. *Nature* 420, 853–9. doi:10.1038/nature01321
- Tubbs, R.S., Loukas, M., Shoja, M.M., Oakes, W.J., 2007. Matthew Baillie (1761-1823) and his early detailed descriptions of childhood hydrocephalus in the *Morbid Anatomy*. *J. Neurosurg.* 107, 338–41. doi:10.3171/PED-07/10/338
- Turnbull, A. V, Rivier, C.L., 1999. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol. Rev.* 79, 1–72.

- Uchiyama, R., Moritomo, T., Kai, O., Uwatoko, K., Inoue, Y., Nakanishi, T., 2005. Counting absolute number of lymphocytes in quail whole blood by flow cytometry. *J. Vet. Med. Sci.* 67, 441–4.
- Uno, Y., Usui, T., Fujimoto, Y., Ito, T., Yamaguchi, T., 2012. Quantification of interferon, interleukin, and Toll-like receptor 7 mRNA in quail splenocytes using real-time PCR. *Poult. Sci.* 91, 2496–501. doi:10.3382/ps.2012-02283
- Üstün, C., 2004. Dr. Thomas Willis' famous eponym: The circle of Willis. *Turkish J. Med. Sci.* 34, 271–274.
- Vallabhapurapu, S., Karin, M., 2009. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 693–733. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132641
- Van der Most, P.J., de Jong, B., Parmentier, H.K., Verhulst, S., 2011. Trade-off between growth and immune function: a meta-analysis of selection experiments. *Funct. Ecol.* 25, 74–80. doi:10.1111/j.1365-2435.2010.01800.x
- Viney, M.E., Riley, E.M., Buchanan, K.L., 2005. Optimal immune responses: immunocompetence revisited. *Trends Ecol. Evol.* 20, 665–9. doi:10.1016/j.tree.2005.10.003
- Wall, J.P., Cockrem, J.F., 2010. Effects of corticosterone treatment in laying Japanese quail. *Br. Poult. Sci.* 51, 278–88. doi:10.1080/00071661003745828
- Wang, T., Zhang, X., Li, J.J., 2002. The role of NF-kappaB in the regulation of cell stress responses. *Int. Immunopharmacol.* 2, 1509–20.
- Wei, R., Listwak, S.J., Sternberg, E.M., 2003. Lewis hypothalamic cells constitutively and upon stimulation express higher levels of mRNA for pro-inflammatory cytokines and related molecules: comparison with inflammatory resistant Fischer rat hypothalamic cells. *J. Neuroimmunol.* 135, 10–28.
- Westendorp, R.G., Langermans, J.A., Huizinga, T.W., Elouali, A.H., Verweij, C.L., Boomsma, D.I., Vandenbroucke, J.P., Vandenbrouke, J.P., 1997. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet* 349, 170–3.
- Wilson, D.S., 1998. Adaptive individual differences within single populations. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 353, 199–205. doi:10.1098/rstb.1998.0202
- Zelazowski, P., Smith, M.A., Gold, P.W., Chrousos, G.P., Wilder, R.L., Sternberg, E.M., 1992. In vitro regulation of pituitary ACTH secretion in inflammatory disease susceptible Lewis (LEW/N) and inflammatory disease resistant Fischer (F344/N) rats. *Neuroendocrinology* 56, 474–82.
- Zhou, L., Chong, M.M.W., Littman, D.R., 2009. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity* 30, 646–55. doi:10.1016/j.immuni.2009.05.001