

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y
NATURALES.

Carrera de Ciencias Biológicas.

**Demandas simultáneas: estrés crónico y
desafío inmune en codornices japonesas.
Efectos sobre los parentales y su
progenie.**

Tesinista: Octavio Giayetto.

Firma:

Director: Prof. Dr. F. Nicolás Nazar.

Firma:

CoDirector: Prof. Dr. Raúl H. Marín.

Firma:

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA), FCEFyN, UNC.

Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIByT), CONICET – UNC.

Índice

Introducción	3
Hipótesis	5
Objetivo General	5
Objetivos Específicos	6
Materiales y Métodos	6
Resultados	12
Discusión	20
Conclusión	25
Bibliografía	26

Título

Demandas simultáneas: estrés crónico y desafío inmune en codornices japonesas. Efectos sobre los parentales y su progenie.

Palabras clave

Fisiología – estrés – adaptabilidad – aves.

Introducción

Los acontecimientos ocurridos en el ambiente donde se desarrollan los individuos parentales y, por ende, donde ocurre el desarrollo temprano de un individuo (experiencias tanto pre- como neonatales) tienen la potencialidad de repercutir por diversos mecanismos en sus características fenotípicas, pudiendo impactar en diferentes variables relacionadas a la historia de vida de dichos individuos (Burton y Metcalfe,; Bertin y Richard-Yris, 2004, 2005; Groothuis et al., 2005; Monaghan, 2008; Lupien et al., 2009; Gudsruk and Champagne, 2012). De esta manera, reviste especial importancia considerar la conformación del ambiente tanto parental como en el que las crías transcurren sus primeros días de vida.

El proceso por el cual las condiciones en las que se desarrolla un organismo son capaces de modelar su fenotipo ha sido definido como “developmental programming” y propone la existencia de efectos trans-generacionales causados por la exposición a determinadas condiciones durante el desarrollo temprano de un individuo (Aiken and Ozanne, 2014; Zimmer et al., 2017)..Otra aproximación teórica al concepto es aquella que lo define como un conjunto de cambios fenotípicos en la descendencia, en respuesta al ambiente parental (Aiken and Ozanne, 2014). Se ha descrito que la progenie que resultante de distintas configuraciones ambientales parentales manifiesta diversas consecuencias que pueden ser negativas, como por ejemplo trastornos metabólicos (Cottrell and Seckl, 2009; Martin-Gronert and Ozanne, 2012) y problemas reproductivos (Sloboda et al., 2011), o pueden ser positivos, entre ellas, un mejor acoplamiento de las crías a un ambiente similar al experimentado durante su desarrollo (Zimmer et al., 2013, 2017; Zimmer and Spencer, 2014).

En vertebrados, una de las vías por las cuales se establecen relaciones ambiente-individuo y se integra la información que se obtiene de dichas interacciones es el eje Hipotálamo-Pituitario-Adrenal (HPA) (Kudielka and Kirschbaum, 2005; Koolhaas, 2008). En conjunto con otras dos vías: sistema nervioso simpático-adrenal y vagal-colinérgica, el eje HPA forma parte de un macro-sistema conocido como inmunoneuroendócrino (INE). Éste funciona de manera holística, bajo el

concepto de que tanto los mediadores como los grupos celulares que conforman a cada uno de ellos por separado se influyen y regulan entre sí, estableciendo una compleja y altamente regulada comunicación multidireccional (Turnbull and Rivier, 1999; Elenkov et al., 2000; van Westerloo et al., 2005; Elenkov, 2008).

En el marco previamente descrito (interfaz INE), la respuesta fisiológica al estrés es un fuerte desencadenante de su acción conjunta. La misma se ha definido como una respuesta neurofisiológica y adaptativa, desencadenada a partir de la percepción de un estímulo (estresor) interpretado como potencialmente nocivo para la homeostasis del individuo (Siegel, 1995; Kuenzel and Jurkevich, 2010). Esta respuesta implica una conexión entre sistemas para la liberación coordinada de catecolaminas por un lado (vía simpático-adrenal) y glucocorticoides como corticosterona (CORT) en aves por otro (eje HPA) (De Kloet, 2003; Scanes, 2016). Tanto en aves como en mamíferos, la exposición a estresores sostenida en el tiempo (estrés crónico) se torna adversa para el organismo, causando desbalances metabólicos, hormonales e inmunes, entre otros (Webster Marketon and Glaser, 2008; Shini et al., 2010; Nazar and Marin, 2011; Nazar et al., 2018a). Como se dijera previamente, las interacciones entre los sistemas no son unidireccionales. La activación del sistema inmune ante el ingreso de un antígeno, ya sea patogénico o no, además de ser energéticamente demandante, está desafiando a ese organismo inmunológicamente, obligándolo a movilizar reservas para lograr la eliminación del mismo (Klasing, 1998; Kogut and Klasing, 2009; Blom y Ottaviani, 2017). La respuesta de este último es regulada por la acción conjunta de los tres sistemas. Por ejemplo, la liberación de citoquinas pro-inflamatorias actúan a nivel del sistema nervioso central y pueden desencadenar una respuesta regulatoria de esa inflamación mediada por GC (Besedovsky et al., 1986; Elenkov, 2008).

El accionar del sistema INE no se limita solo a mediar respuestas fisiológicas, sino que potencialmente puede alterar el comportamiento de los individuos a causa de los mediadores liberados por su activación, ya sea debido a una respuesta ante un estrés agudo o uno crónico. Las influencias de este último abarcan cambios en comportamientos de interacción social que incluyen alteraciones de las estructuras sociales preestablecidas, aumento de comportamientos agresivos, reducción de conductas reproductivas e incluso pueden afectar el adecuado uso y obtención de recursos (Jones, 1989; Veenema, 2009; Calandreau et al., 2011; Zimmer et al., 2013; McCormick et al., 2015; Sandi and Haller, 2015; Nazar et al., 2015b).

En aves, el huevo es una estructura clave por diversos motivos: i) es el nexo entre la generación parental y la filial sucesiva y ii) proporciona el ambiente apto para el desarrollo embrionario encontrándose composicionalmente relacionado con la hembra (hormonas,

anticuerpos, lípidos, glúcidos, etc.) (Gil, 2008; Sossidou and Elson, 2009; Scanes, 2014). Esta relación puede establecerse vía incorporación directa a causa de la acción de células esteroidogénicas, que rodean al folículo en desarrollo; o por difusión vía sanguínea, ambas posibles durante el proceso de formación de la yema. A pesar de que este último proceso es relativamente corto (alrededor de 7 días), los GCs depositados en huevo por la activación del eje HPA en la hembra (Hayward and Wingfield, 2004; Saino et al., 2005) tienen diversos efectos en el fenotipo del pichón en desarrollo, por lo que han sido motivo de estudio durante los últimos años (Monaghan, 2008; Lupien et al., 2009; Love et al., 2013; Sheriff and Love, 2013; Zimmer et al., 2017). Un posible marco referencial en las interpretaciones sobre estos efectos trans-generacionales en el contexto de “developmental programming” sostiene que serían mediados por la acción de glucocorticoides y otros componentes presentes en huevo.

De esta manera reviste especial importancia el estudio de fenómenos ambientales que sucedan de manera concertada en los individuos. El pensar estos eventos en una generación parental ya posee el beneficio de brindar información sobre cómo se administran y redirigen los recursos INE disponibles al presentarse diferentes escenarios ambientales con una serie de demandas fisiológicas, cada una por separado o en simultáneo. El estudio de una generación filial 1 (F1) brinda además las potencialidades de estudiar cómo es el nexo INE entre ambas generaciones y qué ventajas o desventajas brinda a la progenie el escenario vivido por sus parentales.

Hipótesis

Tanto una respuesta de estrés crónico como un desafío inmune sobre la generación parental serán integradas en la interfaz inmunoneuroendócrina, generando alteraciones en la misma, como también cambios al nivel de dicha interfaz en sus crías (F1), lo cual se traducirá además en alteraciones comportamentales.

Objetivo general

Profundizar en la caracterización de los potenciales efectos inmunoneuroendócrinos que tienen diferentes escenarios ambientales desafiantes para la generación parental sobre caracteres inmunoneuroendócrinos propios y sobre caracteres inmunoneuroendócrinos y comportamentales de su descendencia.

Objetivos específicos

Evaluar si un estrés crónico por calor, un desafío inmune, y/o ambos en simultáneo son capaces de modular variables inmunoneuroendócrinas en codornices japonesas adultas.

Evaluar si un estrés crónico por calor, un desafío inmune, y/o ambos en simultáneo desarrollados en codornices japonesas adultas (parentales) pueden inducir cambios transgeneracionales fisiológicos (a nivel inmunoneuroendócrino) y comportamentales (utilización de recursos y estructura social) en la progenie.

Materiales y métodos

El presente estudio emplea codornices japonesas como objeto de estudio. Su rápido ciclo reproductivo (llegan a adultos en menos de 2 meses) y la alta tasa de postura de huevos por día (0.95) (Marin et al., 2002) lo hacen un excelente modelo animal de laboratorio para estudiar efectos transgeneracionales. Las aves fueron criadas y alimentadas según metodologías de rutina de nuestro laboratorio, descritos por Marin y Satterlee (2004).

En el primer día de edad fueron alojadas en cajas de cría de madera blanca (90 x 90 x 60 cm; largo x ancho x alto respectivamente). El piso de las cajas se encontró levantado 5 cm de la base para permitir el paso de la excreta. Cada caja posee un comedero dispuesto en el frente y 16 bebederos automáticos (tipo "nipple") y una tapa para evitar el escape de las aves y la pérdida de calor.

Las aves fueron mantenidas en un ciclo diario de 14 horas luz (330-350 lux): 10 de oscuridad (14:10 L:O), encendiéndose las luces a las 6:00 h.

Para cumplir con los objetivos propuestos, el experimento fue llevado a cabo en dos etapas, diferenciadas por la utilización de la generación parental o la filial 1 (F1).

Etapa 1- conformación del ambiente prenatal.

Al alcanzar una edad suficiente para distinguir sexos (28 días de edad aproximadamente), los individuos se alojaron en parejas en jaulas de cría (45 x 20 x 25 cm, largo x ancho x alto respectivamente), con enriquecimientos ambientales estructurales (alfombras de cartón corrugado) y de contacto (pelotas de plástico) (Miller and Mench, 2006; Nazar and Marin, 2011) alternados cada 7 días. Tanto la temperatura como el foto-período continuaron controlados en esta etapa, establecidos en 24 ± 1 °C y 14:10 L:O, respectivamente. El suministro de agua y

alimento fue *ad libitum*. Se emplearon 4 baterías, en cada una de las cuales se alojaron 10 parejas, utilizando un total de 80 individuos (40 parejas).

A los 100 días de edad, se asignaron de manera aleatoria 10 parejas a cada uno de 4 tratamientos, obtenidos a partir de la combinación de dos factores (con dos niveles cada uno): estrés térmico (estresados vs. no estresados) e inoculación con *Salmonella enteriditis* (inoculado vs. no inoculado). Tratamientos resultantes:

- 1- Estresados e inoculados.
- 2- Estresados y no inoculados.
- 3- No estresados e inoculados.
- 4- No estresados y no inoculados.

Cada uno de los niveles de los factores se desarrolló metodológicamente del siguiente modo:

- Estrés térmico: se aplicó de manera crónica durante el período de luz, aumentando la temperatura del ambiente a 34°C durante 9 días comenzando a los 114 días de edad, de acuerdo a protocolos de este estresor en particular ya puestos a punto en nuestro laboratorio (Videla et al., 2016; Nazar et al., 2018a). Vale destacar que el aumento de temperatura se desarrolló únicamente durante la fase de luz del fotoperíodo, para así simular los efectos de días con elevadas temperaturas.
- Inoculación con Salmonella: cada ave fue inoculada a los 105 días de edad por vía intramuscular (en pectoral mayor derecho) con 300µl de una suspensión de *Salmonella enteriditis* inactivada a una densidad de 1×10^6 x ml. La inoculación se realizó 9 días previos al comienzo del protocolo de estrés para que los individuos desarrollen el máximo título de anticuerpos (14 días luego de la inoculación) afrontando paralelamente condiciones de estrés térmico ya avanzadas. Cabe destacar que estudios previos siguiendo esta misma metodología lograron la inducción de anticuerpos en el modelo animal en estudio (datos no publicados).

Los 4 tratamientos descriptos poseen el objeto de generar 4 escenarios INE diferentes en la generación parental. Para poder caracterizar cada uno, se realizaron en la generación parental las siguientes pruebas una vez finalizado el protocolo de estrés (por ende, 19 días después del inoculo):

- Titulación de anticuerpos inducidos: mediante una administración intraperitoneal de un antígeno no patogénico (glóbulos rojos de oveja -GRO-) suspendidos al 10% en buffer fosfato salino y una posterior extracción de sangre anti-coagulada de la vena braquial, una semana después de la inoculación para analizar la respuesta humoral inducida (Sever, 1962; Nazar and Marin, 2011).
- Porcentaje de inflamación: se analizará a partir de una inyección de Fitohemaglutinina-P (PHA-P) en la periferia de la vena braquial del ala derecha. La zona será medida con un micrómetro antes y 24 hs después de la administración de PHA-P para medir la proliferación inducida (Vinkler and Bainova, 2010; Nazar et al., 2015a).
- Extendido de sangre: realizados a partir de la misma muestra de sangre obtenida para la titulación inducida de anticuerpos. Se realizarán conteo de leucocitos y se obtendrá la relación Heterófilos/Linfocitos (H/L). Una relación H/L elevada ha sido reportada como indicadores de elevados niveles de mediadores de la respuesta de estrés circulantes (Scanes, 2016).

Para poder continuar con las etapas de este estudio, se recolectaron huevos de cada pareja durante los días 6, 7, 8, 9 y 10 luego de iniciado el protocolo de estrés crónico. Si bien el protocolo dura 9 días consecutivos, el huevo que colocado un día es producto de un descenso folicular que abarca las últimas 24 hs (Scanes, 2014). Así, un huevo puesto contiene información correspondiente al período de 24 hs inmediato anterior.

Etapa 2 – efecto de los diferentes escenarios INE de la generación parental en la F1.

Los huevos se incubaron de acuerdo a los mismos protocolos de rutina en nuestro laboratorio (Nazar et al. 2015a). Se marcaron de modo tal que se asegure el seguimiento por tratamiento de los parentales. Se obtuvieron 18 individuos provenientes de parentales sometidos a condiciones de estrés térmico e inoculación, 26 individuos provenientes de parentales únicamente estresados, 17 individuos cuyos parentales únicamente fueron inoculados y 21 individuos cuyos parentales no sufrieron ningún protocolo. Tras la eclosión, se identificaron pichones con anillos en sus patas y fueron criados en cajas de cría de acuerdo a los mismos protocolos ya descriptos para la generación parental.

Para el análisis de los efectos de los diferentes ambientes pre-natales se llevaron a cabo dos grupos de pruebas que evaluaron aspectos diferentes en los individuos: inmunoneuroendócrinas y comportamentales.

Pruebas inmunoneuroendócrinas: se analizaron las mismas variables que en la generación parental, a los 29 días de edad en todos los animales que conforman al grupo F1.

- Titulación de anticuerpos inducidos contra GRO.
- Porcentaje de inflamación: se analizará a partir de una inyección de PHA-P en la periferia de la vena braquial del ala derecha.
- Extendido de sangre: conteo de leucocitos para calcular la relación H/L.

Pruebas comportamentales: Se realizó a los 10 y 11 días de edad una prueba de ambiente novel que contenía elementos tanto conocidos (elementos de enriquecimiento-zona enriquecida) como desconocidos (provisión de agua y alimento en contenedores de material y estructura desconocida – zonas bebedero y comedero respectivamente) y además, contenía un sector neutral sin elementos (zona vacía).

El fundamento de la combinación de elementos en el ambiente de prueba se basó en ofrecer al animal diversos estímulos que permitan (al menos en los primeros momentos de interacción con el ambiente) ofrecer un potencial "resguardo" (mediante la aproximación a objetos conocidos), o bien incrementar el conflicto de las aves ya que se ofrecen recursos altamente apetecibles (agua y comida) en contenedores de estructura desconocida, lo cual es sabido que induce una respuesta de temor que se manifiesta como un alejamiento y falta de interacción para con esos objetos desconocidos (Jones, 1996). De este modo, se buscó favorecer la expresión de comportamientos diversos que permitan discriminar de una manera simple alteraciones en comportamientos básicos de supervivencia (uso de recursos y sociabilidad) a corto y mediano plazo en un ambiente novel.

El ambiente novel consistía en una caja de melamina blanca de 60 x 60 x 120 cm (ancho x largo x alto) (Kembro et al., 2008) que contenía una cámara de video grabación colocada en el centro de la tapa superior para registrar los comportamientos durante la prueba. Todas las cajas fueron diseñadas del mismo modo, definiendo 4 zonas diferentes en los mismos (ver imagen 1):

- 1- Zona comedero: cuarto de caja en cuyo vértice se colocó el comedero.
- 2- Zona bebedero: cuarto de caja en cuyo vértice se colocó el bebedero.
- 3- Zona enriquecida: cuarto de la caja con enriquecimientos estructurales y de contacto.

4- Zona vacía: se define por la ausencia de recursos, poseyendo solamente el cartón corrugado de sustrato, también presente en las otras zonas.

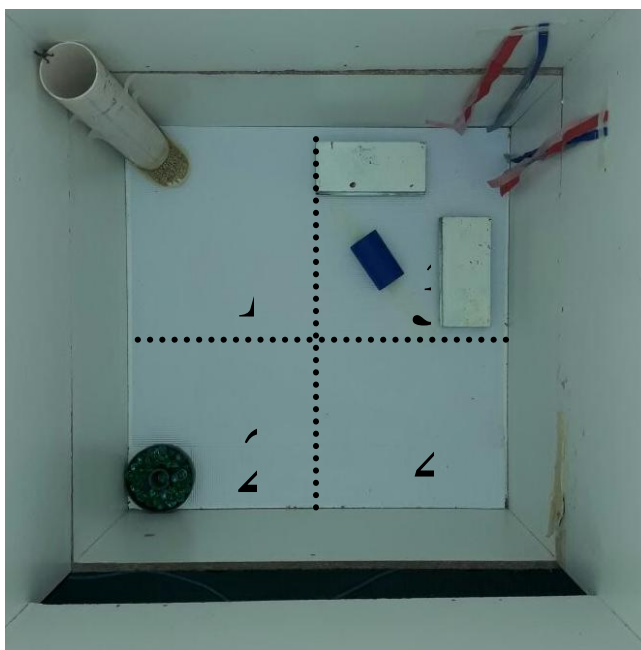


Fig. 1: Vista superior del dispositivo de ambiente novel enriquecido. Las líneas de punto son divisiones imaginarias que configuran 4 espacios o zonas de igual área en la superficie del dispositivo. 1: zona comedero, 2: zona bebedero, 3: zona enriquecida y 4: zona vacía. Al comenzar la prueba comportamental los individuos son colocados en conjunto y a la vez en la intersección de las líneas imaginarias (centro del dispositivo).

Para comenzar la prueba se colocaron en el centro del campo un grupo de 5 individuos de un mismo tratamiento parental, tomados de diferentes cajas de cría. De este modo, el grupo se conformó de 5 individuos desconocidos entre sí. Los comportamientos fueron video grabados durante 1 h de prueba. Por un lado se analizaron los comportamientos durante los primeros 5 minutos de la prueba a los efectos de evaluar la reacción inmediata a corto plazo de las aves en el nuevo ambiente y por otro se analizó la hora completa de prueba para incluir los comportamientos que se espera se evidencien cuando se ha disminuido el componente de temerosidad que induce el ambiente novel (Kembro et al., 2008). Es decir, se esperó que se expresen comportamientos de ambulación y exploración, interacción con objetos novel y mayor dispersión del grupo social a medida que la prueba avanzó. Mediante la utilización de una adaptación del programa IdTracker (Perez-Escudero y col. 2014) que fue realizado, puesto a punto y validado durante el desarrollo de este estudio; se extrajeron las coordenadas espaciales los 5

individuos al mismo tiempo a partir de cada video. Se generaron series de tiempo de las coordenadas espacial de cada individuo del grupo social. Con estas coordenadas, y conociendo la posición de los objetos en el ambiente novel, se calcularon las siguientes variables utilizando el programa MatLab:

*distancia media entre individuos: obtenidas mediante la utilización de las coordenadas XY de cada individuo en el aparato.

*distancia media al comedero y bebedero: obtenidas mediante la utilización de las coordenadas XY de cada individuo en relación a la posición espacial del comedero (zona 1) y el bebedero (zona 2)

*número de individuos promedio por cada zona.

*latencia de interacción con comedero (zona 1), bebedero (zona 2) y objetos de enriquecimiento (zona 3).

Se registraron de modo simultáneo 4 dispositivos, pudiendo estudiar los 4 grupos de la F1 representantes de cada tratamiento definido en la generación parental (estresados e inoculados, estresados y no inoculados, no estresados e inoculados, no estresados y no inoculados). Con el desarrollo consecutivo de 3 tandas de registro se completaron 3 réplicas de cada tratamiento, totalizando 15 individuos observados para cada tratamiento. La asignación en cada tanda de un tratamiento a un dispositivo fue aleatorizada para evitar el potencial efecto que pueden ejercer claves ambientales de la sala de experimentación.

Análisis estadístico.

Los datos de las variables de respuesta estudiadas fueron evaluados mediante modelos lineales generalizados y mixtos (MLGM). Se diseñó un modelo acorde para cada etapa analizada. **Análisis en generación parental:** se estudiaron los efectos del estrés térmico y de la inoculación como factores fijos y el efecto de la jaula donde fueron alojados las aves como factor aleatorio. En esta etapa las variables de respuesta evaluadas fueron las correspondientes a la interfaz INE. **Análisis en la F1:** se estudiaron los efectos del estrés térmico y de la inoculación en la generación parental como factores fijos y de la caja de alojamiento de los pichones como factor aleatorio. En esta etapa las variables de respuesta evaluadas fueron las correspondientes a la interfaz INE y las comportamentales. Vale destacar que la caja de ambiente novel empleada para las últimas pruebas fue incluida como factor aleatorio en la evaluación de variables comportamentales ya que grupos de 5 individuos compartían la misma caja y la disposición de las mismas en el espacio en

relación a potenciales ruidos y diferencias de temperatura podrían estar influyendo sobre las variables analizadas

En ambas etapas el título de anticuerpos contra GRO fue evaluado empleando una distribución Poisson, mientras que el porcentaje de inflamación y la relación H/L fueron evaluadas empleando una distribución Gamma. Las variables comportamentales fueron evaluadas empleando una distribución Gamma. La comparación de medias individuales a posteriori fue llevada a cabo utilizando test de Fischer LSD. Un valor de $p \leq 0,05$ fue considerado representante de diferencias significativas. Los análisis fueron llevados a cabo utilizando el software estadístico InfoStat (Di Rienzo et al., 2016).

Resultados

Caracterización de los escenarios INE de la generación parental.

El análisis mediante MLGM para la variable titulación de anticuerpos inducidos no mostró efectos significativos del estrés térmico ($F_{1, 73}=0,8$; $p=0,37$), la inoculación ($F_{1, 73}=0,13$; $p=0,72$), ni una interacción entre ellos ($F_{1, 73}=0,09$; $p=0,75$). Esto se traduce en que todos los animales producen similares títulos de anticuerpos. (Fig. 2)

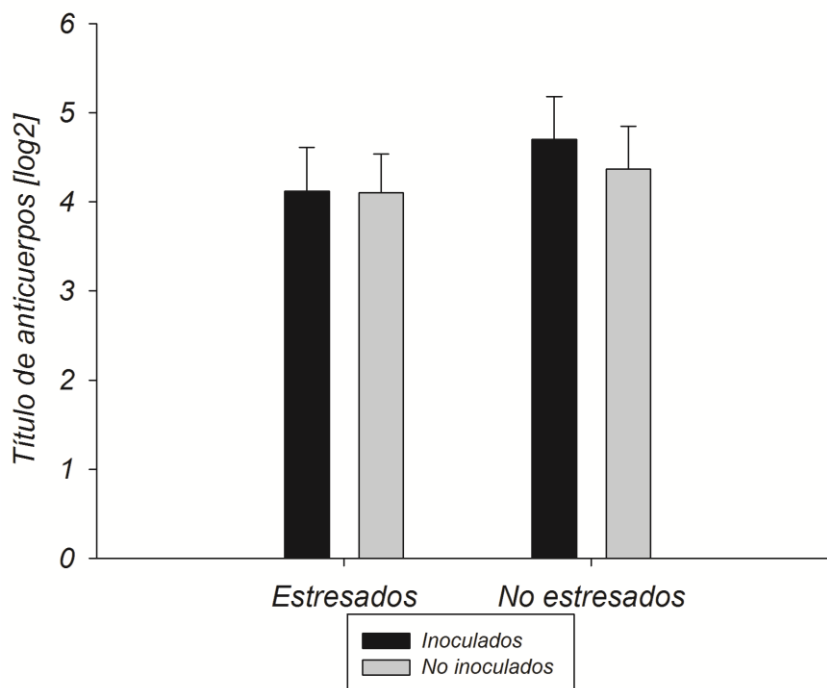


Fig. 2: Efectos del estrés térmico e Inoculación con *S. enteritidis* sobre la titulación de anticuerpos inducidos de codornices adultas (80). Las barras representan la media y las líneas el error estándar.

El análisis mediante MLGM para la variable porcentaje de inflamación mostró efectos significativos del estrés térmico ($F_{1, 76}=21,79$; $p<0,0001$), pero no así de la inoculación ($F_{1, 76}=0,15$; $p=0,69$) ni una interacción entre ellos ($F_{1, 76}=1,04$; $p=0,31$). Los individuos bajo el protocolo de estrés por calor exhibieron menor inflamación inducida independientemente de si fueron inoculados o no. (Fig. 3)

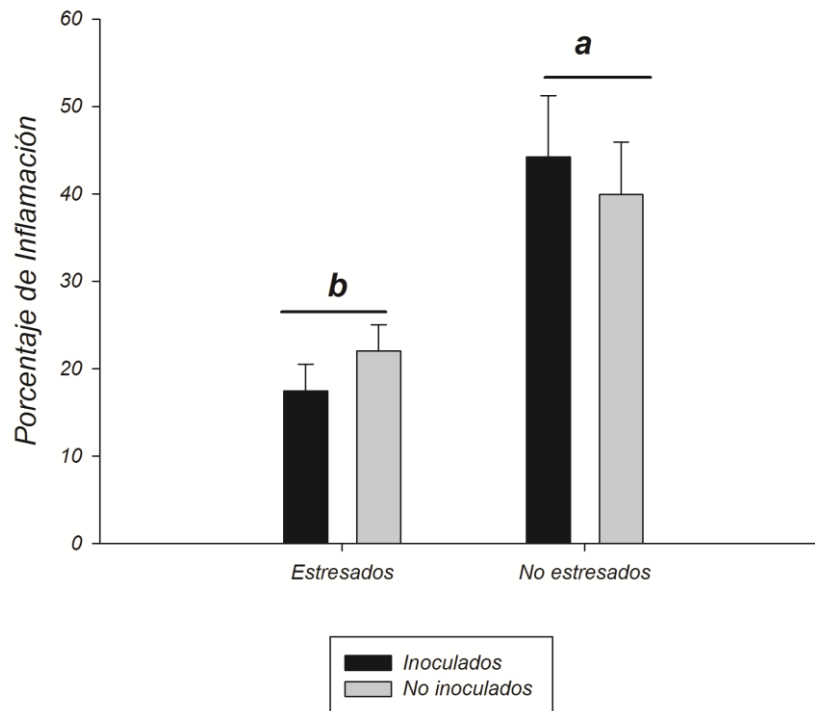


Fig. 3: Efectos del estrés térmico e Inoculación con *S. enteritidis* sobre el porcentaje de inflamación de codornices adultas (80). Las barras representan la media y las líneas el error estándar. ^{a,b}Las letras diferentes indican diferencia entre los Control y Estrés.

El análisis mediante MLGM para la variable relación H/L mostró efecto significativo del estrés térmico ($F_{1, 71}=5,16$; $p=0,02$). No se observaron efectos significativos de la inoculación ($F_{1, 71}=0,38$; $p=0,53$) ni una interacción entre ellos ($F_{1, 71}=0,23$; $p=0,63$). Los animales bajo el protocolo de estrés manifiestan los valores más elevados de relación H/L, independientemente de si fueron inoculados o no. (Fig. 4)

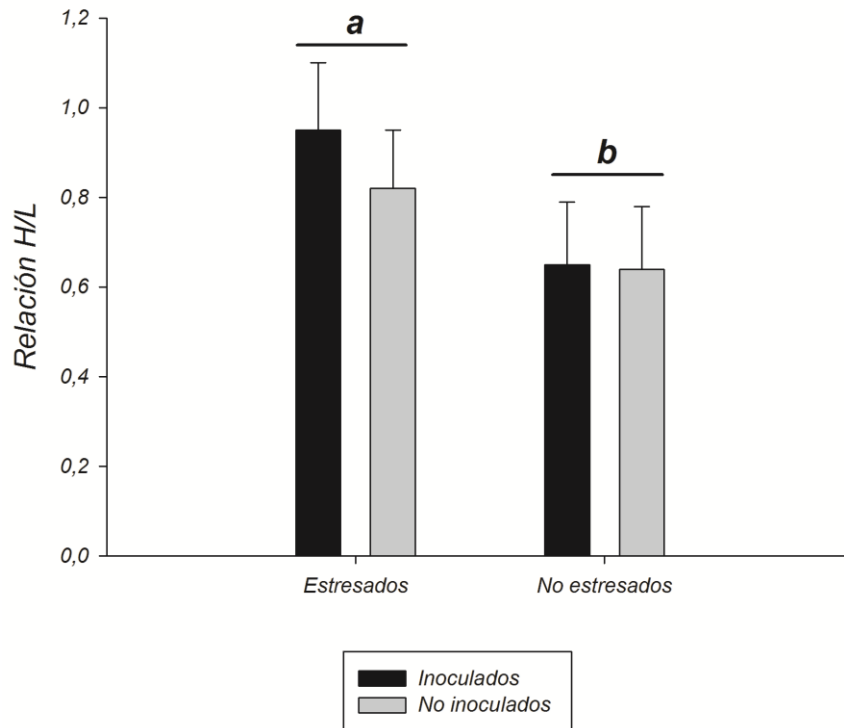


Fig. 4: Efectos del estrés térmico e Inoculación con *S. enteritidis* sobre la relación H/L de codornices adultas (80). Las barras representan la media y las líneas el error estándar. ^{a,b}Las letras diferentes indican diferencia entre los grupos Control y Estrés.

Caracterización del efecto de los diferentes escenarios INE de la generación parental en la F1.

El análisis mediante MLGM para la variable titulación de anticuerpos inducidos mostró efectos significativos del estrés térmico ($F_{1, 67} = 5,06$; $p = 0,0277$). No hubo efectos significativos de la inoculación ($F_{1, 67} = 0,0063$; $p = 0,9801$), ni interacción entre ellos ($F_{1, 67} = 0,05$; $p = 0,8188$). Los individuos bajo el protocolo de estrés por calor exhibieron un menor título de anticuerpos independientemente de si fueron inoculados o no. (Fig. 5)

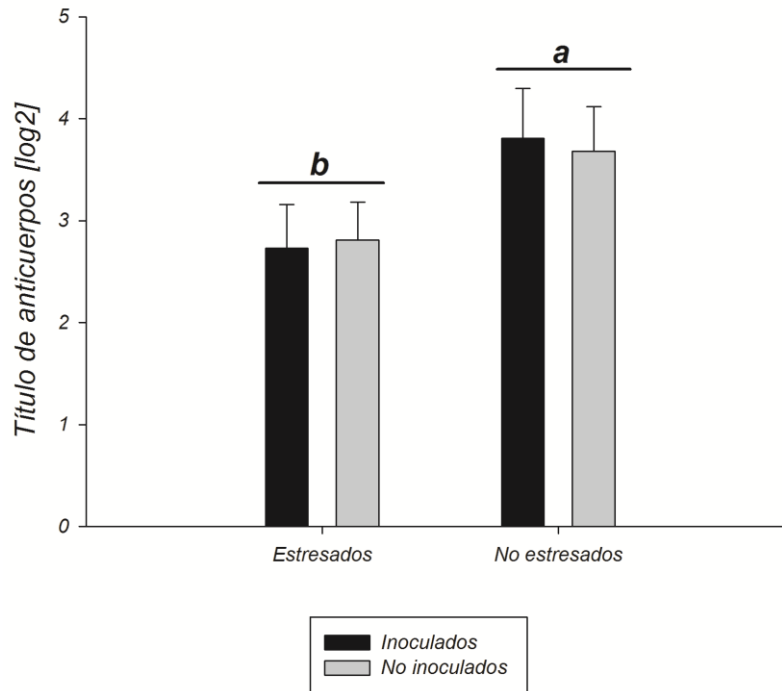


Fig. 5: Efectos del estrés térmico e Inoculación con *S. enteriditis* llevados a cabo en la generación parental sobre la titulación de anticuerpos en pichones de la F1 (82). Las barras representan la media y las líneas el error estándar. ^{a,b}Las letras diferentes indican diferencia entre los grupos Control y Estrés.

El análisis mediante MLGM para la variable porcentaje de inflamación mostró efectos significativos del estrés térmico ($F_{1, 74}=4,42$; $p=0,03$), pero no así de la inoculación ($F_{1, 74}=0,01$; $p=0,96$) ni de la interacción ($F_{1, 74}=0,09$; $p=0,76$). Los individuos cuyos parentales habían sido sometidos a un protocolo de estrés por calor exhibieron mayor inflamación inducida, independientemente de si fueron sus parentales inoculados o no. (Fig. 6)

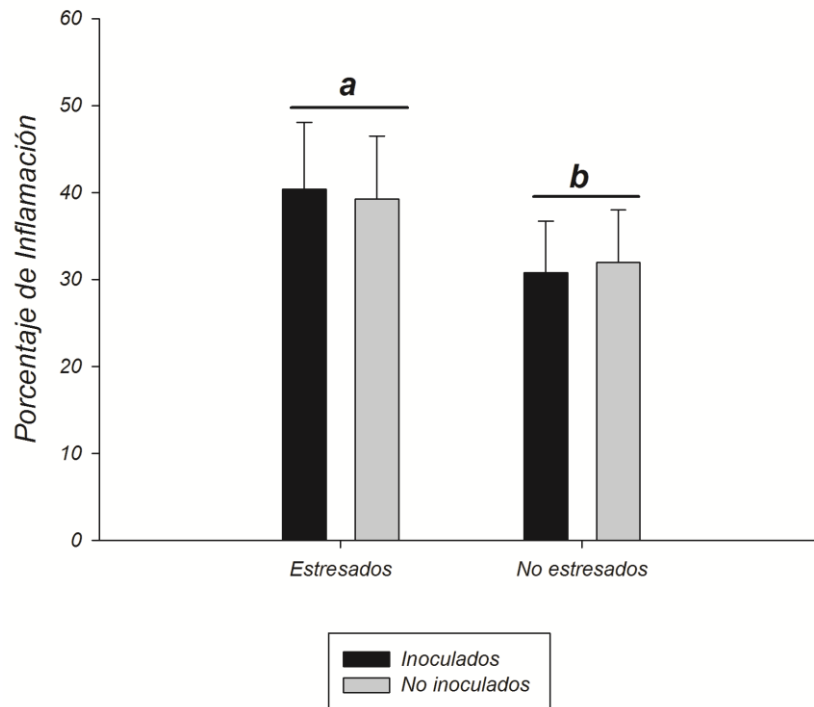


Fig. 6: Efectos del estrés térmico e Inoculación con *S. enteriditis* llevados a cabo en la generación parental sobre el porcentaje de inflamación en pichones de la F1(82). Las barras representan la media y las líneas el error estándar. ^{a,b} Las letras diferentes indican diferencia entre los Control y Estrés.

El análisis mediante MLGM para la variable relación H/L no mostró efectos significativos del estrés térmico ($F_{1, 74}=0,94$; $p=0,33$), de la inoculación ($F_{1, 74}=0,57$; $p=0,45$), ni interacción entre ellos ($F_{1, 74}=0,39$; $p=0,5351$). Esto se traduce en que todos los animales poseen similar relación H/L. (Fig. 7)

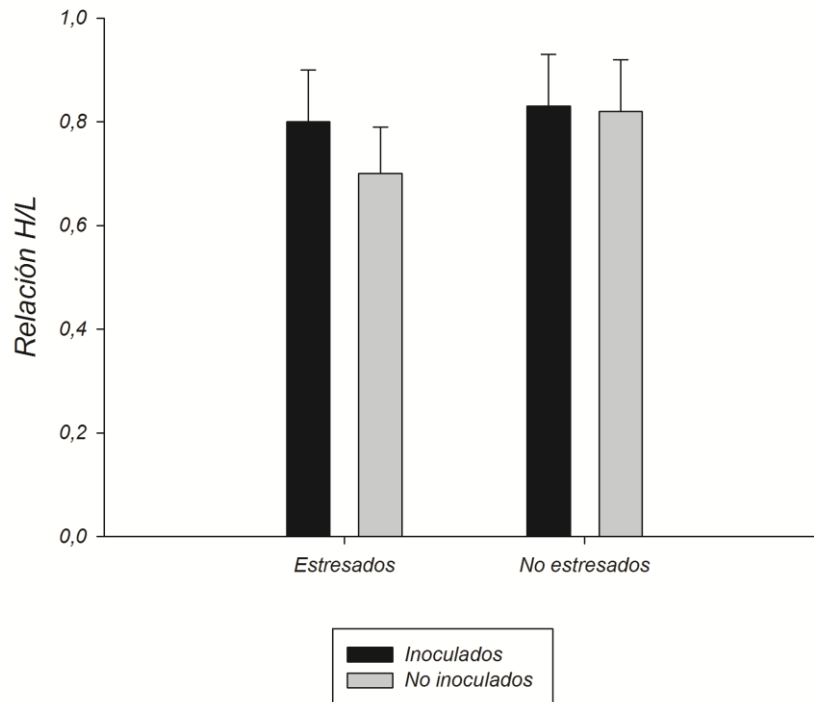


Fig. 7: Efectos del estrés térmico e Inoculación con *S. enteritidis* llevados a cabo en la generación parental sobre la relación H/L en pichones de la F1 (82). Las barras representan la media y las líneas el error estándar.

Dentro de las variables comportamentales registradas durante la prueba en el ambiente novel enriquecido (Tabla 1), no se hallaron efectos significativos del estrés térmico, de la inoculación ni de su interacción para ninguna de las dos variables relacionadas a las distancias medias entre individuos (a los 5' y 60' de prueba).

Dentro de los primeros 5 minutos, la variable distancia media al bebedero mostró efectos significativos del estrés térmico ($F_{1, 10}=6,22$; $p=0,031$) y una interacción entre el estrés térmico y la inoculación ($F_{1, 10}=6,67$; $p=0,02$). La variable número de individuos promedio en zona comedero mostró efectos significativos de la inoculación ($F_{1, 10}=11,24$; $p=0,007$) y una interacción entre el estrés térmico y la inoculación ($F_{1, 10}=5,39$; $p=0,04$).

Cuando se evaluó el comportamiento durante la totalidad de la prueba (60 min), la variable número de individuos promedio en zona vacía mostró efectos significativos de la inoculación ($F_{1, 10}=7,36$; $p=0,02$). La variable número de individuos promedio en zona enriquecida mostró efectos significativos de la inoculación ($F_{1, 10}=5,63$; $p=0,03$) y una interacción entre ésta y el estrés térmico ($F_{1, 10}=4,71$; $p=0,05$). Las variables latencia de interacción con los objetos de enriquecimiento y con

el bebedero mostraron efectos significativos de la inoculación ($F_{1,9}=14,72$; $p=0,004$ y $F_{1,10}=15,96$; $p=0,002$, respectivamente).

Tabla 1: Respuesta comportamental al ambiente novel enriquecido en grupos de pichones de 10 y 11 días de edad cuyos padres fueron expuestos a condiciones de estrés térmico por calor (34°C) durante 9 días y un desafío inmune. Media \pm E.E.. (Número de grupos de pichones analizados por tratamiento). Analizado mediante MLGM. *resalta los p-valores < 0,05. Prueba Fischer LSD.

Tiempo	Variable	Estrés Térmico				P Valor		
		Estresados		No estresados		Estrés Térmico	Inoculación	Interacción
		Inoculados (3)	No Inoculados (4)	Inoculados (3)	No Inoculados (4)			
5'	Distancia media entre individuos	20,35 \pm 0,7	19,93 \pm 5,24	16,91 \pm 6,71	21,09 \pm 4,2	0,61	0,43	0,35
	Distancia media al comedero	36,83 \pm 13,11	34,65 \pm 4,09	38,98 \pm 8,22	41,11 \pm 2,58	0,98	0,51	0,79
	Distancia media al bebedero	37,22 \pm 2,64	26,16 \pm 6,65	36,94 \pm 6,17	40,57 \pm 7,28	0,031*	0,16	0,02*
	Nº de individuos pormedio en zona Bebedero	1,24 \pm 1,41	2,67 \pm 1,12	1,84 \pm 1,27	1,30 \pm 0,76	0,68	0,60	0,18
	Nº de individuos pormedio en zona Comedero	0,11 \pm 0,1	1,45 \pm 0,69	0,51 \pm 0,45	0,82 \pm 0,27	0,32	0,007*	0,04*
	Nº de individuos pormedio en zona Vacía	2,31 \pm 1,58	0,64 \pm 0,86	1,60 \pm 0,76	1,23 \pm 0,59	0,77	0,14	0,32
	Nº de individuos pormedio en zona Enriquecida	1,33 \pm 0,81	0,26 \pm 0,45	1,04 \pm 0,91	1,65 \pm 0,83	0,17	0,30	0,08
60'	Distancia media entre individuos	19,70 \pm 3,77	19,47 \pm 7,25	21,56 \pm 2,95	25,86 \pm 5,95	0,13	0,47	0,41
	Distancia media al comedero	33,64 \pm 2,27	26,83 \pm 5,98	32,32 \pm 3,94	36,21 \pm 20,90	0,39	0,70	0,26
	Distancia media al bebedero	34,47 \pm 9,55	36,88 \pm 5,69	39,92 \pm 4,36	43,37 \pm 6,16	0,44	0,79	0,97
	Nº de individuos pormedio en zona Bebedero	0,71 \pm 0,65	1,25 \pm 0,72	0,79 \pm 0,20	1,21 \pm 0,85	0,91	0,14	0,83
	Nº de individuos pormedio en zona Comedero	1,41 \pm 1,20	2,78 \pm 0,58	2,07 \pm 0,51	2,22 \pm 1,04	0,83	0,32	0,41
	Nº de individuos pormedio en zona Vacía	1,24 \pm 0,59	0,51 \pm 0,47	1,08 \pm 0,32	0,57 \pm 0,17	0,96	0,02*	0,65
	Nº de individuos pormedio en zona Enriquecida	1,64 \pm 1,14	0,46 \pm 0,28	1,06 \pm 0,47	1,00 \pm 0,14	0,55	0,03*	0,05*
	Latencia de interacción con enriquecimientos	7,67 \pm 6,03	75,00 \pm 99,58	6,00 \pm 2,65	38,75 \pm 36,88	0,42	0,004*	0,70
	Latencia de interacción con comedero	1630 \pm 1069	688,25 \pm 494,31	618 \pm 534	784 \pm 1156	0,47	0,59	0,35
Latencia de interacción con bebedero	1355 \pm 1038	221,00 \pm 164,83	1021 \pm 710	230,25 \pm 134,20	0,77	0,002*	0,70	

Discusión

En el presente estudio se evaluaron los efectos tanto generacionales (en generación parental) como transgeneracionales (en F1) de una exposición crónica a un estresor por calor, la cual tuvo lugar durante una etapa temprana de un desafío inmune por inoculación de *Salmonella* inactivada en codornices Japonesas adultas; desarrollados ambos desafíos exclusivamente en la generación parental. Los efectos fueron evaluados en variables INE (tanto en generación parental como en F1) y comportamentales (exclusivamente en F1). Estudios similares han buscado caracterizar los efectos trans-generacionales que genera la exposición a distintos ambientes durante el desarrollo temprano de un individuo (Harris and Seckl, 2011; Marasco et al., 2012, 2016; Zimmer et al., 2013; Zimmer and Spencer, 2014); el caso reportado aquí, se buscó en particular agregar información sobre cómo interactúa un desafío inmune como componente del ambiente pre-natal.

En referencia a lo estudiado en la generación parental, ni el estrés térmico, ni el desafío inmune (de manera independiente cada uno o en combinación) influenciaron significativamente el título de anticuerpos inducidos contra GRO. Aunque hay bibliografía que respalda la teoría de que el estrés crónico es capaz de afectar negativamente la respuesta humoral en codornices Japonesas juveniles (Nazar et al., 2018a) este resultado no fue replicado en nuestro estudio. Las diferencias podrían deberse a la etapa ontogénica de las aves estudiadas por Nazar y cols 2018 (juveniles) o por otros factores como la capacidad de respuesta a antígenos particulados en específico. Más estudios serían necesarios para dilucidar si un protocolo de estrés térmico por calor que implique mayores temperaturas es capaz de modular la respuesta humoral, o bien, si el estado de desarrollo posee un papel predominante en la respuesta de esta variable.

En cuanto a los mecanismos relacionados con la respuesta proliferativa (porcentaje de inflamación), los mismos se hallaron alterados por efecto del estrés térmico. Aquellos individuos estresados mostraron menor capacidad de desarrollar un proceso inflamatorio en respuesta a la PHA-P, probablemente debido a que estos individuos presentaban mayores concentraciones de CORT circulante a causa de la exposición al estrés de tipo crónico empleado, como se informara previamente en el mismo modelo animal (Shini et al., 2010) e incluso con el mismo protocolo de estrés empleado en el presente trabajo (Nazar et al., 2018).

En el caso de la relación H/L, aquellos animales que estuvieron sometidos al protocolo de estrés mostraron los valores más elevados, independientemente de haber sido inoculados con *Salmonella* o no. Vale recordar que esta relación es un indicador hematológico de situaciones de estrés crónico (su elevación es indicativa del desarrollo de un proceso de estrés crónico) (Siegel,

1995; Mumma et al., 2006; Nazar and Marin, 2011). Estos resultados en su conjunto corroboran que los efectos de una exposición prolongada a elevadas temperaturas inducen un estado fisiológico de estrés crónico en los individuos (Renaudeau et al., 2012), ocasionando una disminución en la respuesta inflamatoria además de generar cambios en la composición de las poblaciones leucocitarias circulantes en sangre periférica, lo cual se correspondería con un aumento de los mediadores de la respuesta de estrés, especialmente CORT.

Por un lado, el no haber hallado diferencias en ninguna variable INE en relación a la inoculación de Salmonella podría estar indicando que ésta misma, analizándola como desafío inmune, fue resuelta por los individuos (en concreto lograron producir anticuerpos contra el inóculo-datos no publicados) sin afectar la interfaz INE en el sentido evaluado. De esta manera, las aves habrían sido capaces de responder al desafío, incluso en los animales donde además su energía estaría siendo destinada a lidiar con el estrés de tipo crónico al que fueron sometidos. Por otro lado, se podría haber esperado que el desafío inmune interactúe sinérgicamente con el efecto del estresor (Blom y Ottaviani, 2017). Sin embargo, los resultados obtenidos no respaldan (por lo previamente explicitado) dicha afirmación. Este resultado posee aspectos beneficiosos si se permite su extrapolación a situaciones de cría, ya que los desafíos inmunes son comunes tanto en rutinas sanitarias (Berg, 2000; van Boven et al., 2008) como en situaciones impredecibles de encuentros con patógenos (Appleby et al., 1992; Lay et al., 2011). En este sentido, estos desafíos podrían ser resueltos sin atenuar las variables INE, incluso si los animales estuviesen en una situación estresante como la empleada en este estudio.

El desafío inmune (por lo dicho en párrafos previos) no habría revestido una demanda capaz de comprometer la respuesta INE de la generación parental, y los resultados indicarían que el mismo tampoco fue capaz de generar un escenario INE diferente al ya preestablecido por el estrés térmico en la F1. En concreto, no se vio reflejado en las variables INE analizadas en la progenie el efecto del desafío inmune en sus parentales. En la F1 no se hallaron diferencias en la relación H/L por efecto de ninguno de los cuatro escenarios parentales dispuestos, de esta manera las crías no reflejan, al menos hematológicamente, indicadores de estrés de tipo crónico.

En cuanto a los efectos del protocolo de estrés térmico, solo aquellos pichones cuyos parentales estuvieron bajo el mismo mostraron un título de anticuerpos significativamente menor y un porcentaje de inflamación significativamente mayor. Haber encontrado una respuesta exacerbada de inflamación podría ser explicado por un aumento de la retroalimentación de CORT debido a un incremento en la expresión de receptores de glucocorticoides en las regiones hipotálamicas del encéfalo debido a una exposición a estrés prenatal, como se postula en

bibliografía reciente sobre el mismo modelo animal (Gudsnuk and Champagne, 2012; Zimmer and Spencer, 2014; Zimmer et al., 2017). En este contexto, a iguales concentraciones de CORT sistémicas (sugeridas por un igual valor de relación H/L), aquellos pichones cuyos parentales atravesaron condiciones de estrés térmico podrían tener una mayor retroalimentación negativa del eje HPA. El mediador final de este eje, la CORT, posee efectos anti-inflamatorios detalladamente estudiados tanto en aves como en mamíferos mediados por el factor de transcripción “factor nuclear Kappa B” (NF-KB) (Ottaviani et al., 2007; Davison, 2013; Scanes, 2014; Blom y Ottaviani, 2017). De esta manera, los pichones mencionados no serían capaces de regular los eventos inflamatorios y por ende exhibirían un porcentaje de inflamación exacerbado en comparación con los pichones cuyos parentales no fueron estresados.

Tomando en conjunto los resultados sobre el porcentaje de inflamación y el título de anticuerpos, estos sugieren en primer lugar, que hubo efectos trans-generacionales causados por un ambiente adverso vivido por la generación parental que afectó los parámetros INE de la F1. En segundo lugar, estos efectos en concreto sugieren que hubo una polarización de la respuesta inmune hacia una mayor actividad innata pro-inflamatoria acompañada de una menor actividad adquirida. Considerando las altas demandas energéticas que habría significado para los parentales el lidiar con el estrés crónico (De Kloet, 2003; Mumma et al., 2006), sus pichones pudieron haber sido “programados” para responder ante un patógeno de una manera energéticamente más favorable (Cutrera et al., 2010). Este resultado podría ser interpretado en el marco de la hipótesis de correspondencia ambiental (Champagne, 2008). La misma postula que existe un mejor afrontamiento del ambiente post-natal cuando este coincide con el pre-natal (Champagne, 2008; Pillai et al., 2018). De esta manera, en el caso particular de los pichones estudiados, se salvaguardarían recursos para poder sobrellevar las eventuales adversidades, siendo esta una respuesta potencialmente adaptativa.

Es de importancia considerar que la respuesta fisiológica al estrés térmico se da por una vía común a una gran variedad de estresores (Jones, 1996; Puvadolpirod and Thaxton, 2000; De Kloet, 2003), por lo que los resultados podrían ser extrapolados a otro tipo de situaciones en modelos animales similares. Vale aclarar que un desafío inmune, por sí solo, implicaría otro tipo de respuestas fisiológicas (Davison, 2014). Entonces, una gran diversidad de estresores (a pesar de configurar diferentes escenarios para los parentales) sería procesada e integrada por una vía común. Esta vía llevaría a cambios trans-generacionales, los cuales podrían ser beneficiosos para la progenie (en el marco de la hipótesis de correspondencia ambiental) (Zimmer et al., 2013; Pillai et

al., 2018) en el caso de que las características del ambiente donde se desarrollen las crías, se correspondan con las del ambiente parental.

Este trabajo indagó además, de manera exploratoria, los posibles efectos trans-generacionales que podrían tener distintos ambientes prenatales sobre variables comportamentales relacionadas a la utilización de recursos en un ambiente desconocido y a las interacciones sociales en pichones de codorniz japonesa. Para ello, se buscó un desafío que plantee una situación con objetos tanto conocidos (objetos de enriquecimiento), como recursos básicos pero presentados de manera desconocida (comida y agua en bebedero y comedero de estructura y materiales nuevos) para analizar a corto y mediano plazo la interacción con los mismos. Además, analizando las distancias medias entre individuos se buscó observar si existían cambios en la dinámica social del grupo. Los resultados obtenidos en relación a la sociabilidad mostraron que no hubo efectos trans-generacionales del estrés térmico ni de la inoculación sobre cómo los pichones socializan, medido como distancias interindividuales. Esto podría deberse a que, a pesar de la gran cantidad de cambios a nivel molecular que pueden generar ambientes prenatales adversos (Champagne, 2008; Gudsruk and Champagne, 2012), las vías involucradas en mantener una alta cohesión social en pichones se encuentran bien conservadas ya que su supervivencia depende en gran medida de ello (Jones, 1996; Marin et al., 2001). En nuestro estudio, en los primeros 5 min de prueba se observó que las variables distancia media al bebedero y número de individuos promedio en zona comedero fueron afectadas por las condiciones a las que fueron sometidos los parentales de un modo interactivo. Por un lado, los individuos estresados y no inoculados mostraron una menor distancia media al bebedero comparado con los otros grupos, y por otro, aquellos grupos no inoculados (estresados o no) presentan un mayor número de individuos promedio en zona comedero que aquellos que fueron estresados e inoculados, mientras que los grupos de individuos no estresados, pero si inoculados, no se diferenciaron de los anteriores en su respuesta. Esto sugiere que los escenarios pre-natales conformados son capaces de modular las respuestas de temor ante objetos nuevos o de aproximación a recursos altamente valorados (agua y alimento) para supervivencia, lo cual se sumaría en evidencia a trabajos que indican que el estrés en la generación parental afecta el miedo en su progenie (Spencer, 2017; Zimmer et al., 2017).

Cuando se estudiaron los efectos del estrés y de la inoculación sobre el desempeño de los pichones a lo largo de los 60 min de la prueba, se observaron efectos de la inoculación en el número de individuos promedio en zona vacía, en la latencia de interacción con los enriquecimientos y con el bebedero. Las crías cuyos parentales fueron inoculados, mostraron un

mayor promedio de individuos en zona vacía, menores tiempos de latencia de interacción con enriquecimientos y mayores tiempos de interacción con el bebedero que las crías de aves no inoculadas. Estos resultados son consistentes con que la exposición de los parentales a un desafío inmune como el empleado en este estudio puede también llevar a modular el desarrollo de sus pichones, reflejándose en este caso en cambios comportamentales cuando interactúan con su ambiente. En la literatura se han informado efectos de desafíos estresantes sobre parentales en la latencia de exploración de espacios desconocidos por parte de las crías (Zimmer et al., 2017). Este trabajo agregó además que otro tipo de desafío (inmune) daría lugar a individuos que sean capaces de interactuar de manera más rápida con recursos conocidos (enriquecimientos) pero siendo más precavidos en términos generales (mayor promedio de individuos en zona vacía) y con objetos novel.

Podrían, en base a los resultados descriptos, interpretarse ciertos indicios acerca de cómo la configuración de ambientes pre-natales con diferentes magnitudes y tipos de demandas pueden afectar la percepción y utilización de los recursos de la progenie. Se podría haber esperado que, aquellos animales que provienen de un ambiente pre-natal desafiante, enfrenten un desafío como un ambiente novel interactuando de una manera más rápida con recursos más allá de no reconocerlos como tales en un principio.

Cabe destacar que, para el caso de algunos comportamientos, se observó una falta de claridad o patrón en los efectos observados. Por ejemplo, en el número de individuos promedio en zona enriquecida, donde los grupos de individuos estresados e inoculados se diferenciaron de los estresados y no inoculados al presentar un mayor número de individuos promedio, mientras que los grupos no estresados (ya sean vacunados o no) no se diferenciaron. Si bien los cambios observados son en algunos casos difíciles de interpretar y se desconocen en la mayoría de los casos los mecanismos moleculares subyacentes, el hecho de haberse observado cambios en variables comportamentales basales como las estudiadas en este trabajo, permiten sugerir que es relevante continuar profundizando los estudios tendientes a dilucidar si los desafíos inmunes pueden efectivamente modular el comportamiento de la progenie. Estos estudios pueden tener implicancias estratégicas, ya que en la cría moderna todos los individuos reproductores son de un modo u otro sometidos a situaciones de desafíos inmunes durante su vida (van Boven et al., 2008; Kapczynski et al., 2013; Schijns et al., 2014). En próximas pruebas, se debería continuar evaluando si realmente esos cambios en el ambiente parental son capaces de “programar” a un individuo en relación a cómo éste utiliza los recursos disponibles en su entorno. Para ello, sería necesario (por un lado) aumentar el número de réplicas para aumentar la potencia estadística y por otro,

exponer a los parentales y/o pichones a diversos desafíos que requieran de una mayor demanda fisiológica que pudiera favorecer la detección de los cambios inducidos en la progenie. De este modo, se puede además evaluar si estos fenómenos pueden ser parte de respuestas aisladas observadas en los pichones, o parte de un patrón general fisiológico de modulación de respuestas.

Conclusión

Podemos concluir que la exposición prolongada a estrés térmico es capaz de alterar inmunoneuroendocrinamente no sólo a aquellos individuos que lo padecen de manera directa, sino también a su descendencia inmediata. Por otro lado, un desafío inmune de la magnitud del realizado no compromete la interfaz INE de codornices adultas ni tampoco es capaz de generar cambios de la misma en su descendencia. Interesantemente, en el caso de las variables comportamentales analizadas, ocurrió lo inverso. La inoculación de parentales afectó a sus crías (en ocasiones en conjunto con el estrés realizado) modulando la utilización de recursos en un ambiente novel, pero no así variables relacionadas a sociabilidad. Las alteraciones transgeneracionales de la interfaz INE se espera que modulen rasgos fenotípicos de manera tal que las crías, en un ambiente similar al vivido por sus parentales, puedan desempeñarse mejor ante esas demandas y presenten un mejor acoplamiento al mismo.

Bibliografía

- Aiken, C. E., and S. E. Ozanne. 2014. Transgenerational developmental programming. *Hum. Reprod. Update* 20:63–75.
- Appleby, M. C., B. O. Hughes, and H. A. Elson. 1992. Poultry production systems: behaviour, management and welfare.
- Berg, T. P. 2000. Acute infectious bursal disease in poultry: a review. *Avian Pathol.* 29:175–94.
- Bertin, A., and M.-A. Richard-Yris. 2004. Mothers' fear of human affects the emotional reactivity of young in domestic Japanese quail. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 89:215–231.
- Bertin, A., and M.-A. Richard-Yris. 2005. Mothering during early development influences subsequent emotional and social behaviour in Japanese quail. *J. Exp. Zool. Part A Comp. Exp. Biol.* 303A:792–801.
- Besedovsky, H., A. del Rey, E. Sorkin, and C. Dinarello. 1986. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science* (80-.). 233:652–654.
- Blom, J. M. C., and E. Ottaviani. 2017. Immune-Neuroendocrine Interactions: Evolution, Ecology, and Susceptibility to Illness. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* 23:362–367.
- van Boven, M., A. Bouma, T. H. F. Fabri, E. Katsma, L. Hartog, and G. Koch. 2008. Herd immunity to Newcastle disease virus in poultry by vaccination. *Avian Pathol.* 37:1–5.
- Burton, T., and N. B. Metcalfe. Can environmental conditions experienced in early life influence future generations?
- Calandreau, L., A. Bertin, A. Boissy, C. Arnould, P. Constantin, A. Desmedt, D. Guémené, R. Nowak, and C. Letierrier. 2011. Effect of one week of stress on emotional reactivity and learning and memory performances in Japanese quail. *Behav. Brain Res.* 217:104–10.
- Champagne, F. A. 2008. Epigenetic mechanisms and the transgenerational effects of maternal care. *Front. Neuroendocrinol.* 29:386–97.
- Cottrell, E. C., and J. R. Seckl. 2009. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of adult disease. *Front. Behav. Neurosci.* 3:19.
- Cutrera, A. P., R. R. Zenuto, F. Luna, and C. D. Antenucci. 2010. Mounting a specific immune response increases energy expenditure of the subterranean rodent *Ctenomys talarum* (tucuto): implications for intraspecific and interspecific variation in immunological traits. *J. Exp. Biol.* 213:715–24.
- Davison, F. 2013. The Importance of the Avian Immune System and its Unique Features. Pages 1–9 in *Avian Immunology: Second Edition*. Elsevier.
- Davison, F. 2014. *Avian Immunology*. Elsevier.
- Elenkov, I. J. 2008. Neurohormonal-cytokine interactions: implications for inflammation, common human diseases and well-being. *Neurochem. Int.* 52:40–51.
- Elenkov, I. J., R. L. Wilder, G. P. Chrousos, and E. S. Vizi. 2000. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol. Rev.* 52:595–638.
- Gil, D. 2008. Chapter 7 Hormones in Avian Eggs: Physiology, Ecology and Behavior. *Adv. Study Behav.* 38:337–398.
- Groothuis, T. G. G., W. Müller, N. von Engelhardt, C. Carere, and C. Eising. 2005. Maternal hormones as a tool to adjust offspring phenotype in avian species. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29:329–352.
- Gudsnuk, K., and F. A. Champagne. 2012. Epigenetic influence of stress and the social environment. *ILAR J.* 53:279–88.
- Harris, A., and J. Seckl. 2011. Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease. *Horm. Behav.* 59:279–289.
- Hayward, L. S., and J. C. Wingfield. 2004. Maternal corticosterone is transferred to avian yolk and may alter offspring growth and adult phenotype. *Gen. Comp. Endocrinol.* 135:365–371.
- Jones, R. B. 1989. Chronic stressors, tonic immobility and leucocytic responses in the domestic fowl. *Physiol. Behav.* 46:439–442.
- Jones, R. B. 1996. Fear and adaptability in poultry: Insights, implications and imperatives. *Worlds. Poult. Sci. J.* 52:131–174.
- Kapczynski, D. R., C. L. Afonso, and P. J. Miller. 2013. Immune responses of poultry to Newcastle disease virus. *Dev. Comp. Immunol.* 41:447–453.
- Kembro, J. M., D. G. Satterlee, J. B. Schmidt, M. A. Perillo, and R. H. Marin. 2008. Open-field temporal pattern of ambulation in Japanese quail genetically selected for contrasting adrenocortical responsiveness to brief manual restraint. *Poult. Sci.* 87:2186–95.
- Klasing, K. C. 1998. Nutritional modulation of

- resistance to infectious diseases. *Poult. Sci.* 77:1119–25.
- De Kloet, E. R. 2003. Hormones, brain and stress. *Endocr. Regul.* 37:51–68.
- Kogut, M. H., and K. Klasing. 2009. An immunologist's perspective on nutrition, immunity, and infectious diseases: Introduction and overview. *J. Appl. Poult. Res.* 18:103–110.
- Koolhaas, J. M. 2008. Coping style and immunity in animals: making sense of individual variation. *Brain. Behav. Immun.* 22:662–7.
- Kudielka, B. M., and C. Kirschbaum. 2005. Sex differences in HPA axis responses to stress: a review. *Biol. Psychol.* 69:113–32.
- Kuenzel, W. J., and A. Jurkevich. 2010. Molecular neuroendocrine events during stress in poultry. *Poult. Sci.* 89:832–840.
- Lay, D. C., R. M. Fulton, P. Y. Hester, D. M. Karcher, J. B. Kjaer, J. A. Mench, B. A. Mullens, R. C. Newberry, C. J. Nicol, N. P. O'Sullivan, and R. E. Porter. 2011. Hen welfare in different housing systems. *Poult. Sci.* 90:278–94.
- Love, O. P., P. O. McGowan, and M. J. Sheriff. 2013. Maternal adversity and ecological stressors in natural populations: the role of stress axis programming in individuals, with implications for populations and communities (R Boonstra, Ed.). *Funct. Ecol.* 27:81–92.
- Lupien, S. J., B. S. McEwen, M. R. Gunnar, and C. Heim. 2009. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat. Rev. Neurosci.* 10:434–445.
- Marasco, V., P. Herzyk, J. Robinson, and K. A. Spencer. 2016. Pre- and Post-Natal Stress Programming: Developmental Exposure to Glucocorticoids Causes Long-Term Brain-Region Specific Changes to Transcriptome in the Precocial Japanese Quail. *J. Neuroendocrinol.* 28.
- Marasco, V., J. Robinson, P. Herzyk, and K. Spencer. 2012. Pre- and post-natal stress in context: effects on the stress physiology in a precocial bird. *J. Exp. Biol.* 215:3955–3964.
- Marin, R. H., P. Freytes, D. Guzman, and R. B. Jones. 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.
- Marin, R. H., and D. G. Satterlee. 2004. Cloacal Gland and Testes Development in Male Japanese Quail Selected for Divergent Adrenocortical Responsiveness 1. *Poult. Sci.* 83:1028–1034.
- Martin-Gronert, M. S., and S. E. Ozanne. 2012. Mechanisms underlying the developmental origins of disease. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 13:85–92.
- McCormick, C. M., T. E. Hodges, and J. J. Simone. 2015. Peer pressures: Social instability stress in adolescence and social deficits in adulthood in a rodent model. *Dev. Cogn. Neurosci.* 11:2–11.
- Miller, K. A., and J. A. Mench. 2006. Differential effects of 4 types of environmental enrichment on aggressive pecking, feather pecking, feather loss, food wastage and productivity in Japanese quail. *Br. Poult. Sci.* 47:646–58.
- Monaghan, P. 2008. Early growth conditions, phenotypic development and environmental change. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*
- Mumma, J. O., J. P. Thaxton, Y. Vizzier-Thaxton, and W. L. Dodson. 2006. Physiological stress in laying hens. *Poult. Sci.* 85:761–9.
- Nazar, F. N., B. E. Barrios, P. Kaiser, R. H. Marin, and S. G. Correa. 2015a. Immune Neuroendocrine Phenotypes in *Coturnix coturnix*: Do Avian Species Show LEWIS/FISCHER-Like Profiles? (D-H Wang, Ed.). *PLoS One* 10:e0120712.
- Nazar, F. N., and R. H. Marin. 2011. Chronic stress and environmental enrichment as opposite factors affecting the immune response in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Stress* 14:166–73.
- Nazar, F. N., R. H. Marin, G. Liste, I. Campderrich, and I. Estevez. 2015b. Manipulation of the phenotypic appearance of individuals in groups of laying hens: effects on stress and immune-related variables. *Stress* 18:710–7.
- Nazar, F. N., E. A. Videla, M. E. Fernandez, M. C. Labaque, and R. H. Marin. 2018a. Insights into thermal stress in Japanese quail (*Coturnix coturnix*): dynamics of immunoendocrine and biochemical responses during and after chronic exposure. *Stress*.
- Nazar, F. N., E. A. Videla, M. E. Fernandez, M. C. Labaque, and R. H. Marin. 2018b. Insights into thermal stress in Japanese quail (*Coturnix coturnix*): dynamics of immunoendocrine and biochemical responses during and after chronic exposure. *Stress*:1–10.
- Ottaviani, E., D. Malagoli, and C. Franceschi. 2007. Common evolutionary origin of the immune and neuroendocrine systems: from morphological and functional evidence to in

- silico approaches. *Trends Immunol.* 28:497–502.
- Pillai, A. G., M. Arp, E. Velzing, S. L. Lesuis, M. V. Schmidt, F. Holsboer, M. Joëls, and H. J. Krugers. 2018. Early life stress determines the effects of glucocorticoids and stress on hippocampal function: Electrophysiological and behavioral evidence respectively. *Neuropharmacology* 133:307–318.
- Puvadolpirod, S., and J. P. Thaxton. 2000. Model of physiological stress in chickens 1. Response parameters. *Poult. Sci.* 79:363–9.
- Renaudeau, D., A. Collin, S. Yahav, V. de Babilio, J. L. Gourdine, and R. J. Collier. 2012. Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production. *Animal* 6:707–728.
- Di Rienzo, J. A., F. Casanoves, M. G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada, and C. W. Robledo. 2016. *Infostat* (G InfoStat, Ed.).
- Saino, N., M. Romano, R. P. Ferrari, R. Martinelli, and A. P. Møller. 2005. Stressed mothers lay eggs with high corticosterone levels which produce low-quality offspring. *J. Exp. Zool. Part A Comp. Exp. Biol.* 303:998–1006.
- Sandi, C., and J. Haller. 2015. Stress and the social brain: behavioural effects and neurobiological mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci.* 16:290–304.
- Scanes, C. G. 2014. *Sturkie's avian physiology*. Elsevier.
- Scanes, C. G. 2016. Biology of stress in poultry with emphasis on glucocorticoids and the heterophil to lymphocyte ratio. *Poult. Sci.* 0.
- Schijns, V. E. J. C., S. van de Zande, B. Lupiani, and S. M. Reddy. 2014. *Avian Immunology*. Elsevier.
- Sever, J. 1962. Application of a microtechnique to viral serological investigations. *J. Immunol.*
- Sheriff, M. J., and O. P. Love. 2013. Determining the adaptive potential of maternal stress (J Clobert, Ed.). *Ecol. Lett.* 16:271–280.
- Shini, S., G. R. Huff, A. Shini, and P. Kaiser. 2010. Understanding stress-induced immunosuppression: exploration of cytokine and chemokine gene profiles in chicken peripheral leukocytes. *Poult. Sci.* 89:841–51.
- Siegel, H. S. 1995. Gordon Memorial Lecture. Stress, strains and resistance. *Br. Poult. Sci.* 36:3–22.
- Sloboda, D. M., M. Hickey, and R. Hart. 2011. Reproduction in females: the role of the early life environment. *Hum. Reprod. Update* 17:210–227.
- Sossidou, E. N., and H. A. Elson. 2009. Hens' welfare to egg quality: a European perspective. *Worlds. Poult. Sci. J.* 65:709–718.
- Spencer, K. A. 2017. Developmental stress and social phenotypes: integrating neuroendocrine, behavioural and evolutionary perspectives. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 372:20160242.
- Turnbull, A. V, and C. L. Rivier. 1999. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol. Rev.* 79:1–72.
- Veenema, A. H. 2009. Early life stress, the development of aggression and neuroendocrine and neurobiological correlates: What can we learn from animal models? *Front. Neuroendocrinol.* 30:497–518.
- Videla, E. A., O. Giayetto, F. N. Nazar, and R. H. Marín. 2016. Modulación de la respuesta inmune celular por un estrés crónico por calor en *Coturnix coturnix*. in 39^o Congreso Argentino de Producción Animal. Asociación Argentina de Producción Animal, Córdoba.
- Vinkler, M., and H. Bainova. 2010. Functional analysis of the skin-swelling response to phytohaemagglutinin. :1081–1086.
- Webster Marketon, J. I., and R. Glaser. 2008. Stress hormones and immune function. *Cell. Immunol.* 252:16–26.
- van Westerloo, D. J., I. A. J. Giebelen, S. Florquin, J. Daalhuisen, M. J. Bruno, A. F. de Vos, K. J. Tracey, and T. van der Poll. 2005. The cholinergic anti-inflammatory pathway regulates the host response during septic peritonitis. *J. Infect. Dis.* 191:2138–48.
- Zimmer, C., N. J. Boogert, and K. A. Spencer. 2013. Developmental programming: Cumulative effects of increased pre-hatching corticosterone levels and post-hatching unpredictable food availability on physiology and behaviour in adulthood. *Horm. Behav.* 64:494–500.
- Zimmer, C., M. Larriva, N. J. Boogert, and K. A. Spencer. 2017. Transgenerational transmission of a stress-coping phenotype programmed by early-life stress in the Japanese quail. *Sci. Rep.* 7:46125.
- Zimmer, C., and K. A. Spencer. 2014. Modifications of Glucocorticoid Receptors mRNA Expression in the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Response to Early-life Stress in Female Japanese Quail. *J. Neuroendocrinol.* 26:853–860.

Agradecimientos

Al Tribunal Examinador, por sus aportes y oportunas sugerencias. A las autoridades del ICTA por permitir el desarrollo de mi tesina en las instalaciones. A mis mentores, Raúl y Nicolás, por su confianza y guía. A los integrantes de ciencia avícola, por sus consejos y ayuda. A mi familia y amigos por su constante apoyo incondicional.