RAPA Revista Argentina de Producción Animal

INMUNIDAD CELULAR Y ESTRÉS CRÓNICO POR CALOR EN CODORNICES JAPONESAS (*COTURNIX COTURNIX)*

Cellular immunity and chronic heat stress in Japanese quail (*Coturnix coturnix)*

Videla[1], E.A., Nazar[2], F.N. y Marín[2], R.H.
Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIByT, CONICET-UNC).
Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI, CONICET-UNC).

RESUMEN

La aplicación de estresores repetida o continuada en el tiempo deriva en un estado fisiológico de estrés crónico, alterando diferentes sistemas, entre ellos el inmune. Las aves son animales endotérmicos y requieren temperaturas confortables para su desarrollo (22-24ºC), por esto, el estrés por calor resulta una de las principales preocupaciones en países como Argentina. Nuestro objetivo fue analizar temporalmente el efecto del estrés crónico por calor sobre la respuesta inmune celular en hembras juveniles de codornices japonesas, determinando si en corto plazo se recupera la capacidad de respuesta. Se emplearon 180 hembras, distribuidas en 6 cajas de cría. En tres cajas se aumentó la temperatura de 24ºC a 34ºC (durante el periodo de luz) por 9 días consecutivos (factor Estrés). Los 6 días post-estrés fueron considerados período de recuperación. Se establecieron 6 muestreos independientes cada 3 días (factor Tiempo): basal (día 0), estrés térmico (días 3, 6 y 9) y recuperación (días 12 y 15). Se analizaron las variables linfoproliferación ante mitógeno y relación Heterófilos/Linfocitos (H/L) como representativas de respuesta inmune celular. Los resultados se analizaron mediante Modelos Lineales Generales y Mixtos para evaluar los efectos del factor Estrés, Tiempo y su interacción. Todas las variables se vieron afectadas diferencialmente ($p<0,001$) a lo largo del protocolo de estrés, llevando a una supresión inmune significativa a los nueve días. Sólo 6 días post-estrés, la linfoproliferación recuperó valores basales y la relación H/L mostró una recuperación parcial. Los resultados muestran una modulación diferencial de las variables estudiadas. Se observa que tan sólo 3 días de exposición diurna a altas temperaturas son suficientes para alterar las respuestas inmunes, alcanzándose un máximo de inhibición de respuesta a los 9 días. Los resultados sugieren que tan sólo 6 días de recuperación post-estrés son suficientes para iniciar la reversión del cuadro de inhibición previamente observado.

Palabras clave. codorniz japonesa, estrés térmico, inmunidad, dinámica.

SUMMARY

The continuous or repetitive application of stressors along time leads to chronic stress, which physiologically affects different systems, including the immune system. Avian are endothermic animals and they require comfortable temperatures for their development (22ºC- 24ºC). For this reason, heat stress is one of the main concerns in tropical countries like Argentina. The objective of the present study was to analyze the effect of chronic heat stress on cellular immune system´s response in young Japanese quail (*Coturnix coturnix*) females, analyzing if the response capacity is recovered in a short period of time. 180 quail were housed in 6 rearing boxes. In 3 of these boxes temperature was abruptly increased from 24ºC to 34ºC during light period throughout 9 days (Stress factor). Once high temperatures period was ended, posterior 6 days were used as post-stress recovery period. Six independent sampling points were stablished every three days (Time Factor): basal (day 0), heat stress (days 3, 6 and 9) and recovery (days 12 and 15). Percentage of inflammation and Heterophil/Lymphocyte ratio were measured as representative variables of cellular immune response. Results were analyzed by General Lineal Mix Models that evaluated the effects of Stress, Time and their interaction. Chronic heat stress affected both parameters differentially ($p<0,001$), leading to a significant suppression of both on day 9. Percentage of inflammation was the only variable which recovered basal values after the six-days recovery period. Results showed a differential modulation of the studied variables. Only 3 days of exposure to high diurnal temperatures were enough to alter the immune responses leading to a maximum inhibition after 9 days of exposure. Results suggest that only 6 days of post-stress recovery are enough to initiate a reversion of the previously observed inhibition.

Key words. japanese quail, heat stress, immunity, dynamic.

Recibido: agosto de 2018
Aceptado: noviembre de 2018

[1]Biólogo.
[2]Dres en Ciencias Biológicas.

Introducción

El estrés se define como la respuesta fisiológica que se desencadena ante factores que alteran la homeostasis, afectando de manera a veces adversa el organismo (Dohms y Metz, 1991; Dhabhar, 2009). Estos factores han sido denominados estresores (Fair et al., 1999; Dhabhar, 2009, Shini et al., 2009; Nazar y Marin, 2011; Scanes, 2014). El eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA), estimulado por la percepción de los estresores (hipotálamo), responde liberando mediadores de la respuesta de estrés (Dohms y Metz, 1991) como la hormona adrenocorticotrófica (ACTH, en hipófisis) y la corticosterona (CORT) liberada de la glándula suprarrenal (Bhatnagar y Dallman, 1998; Puvadolpirod y Thaxton, 2000; Sapolsky et al., 2000; Kuenzel y Jurkevich, 2010; Scanes, 2014). La aplicación de estresores de manera repetida o continua en el tiempo deriva en un estado de estrés crónico, generando alteraciones informadas como negativas en la fisiología (Laurence et al., 2012; Scanes, 2014).

La cría en ambientes con temperaturas elevadas incurre en un estrés térmico en aquellos animales que, como las aves, requieren temperaturas confortables para su desarrollo (22 a 24 ºC) (Gasparino, et al. 2013a; Scanes, 2014). Por esta razón, el estrés térmico es una de las principales preocupaciones en países como el nuestro, con períodos con elevadas temperaturas. La ausencia de glándulas sudoríparas y la presencia de capas de plumaje, hace a las aves muy susceptibles a los efectos deletéreos de este estrés (Dai et al., 2011). Se ha informado en aves de corral que el estrés por calor posee efectos negativos en diversos sistemas. En particular a nivel del sistema inmune (SI), daña la mucosa intestinal, generando mayor exposición a antígenos y bacterias, un desequilibrio de moléculas anti-/pro-inflamatorias en la región local y global en el organismo (Song et al., 2013); se alcanza un estado de inmunosupresión, con disminución de parámetros de una respuesta inmune óptima: la capacidad de responder a antígenos, la intensidad de la fagocitosis (Sandhu et al., 2012) y la producción de anticuerpos (Pamok et al., 2009; Sahin et al., 2011; Sandhu et al., 2012; Gasparino et al., 2013a).

El presente estudio tuvo como objetivo analizar temporalmente el efecto de un estrés crónico por calor sobre la respuesta celular del SI en hembras juveniles de codornices japonesas (*Coturnix coturnix*) y determinar si se recupera la capacidad de respuesta en el corto plazo. Se analizaron dos variables relacionadas al sistema inmune celular: i) respuesta de hipersensibilidad demorada y ii) la relación Heterófilos/Linfocitos. La respuesta de hipersensibilidad demorada permite evaluar la respuesta inflamatoria frente a un mitógeno, mediante mecanismos de reclutamiento y migración de células de la inmunidad innata como adquirida, esta prueba da información sobre el potencial pro-inflamatorio de los individuos (Vinkler et al., 2010). Por otra parte, la relación Heterófilos/Linfocitos es empleada como un indicador hematológico de los niveles de mediadores de la respuesta de estrés. A mayores valores de este indicador, mayores niveles de mediadores circulantes sugiriendo un estrés de tipo crónico (Gross and Siegel, 2015; Nazar and Marin, 2011).

Materiales y Métodos

Cría de pichones. Individuos de la especie *Coturnix coturnix* fueron criados de acuerdo a procedimientos de rutina (Lábaque et al., 2008, Nazar y Marin, 2011). Se alojaron inicialmente en tres cajas de cría de 90 x 90 x 90 cm (largo x ancho x alto) y luego divididos en un total de seis, siguiendo estándares de densidad de animales, con acceso a alimento balanceado y agua *ad libitum.* El ciclo de luz-oscuridad empleado fue de 14 horas de luz y 10 de oscuridad. La temperatura de cría se disminuyó gradual y semanalmente desde la eclosión hasta los 28 días de edad, partiendo de una temperatura inicial de 37ºC hasta llegar a los 24ºC. A los 28 días de edad, se procedió a la determinación del sexo de los individuos distinguiendo hembras de machos por la coloración de las plumas localizadas en el pecho. Las hembras fueron individualizadas mediante bandas alares numeradas de diferentes colores. Un total de 180 hembras fueron distribuidas al azar en una de 6 cajas (30 hembras por caja), previamente asignadas a los tratamientos control o estrés (3 cajas por tratamiento).

Caracterización del estresor. El estresor empleado fue de tipo térmico aumentando la temperatura de las cajas de cría desde los 24ºC a los 34ºC, siendo el incremento de manera abrupta, durante el período de luz de los individuos. Dicho estresor se aplicó cuando las aves alcanzaron los 35 días de edad y durante nueve días consecutivos en cajas asignadas al tratamiento estrés. Los individuos alojados en las cajas control permanecieron sin disturbios hasta el final del estudio. Se emplearon 3 réplicas por tratamiento.

Análisis de la dinámica de modulación de respuesta inmune. Para analizar la dinámica de los efectos del estresor crónico sobre la respuesta inmune celular de las aves, en cada una de las 6 cajas se realizaron muestreos independientes en 4 individuos cada 3 días. Se comenzó con el primer muestreo antes del primer día de estrés térmico, continuando a lo largo de los 15 días siguientes (durante y post estrés). La selección de los individuos en cada fecha de muestro y dentro de cada caja fue realizada al azar. De este modo, se completaron 6 muestreos por tratamiento: *día 0 (previo estrés - basal), días 3, 6 y 9 (durante estrés), días 12 y 15 (recuperación),* así se incorpora un nuevo factor al estudio que se denominó Tiempo y que posee 6 niveles (días 0, 3, 6, 9, 12 y 15 de muestreo).

Estudios inmunológicos.

Análisis de hipersensibilidad demorada. Veinticuatro horas antes de cada muestreo se realizó una medición, con calibre digital, de una zona periférica a la vena braquial del ala izquierda de cada ave y se inyectó una solución de fitohemaglutinina (PHA-P) para inducir una respuesta inmune celular. La zona inyectada fue medida a las 24 horas

para determinar el porcentaje de inflamación producido por los mecanismos vasodilatadores y reclutadores de células implicadas en la respuesta al mitógeno inyectado (Sever, 1962; Martin et al., 2005; Nazar et al., 2015a).

Recuento de células blancas. Por punción de la vena braquial del ala derecha, cada día de muestreo se extrajo sangre para la realización de extendidos que fueron fijados y teñidos con May-Grunwald Giemsa. En microscopio óptico de campo claro se procedió al recuento de leucocitos identificando linfocitos, eosinófilos, basófilos, heterófilos y monocitos (totalizando 100 células por individuo) y se calculó la relación Heterófilos/Linfocitos (H/L) (Ruiz et al., 2002; Shini et al., 2010; Nazar y Marin, 2011).

Análisis Estadístico. Los valores obtenidos en cada una de las réplicas por tratamiento y por fecha de muestreo fueron promediados ya que son muestras estadísticamente dependientes. Cada uno de los promedios fue considerado como unidad experimental a los efectos del análisis estadístico. Los datos de cada variable fueron evaluados mediante un modelo lineal general y mixto que determinó la probabilidad de ocurrencia de los efectos del tratamiento de estrés (con estrés y sin estrés), el tiempo (días 0, 3, 6, 9, 12 y 15 de muestreo) y su interacción. La caja donde los animales fueron alojados fue incluida en el modelo como variable aleatoria. Para cada uno de los puntos de muestreo se estudiaron grupos de hembras independientes. La prueba de Fisher LSD fue empleada para la comparación de medias individuales a posteriori. Un valor de $p<0,05$ fue considerado como representante de diferencias significativas. Para el análisis se empleó el software estadístico Infostat (Di Rienzo et al., 2013).

Resultados y Discusiones

El presente estudio evalúa la dinámica de modulación de la respuesta del sistema inmune celular en codornices japonesas frente a un estrés térmico, aplicado de manera crónica a lo largo de 9 días, con un período posterior de recuperación de 6 días. Los estudios de efectos de estrés térmico en aves hasta el presente no han explorado la modulación temporal de la respuesta inmune, sino que se han enfocado principalmente en alteraciones hormonales y puntualmente luego de finalizado el protocolo de estrés. Por ejemplo, se ha informado que el estrés por calor induce incrementos en la síntesis de corticosterona e impacta negativamente la concentración de hormonas tiroideas T3 y T4 (Dai et al., 2011; Gasparino et al., 2013b). A nivel metabólico/nutricional se han informado alteraciones en la concentración de aminoácidos circulantes, ganancia de peso y en conversión de alimento (Sahin et al., 2006; Sahin et al., 2011; Sahin et al., 2012). En este trabajo, por otro lado, se realiza la evaluación por primera vez de la dinámica de recuperación a corto plazo de parámetros inmunológicos luego del estrés térmico.

Vale aclarar en primera instancia que los valores basales de respuestas de todas las variables informadas son coherentes con valores informados en bibliografía (Fair et al., 1999; Roberts et al., 2009; Nazar y Marin, 2011; Nazar et al., 2015a). El análisis estadístico para la variable porcentaje de inflamación inducida por PHA-P mostró un efecto significativo del estrés ($p<0,0001$), del tiempo ($p<0,0001$) y de su interacción ($p<0,0001$). Teniendo en cuenta la modulación temporal de la respuesta inmune celular por estrés térmico, la comparación entre los diferentes grupos muestra que la caída en la respuesta inflamatoria ya se detecta con 3 días de exposición al estresor (Figura 1). Esta caída se profundiza incluso hasta el final del protocolo de estrés (día 9 de exposición a temperatura elevada). Así, el aumento de la temperatura aplicada durante el protocolo de estrés reduciría en forma dependiente del tiempo la respuesta inflamatoria de las aves estresadas. A los 3 días de recuperación los individuos muestran un marcado incremento en la capacidad de responder al mitógeno y, con sólo 6 días, alcanzan valores equivalentes a los basales. Como fuera mencionado, esta variable permite evaluar el estado inflamatorio del organismo, mediante la capacidad de migración y reclutamiento de células involucradas tanto en la inmunidad innata como en la adquirida a la zona involucrada (Vinkler et al., 2010). El mecanismo subyacente propuesto sería que las hembras sometidas a estrés térmico, sufrieron una disminución en la mencionada capacidad de migración y reclutamiento de células a la zona, y la dinámica observada podría estar relacionada a las concentraciones de mediadores de la respuesta de estrés circulantes en sangre tales como corticosterona o catecolaminas (Bhatnagar y Dallman, 1998; Sapolsky et al., 2000). Se ha informado que los mencionados mediadores son influenciados por numerosos estresores (Dohms y Metz, 1991; Shini et al., 2009; Scanes, 2014) incluyendo el estrés térmico, el cual indujo incrementos en su concentración en animales expuestos a altas temperaturas (Dai et al., 2011). De esta manera sería esperable que las aves sometidas al estrés crónico por calor generen un aumento gradual de la concentración de mediadores en el torrente sanguíneo a lo largo de la aplicación del protocolo. Cuando el estresor es de tipo crónico, se ha observado que induce un estado de inmunosupresión con efectos anti-inflamatorios (Dhabhar y McEwen, 1997; Davison, 2014). La bibliografía indica que finalizado un protocolo de estrés crónico, los niveles de citoquinas pro-inflamatorias se encuentran deprimidos (Shini et al., 2010a; Davison, 2014). Una vez cesado el estresor, los niveles de mediadores retomarían sus valores normales y se recuperaría entonces la capacidad de respuesta de este componente en cuestión. Sin embargo, más experimentación es necesaria para confirmar esa hipótesis ya que en nuestro caso, aún no hemos estudiado en codornices los niveles de dichos mediadores a lo largo del protocolo experimental aplicado en este caso particular.

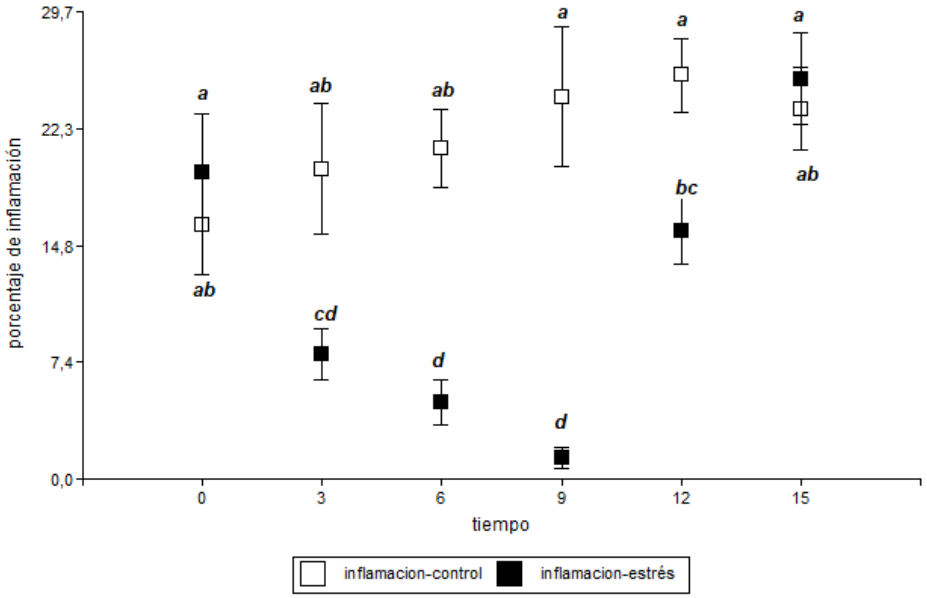

Figura 1. Efecto del estrés térmico durante 9 días sobre el porcentaje de inflamación inducida por PHA-P en codornices japonesas hembras y posterior recuperación. Los puntos representan la media y las líneas el error estándar. En el eje del Tiempo se indica el día de muestreo. Día 0 corresponde al muestreo previo al inicio del estrés térmico (34°C). Los días 3, 6 y 9 corresponden al número de días que las aves fueron expuestas al estresor. Los días 12 y 15 corresponden a los 2 muestreos realizados luego de finalizado el estrés térmico. [a-d]Las letras diferentes indican diferencias entre los grupos (Prueba Fischer LSD).

Figure 1. *Heat stress effect on percentaje of inflamation, throughout nine days in female quails and posterior recovery. Points represents media and lines represents standard error. The sampling day is indicated in the Time axis. Day 0 sample is the basal previuos heat stress (34ºC). Days 3, 6 and 9 correspond to days where quails were exposed to the stressor. Days 12 and 15 correspond to the two samples made after heat stress (recovery).* [a-d] *Differents letters represents differencies between groups (LSD Fischer Test).*

Esta información permitiría conocer la dinámica hormonal del eje HPA que subyace a los cambios informados. De esta manera se podrían hacer estudios de interacciones más complejas entre las variables.

El análisis estadístico para la variable relación Heterófilos/Linfocitos mostró un efecto significativo del estrés ($p<0,0001$), del tiempo ($p=0,009$), y de su interacción ($p=0,0004$). Esta variable también se vio afectada por el estresor, siguiendo una dinámica particular, sin una disminución como en la variable previamente descripta. En este caso, esta variable ha sido empleada como un indicador de estrés crónico donde mayores valores de la relación H/L reflejan mayores niveles de mediadores de la respuesta de estrés que están circulando en sangre (Gross and Siegel, 2015; Nazar and Marin, 2011). Estos resultados son consistentes con estudios que muestran que el incremento en la relación H/L está relacionado al grado en que se ven afectados fisiológicamente los individuos por la respuesta de estrés de tipo crónico (Siegel, 1995; Huff et al., 2005; Mumma et al., 2006; Nazar y Marin, 2011; Davison, 2014; Nazar et al., 2015b). Las hembras que sólo fueron expuestas tres días a una temperatura por encima de la de confort, mostraron un aumento en la relación H/L diferenciándose significativamente del grupo control correspondiente (Figura 2). A medida que continuaron los días de exposición al estresor, la variable H/L continuó incrementándose hasta alcanzar el pico máximo registrado a los nueve días. El seguimiento temporal de la variable nos indica que cesado el estresor se observa una disminución de los valores (período de recuperación) sin embargo no se recuperan los valores basales de los grupos controles, al menos en el tiempo evaluado. En la bibliografía se ha descripto que la presencia de mediadores de la respuesta de estrés (Corticosterona particularmente) genera linfopenia (disminución de los linfocitos presentes en sangre) y el aumento de la cantidad de heterófilos. Éste fenómeno es debido a una modificación en la distribución de las células leucocíticas entre diferentes compartimientos inmunológicos como la sangre y otros tejidos linfoides o no linfoides (Dohms y Metz, 1991; Pruett, 2001; Davison 2014). En el contexto experimental informado, la acumulación de días bajo influencia de altas temperaturas, iría generando una afección progresiva alterando la respuesta desde el primer muestreo bajo estrés (a los 3 días de iniciado el protocolo) y hasta alcanzar el valor máximo registrado luego de nueve días de exposición, momento en que la concentración plasmática de mediadores se especula sería máxima. Luego de finalizado el estresor, la afección fisiológica comenzaría a disminuir y por ende su efecto sobre los linfocitos y heterófilos. Vale destacar que este fenómeno mostraría una evolución que implica al menos más de 6 días y por ello no se observa una recuperación de valores basales comparables a los controles.

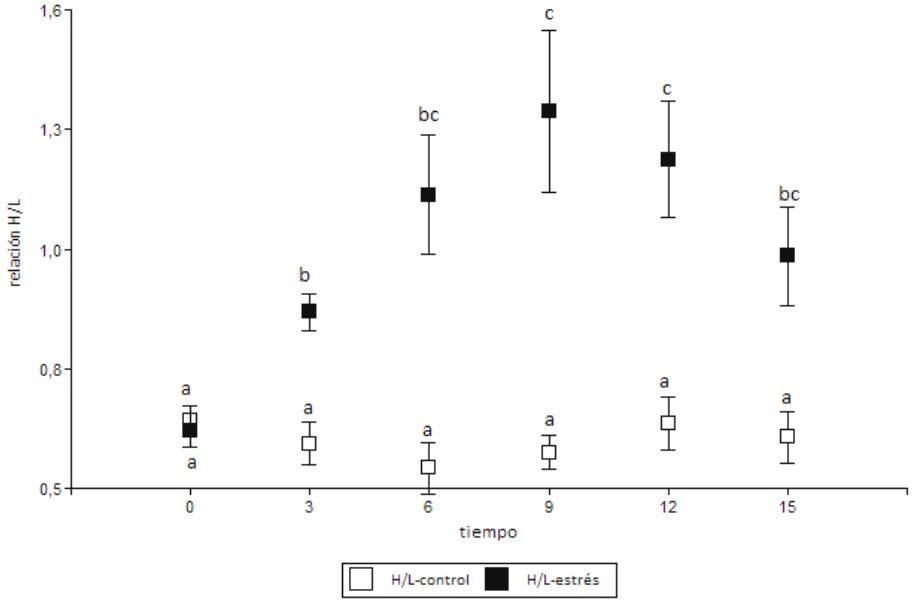

Figura 2. Efecto del estrés térmico durante 9 días sobre la relación Heterófilos/Linfocitos en codornices japonesas hembras y posterior recuperación. Los puntos representan la media y las líneas el error estándar. En el eje Tiempo se indica el día de muestreo. Día 0 corresponde al muestreo previo al inicio del estrés térmico (34°C). Los días 3, 6 y 9 corresponden al número de días que las aves fueron expuestas al estresor. Los días 12 y 15 corresponden a los 2 muestreos realizados luego de finalizado el estrés térmico. [a-c]Las letras diferentes indican diferencias entre los grupos (Prueba Fischer LSD).

Figure 2. Heat stress effect on Heterophil/Lymphocyte ratio, throughout nine days in female quails and posterior recovery. Points represents media and lines represents standard error. The sampling day is indicated in the Time axis. Day 0 sample is the basal previuos heat stress (34ºC). Days 3, 6 and 9 correspond to days where quails were exposed to the stressor. Days 12 and 15 correspond to the two samples made after heat stress (recovery). [a-d] Differents letters represents differencies between groups (LSD Fischer Test).

Se observa que el parámetro que más rápidamente se alteró fue la inflamación inducida por PHA-P, con disminución abrupta a los tres días de aplicado el estresor. Al cabo de seis días de recuperación se retorna a valores basales, mientras que la relación H/L no sigue la misma dinámica. De esto se desprende que las consecuencias del estrés empleado serían diferenciales sobre cada variable del sistema inmune celular, y la dinámica de una podría estar influenciando la otra (Murphy, 2009; Shini et al., 2009; Shini et al., 2010a; Davison, 2014; Nazar et al., 2015). Según Shini y Kaiser (2009), los glucocorticoides administrados vía agua de beber en gallinas promueven la expresión de sustancias anti-inflamatorias y suprimen la expresión de sustancias pro-inflamatorias. En una visión integrada, en las aves que han sido expuestas al estresor térmico, la afección fisiológica habría ido aumentando a lo largo del período de exposición a altas temperaturas teniendo como consecuencia el incremento gradual de sustancias anti-inflamatorias impactando negativamente sobre la respuesta de inflamación a la PHA-P y generando el reclutamiento de los linfocitos, mientras que promueve el aumento de heterófilos en sangre a lo largo de los puntos de muestreo medidos durante la exposición a altas temperaturas (Shini et al., 2008; Davison, 2014). En el período post estrés, la no exposición al estresor implicaría una reducción progresiva de componentes anti-inflamatorios liberados durante el protocolo de estrés (Dhabhar y McEwen, 1997; Carsia y Harvey 2000; Shini y Kaiser, 2009; Shini et al., 2010b). De esta manera, a medida que se suceden los días se lograría restablecer el balance de componentes pro y anti-inflamatorios, favoreciendo de esta forma la recuperación total o parcial de la respuesta.

Existe una vía común para la respuesta de estrés ante una amplia variedad de estresores. Dicha vía involucra al eje HPA, que implica la percepción en el cerebro, la liberación de la hormona liberadora de corticotropina y la vasopresina, que estimulan la hipófisis anterior para secretar ACTH, cuya circulación en sangre promueve la liberación de glucocorticoides (Dohms y Metz, 1991; Scanes, 2014). En la industria avícola, existen muchas situaciones que pueden resultar estresantes para las aves, como el transporte, el hacinamiento, la manipulación, las altas temperaturas en épocas estivales, la provisión de alimento y agua, entre otras (Mashaly et al., 2004; Satterlee et al., 2008; Lay et al., 2011; Nazar et al., 2012; Marin et al., 2014; Davison, 2014). El manejo de estos animales puede resultar en una combinación de varios de estos estresores, que consciente o inconscientemente (o inevitablemente como en el caso de las inclemencias climáticas) si son aplicados de manera continua en el tiempo, derivarían en un estrés de tipo crónico. Esto podría derivar en la manifestación de las consecuencias expuestas en este trabajo, generando alteraciones homeostáticas que podrían tener un impacto directo sobre la salud y el bienestar del animal, derivando en un estado de susceptibilidad incrementada frente al medio en el que se encuentran.

Es importante destacar la necesidad de continuar el desarrollo de estudios a posteriori que profundicen en la comprensión de los fenómenos observados. Por ejemplo, determinaciones hormonales que complementen los parámetros evaluados con muestras de suero ya obtenidas del presente estudio y la prolongación del "período de recuperación" de los individuos para poder analizar el tiempo que tarda en retornar la variable relación H/L a sus valores basales. Se podría además incorporar variables relacionadas a la inmunidad humoral, como por ej. titulaciones contra antígenos no patogénicos.

Conclusiones

El estrés crónico afectó a las variables analizadas, generando un estado global que podría considerarse de inmunosupresión celular al cabo de nueve días, momento de mayor susceptibilidad en las aves de la presente experiencia. Las dos variables presentan una dinámica diferente, sin embargo comparten que a los nueve días llegan a una significativa supresión. El porcentaje de inflamación medido mediante el análisis de hipersensibilidad demorada, fue la variable que recuperó los valores basales al cabo de seis días sin exposición al estresor. De esta manera cabe mencionar que: i) existen momentos de mayor y menor susceptibilidad fisiológica a potenciales patógenos y ii) la recuperación de la capacidad de inflamación es un fenómeno más rápido que la recuperación de poblaciones leucocitarias. Tres o más días consecutivos de estrés térmico serían indicador suficiente para maximizar medidas de control de exposición a patógenos cuya neutralización requiera de mecanismos inflamatorios. Además, la rápida disminución y recuperación de la respuesta inflamatoria junto con la disminución tardía de las poblaciones celulares (y su lenta recuperación) sugerirían que sería recomendable evitar la sucesión de eventos estresantes que sostengan la afección fisiológica que implica la respuesta de estrés, y que quizás varios períodos espaciados de estrés de corta duración serían preferibles frente a pocos períodos sucesivos de larga duración.

Agradecimientos

Este trabajo fue parcialmente financiado por fondos provenientes de FONCYT (PICT 2014-2764), SECyT-UNC. EAV posee una beca doctoral de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. FNN posee una beca de posdoctorado del CONICET y RHM es miembro de carrera de la misma institución. Los autores agradecen a Darío C. Arbelo por su asistencia técnica.

Bibliografía

BHATNAGAR, S. y DALLMAN, M. 1998. Neuroanatomical basis for facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to a novel stressor after chronic stress. *Neuroscience*. 84(4):1025–39.

CARSIA, R.V. and HARVEY, S. 2000. *Sturkie's Avian Physiology*. Elsevier

DAI, S.F.F., GAO, F., ZHANG, W.H.H., SONG, S.X.X., XU, X.L.L. and ZHOU, G.H.H. 2011. Effects of dietary glutamine and gamma-aminobutyric acid on performance, carcass characteristics and serum parameters in broilers under circular heat stress. *Anim. Feed Sci. Technol.* 168(1–2):51–60.

DAVISON, F. 2013. The Importance of the Avian Immune System and its Unique Features. In *Avian Immunology: Second Edition*, pp. 1–9. Elsevier.

DHABHAR, F.S. 2009. Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection and immunopathology. *Neuroimmunomodulation*. 16(5):300–317.

DHABHAR, F.S. and 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(4):286–306.

Di RIENZO, J.A., CASANOVES, F., BALZARINI, M.G., GONZALEZ, L., TABLADA, M. and ROBLEDO, C.W. 2013. InfoStat, versión 2013.

DOHMS, J.E. and METZ, A. 1991. Stress--mechanisms of immunosuppression. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 30(1):89–109.

FAIR, J.M., HANSEN, E.S. and RICKLEFS, R.E. 1999. Growth, developmental stability and immune response in juvenile Japanese quails (*Coturnix coturnix* japonica). *Proc. Biol. Sci.* 266(1430):1735–42.

GASPARINO, E., VOLTOLINI, D.M., DEL VESCO, A.P., GUIMARÃES, S.E.F., NASCIMENTO, C.S. do and de OLIVEIRA NETO, A.R. 2013a. IGF-I, GHR and UCP mRNA expression in the liver and muscle of high- and low-feed-efficiency laying Japanese quail at different environmental temperatures. *Livest. Sci.* 157(1):339–44.

GASPARINO, E., VOLTOLINI, D.M., Del VESCO, A.P., GUIMARÃES, S.E.F., NASCIMENTO, C.S. do and de OLIVEIRA NETO, A.R. 2013b. IGF-I, GHR and UCP mRNA expression in the liver and muscle of high- and low-feed-efficiency laying Japanese quail at different environmental temperatures. *Livest. Sci.* 157(1):339–44.

GROSS, W.B. and SIEGEL, H.S. 2015. Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. *Avian Dis.* 27(4):

HUFF, G.R., HUFF, W.E. and BALOG, J.M. 2005. Stress response differences and disease susceptibility reflected by heterophil to lymphocyte ratio in turkeys selected for increased body weight. *Poult. Sci.* 84:709–17.

KUENZEL, W.J. and JURKEVICH, A. 2010. Molecular neuroendocrine events during stress in poultry. *Poult. Sci.* 89(4):832–40.

LÁBAQUE, M.C., KEMBRO, J.M., GUZMÁN, D.A., NAZAR, F.N. and MARIN, R.H. 2008. Ontogeny of copulatory behaviour in male Japanese quail classified by their T-maze performance as hatchlings. *Br. Poult. Sci.* 49(4):409–17.

LAURENCE, A., HOUDELIER, C., PETTON, C., CALANDREAU, L. and ARNOULD, C. 2012. Japanese Quail's Genetic Background Modulates Effects of Chronic Stress on Emotional Reactivity but Not Spatial Learning. *PLoS One*. 7(10):e47475.

LAY, D.C., FULTON, R.M., HESTER, P.Y., KARCHER, D.M. and KJAER, J.B. 2011. Hen welfare in different housing systems. *Poult. Sci.* 90(1):278–94.

MARIN, R.H., LISTE, M.G., CAMPDERRICH, I. and 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(7):1623–35.

MARTIN, L.B., GILLIAM, J., HAN, P., LEE, K. and WIKELSKI, M. 2005. Corticosterone suppresses cutaneous immune function in temperate but not tropical House Sparrows, Passer domesticus. *Gen. Comp. Endocrinol.* 140(2):126–35.

MASHALY, M.M., HENDRICKS, G.L., KALAMA, M.A., GEHAD, A.E., ABBAS, A.O. and PATTERSON, P.H. 2004. Effect of heat stress on production parameters and immune responses of commercial laying hens. *Poult. Sci.* 83(6):889–94.

MUMMA, J.O., THAXTON, J.P., VIZZIER-THAXTON, Y. and DODSON, W.L. 2006. Physiological stress in laying hens. *Poult. Sci.* 85(4):761–69.

MURPHY, K. 2009. *Inmunobiología de Janeway*. Interamericana de México. 7º ed.

NAZAR, F.N., BARRIOS, B.E., KAISER, P., MARIN, R.H. and CORREA, S.G. 2015a. Immune neuroendocrine phenotypes in *Coturnix coturnix*: do avian species show LEWIS/FISCHER-like profiles? *PLoS One*. 10(3):e0120712.

NAZAR, F.N., MAGNOLI, A.P., DALCERO, A.M. and 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(1):47–54.

NAZAR, F.N. and MARIN, R.H. 2011. Chronic stress and environmental enrichment as opposite factors affecting the immune response in Japanese quail (*Coturnix coturnix* japonica). *Stress*. 14(2):166–73.

NAZAR, F.N., MARIN, R.H., LISTE, G., CAMPDERRICH, I. and ESTEVEZ, I. 2015b. Manipulation of the phenotypic appearance of individuals in groups of laying hens: effects on stress and immune-related variables. *Stress*. 18(6):710–17.

PAMOK, S., AENGWANICH, W. and KOMUTRIN, T. 2009. Adaptation to oxidative stress and impact of chronic oxidative stress on immunity in heat-stressed broilers. *J. Therm. Biol.* 34(7):353–57.

PRUETT, S.B. 2001. Quantitative aspects of stress-induced immunomodulation. *Int. Immunopharmacol.* 1:507–20.

PUVADOLPIROD, S. and THAXTON, J.P. 2000. Model of physiological stress in chickens 1. Response parameters. *Poult. Sci.* 79(3):363–69.

ROBERTS, M.L., BUCHANAN, K.L., EVANS, M.R., MARIN, R.H. and SATTERLEE, D.G. 2009. The effects of testosterone on immune function in quail selected for divergent plasma corticosterone response. *J. Exp. Biol.* 212(19):3125–31.

RUIZ, G., ROSENMANN, M., NOVOA, F. and SABAT, P. 2002. Hematological parameters and stress index in rufous-collared sparrows dwelling in urban environments. *Condor*. 104:162–66.

SAHIN, K., ONDERCI, M., SAHIN, N., GURSU, M.F., KHACHIK, F. and KUCUK, O. 2006. Effects of lycopene supplementation on antioxidant status, oxidative stress, performance and carcass characteristics in heat-stressed Japanese quail. *J. Therm. Biol.* 31(4):307–12.

SAHIN, K., ORHAN, C., AKDEMIR, F., TUZCU, M., ALI, S. and SAHIN, N. 2011. Tomato powder supplementation activates Nrf-2 via ERK/Akt signaling pathway and attenuates heat stress-related responses in quails. *Anim. Feed Sci. Technol.* 165(3–4):230–37.

SAHIN, K., ORHAN, C., TUZCU, Z., TUZCU, M. and SAHIN, N. 2012. Curcumin ameloriates heat stress via inhibition of oxidative stress and modulation of Nrf2/HO-1 pathway in quail. *Food Chem. Toxicol.* 50(11):4035–41.

SANDHU, M.A., MIRZA, F.Q., AFZAL, F. and MUKHTAR, N. 2012. Effect of heat stress on cellular and humoral immunity and its cure with ??-tocopherol in meat type birds. *Livest. Sci.* 148(1–2):181–88.

SAPOLSKY, R., ROMERO, L. and MUNCK, A. 2000. How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses ? Preparative Actions *. *Endocr. Rev.* 21(April):55–89.

SATTERLEE, D.G., HESTER, A., LERAY, K. and SCHMIDT, J.B. 2008. Influences of maternal corticosterone and selection for contrasting adrenocortical responsiveness in Japanese quail on developmental instability of female progeny. *Poult. Sci.* 87(8):1504–9.

SCANES, C.G. 2014. *Sturkie's Avian Physiology*. Elsevier.

SEVER, J. 1962. Application of a microtechnique to viral serological investigations. *J. Immunol.*

SHINI, S., HUFF, G.R., SHINI, A. and KAISER, P. 2010a. Understanding stress-induced immunosuppression: exploration of cytokine and chemokine gene profiles in chicken peripheral leukocytes. *Poult. Sci.* 89(4):841–51.

SHINI, S. and 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(5):388–99.

SHINI, S., KAISER, P., SHINI, A. and BRYDEN, W.L. 2008. Biological response of chickens (*Gallus gallus domesticus*) induced by corticosterone and a bacterial endotoxin. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 149(2):324–33.

SHINI, S., SHINI, A. and 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(1–2):73–77.

SHINI, S., SHINI, A. and KAISER, P. 2010b. Cytokine and chemokine gene expression profiles in heterophils from chickens treated with corticosterone. *Stress*. 13(3):185–94.

SIEGEL, H.S. 1995. Gordon Memorial Lecture. Stress, strains and resistance. *Br. Poult. Sci.* 36(1):3–22.

SONG, J., JIAO, L.F.F., XIAO, K., LUAN, Z.S.S. and HU, C.H.H. 2013. Cello-oligosaccharide ameliorates heat stress-induced impairment of intestinal microflora, morphology and barrier integrity in broilers. *Anim. Feed Sci. Technol.* 185(3–4):175–81.

VINKLER, M., BAINOVÁ, H. and ALBRECHT, T. 2010. Functional analysis of the skin-swelling response to phytohaemagglutinin. *Funct. Ecol.* 24(5):1081–86.