

**Efecto de la inoculación de *Salmonella* Enteritidis inactivada, suplementación de la dieta y estrés crónico por calor sobre la interfaz inmunoneuroendócrina de codornices japonesas adultas.**

Videla, Emiliano Ariel; Chacana, Pablo Anibal; Jaime, Cristian Emanuel; Marín, Raúl Héctor; Nazar; Franco Nicolás.

emilianovidela93@gmail.com; chacana.pablo@inta.gob.ar; cristian\_emanuel97@hotmail.com; raul.marin@unc.edu.ar; franco.nicolas.nazar@unc.edu.ar

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Universidad Nacional de Córdoba.

---

**Resumen.**

El objetivo fue analizar si la suplementación dietaria con timol puede modular los efectos que un estrés crónico por calor y un inóculo inactivado inducen sobre variables representativas de la interfaz (INE) en codornices japonesas adultas (*Coturnix coturnix*). Parejas (83) de 100 días de edad (DE) fueron criadas con agua y alimento *ad libitum*. Se suplementó la dieta con una dosis de 80mg timol/ave/día (103 a 130 DE). La inoculación fue a los 115 DE con una suspensión inactivada de *Salmonella* Enteritidis. El estrés por calor se logró aumentando la temperatura de 24°C a 34°C por 9 días consecutivos (121 a 129 DE). Las muestras se tomaron el día posterior a la finalización del protocolo de estrés. Se analizaron las variables linfoproliferación a fitohemaglutinina-P (PHA-P), título de anticuerpos contra glóbulos rojos de oveja (GRO) y relación Heterófilos/Linfocitos (H/L). Los datos se analizaron mediante MLGyMs, evaluando los efectos del factor Inóculo, Suplementación, Estrés, Sexo y su interacción. Mientras que el estrés por calor disminuyó la respuesta linfoproliferativa contra PHA-P e incrementó la relación H/L, el timol moduló parcial y positivamente la respuesta linfoproliferativa y evitó la alteración de la relación H/L ( $P < 0.03$  en ambos casos). Las hembras tuvieron mayores valores de H/L que los machos; sin embargo, machos inoculados tuvieron una mayor relación H/L respecto de los no inoculados ( $P = 0.05$ ). Las hembras mostraron un mayor título de anticuerpos contra GRO que los machos ( $P < 0,01$ ). En conjunto, los resultados sugieren un efecto protector parcial del timol contra el estrés por calor sin evidenciar cambios relevantes en las aves inoculadas.

**Palabras clave:** Estrés Crónico, *Salmonella* Enteritidis, Codorniz, Timol, Inmunidad.

### **Introducción.**

En aves, muchas demandas ambientales son fisiológicamente integradas a nivel de la interfaz inmunoneuroendócrina (INE), involucrando a los sistemas inmune, nervioso y endócrino. La respuesta de estrés se sustenta en dos ejes de dicha interfaz: el Hipotálamo-Pituitario-Adrenal (HPA) y el Simpático-Adrenal. Una vez activados, el organismo desarrolla la respuesta de estrés liberando una serie de mediadores (corticosterona, adrenalina y noradrenalina, citoquinas) para lidiar con los efectos del estresor (Shini & Kaiser, 2009). Diversos factores ambientales a los que se exponen las aves durante el proceso de cría en la industria avícola, como elevadas temperaturas por periodos prolongados de tiempo y la exposición a agentes patógenos (Calefi, Quinteiro-Filho, Ferreira, & Palermo-Neto, 2017; Honda et al., 2015; Kapczynski, Afonso, & Miller, 2013) son considerados estresores. Así se inducen cambios fisiológicos que demandan recursos energéticos destinados a reestablecer las condiciones homeostáticas (Romero, Dickens, & Cyr, 2009), teniendo consecuencias en la productividad, la salud y el bienestar (Calefi et al., 2017; Ma et al., 2014; Mashaly et al., 2004). La influencia de estresores puede además afectar diferencialmente a los sexos, siendo los

machos más susceptibles a los efectos de los estresores que las hembras (Marin, Satterlee, Cadd, & Jones, 2002; Nazar & Marin, 2011).

El sistema inmune es crucial para el mantenimiento de la salud de las aves. Este sistema basa su funcionamiento en la correcta distinción entre lo propio y lo ajeno (Davison, 2014). Sus principales componentes de respuesta se pueden agrupar en innatos y adaptativos. El componente innato se caracteriza por ser rápido y poseer baja memoria y especificidad. Por contraparte, el adaptativo es más lento, pero posee elevada memoria y especificidad (Davison, 2014). La bibliografía indica que el estrés crónico por calor ejerce efectos perjudiciales en ambos componentes: alteraciones en la morfología de la mucosa y la microflora intestinal (Quinteiro-Filho et al., 2010), incremento en la relación Heterófilos/Linfocitos (H/L), menor respuesta linfoproliferativa a fitohemaglutinina (PHA-P) (Mashaly et al., 2004; Nazar, Videla, Fernandez, Labaque, & Marin, 2018), disminución de la actividad de macrófagos (Quinteiro-Filho et al., 2012), y disminución en el título de anticuerpos contra glóbulos rojos de oveja (GRO), virus de Newcastle y bursitis infecciosa (Mashaly et al., 2004; Nazar et al., 2018; Quinteiro-Filho et al., 2010; Sandhu, Mirza, Afzal, &

Mukhtar, 2012; Sohail et al., 2010). Además, se ha reportado que la exposición a agentes patógenos genera incremento de la corticosterona plasmática, incremento de la relación H/L, disminución del título de anticuerpos, altera la estructura celular de linfocitos y heterófilos y aumenta la actividad quimioattractante de linfocitos mediada por quemoquinas plasmáticas (Shini, Kaiser, Shini, & Bryden, 2008a, 2008b). Particularmente, la exposición a *Salmonella* (aunque dependiente del serotipo, la edad, el genotipo y estado inmune del hospedador) genera incremento de anticuerpos específicos (IgM, IgY e IgA), una fuerte respuesta celular tipo T, incrementa la expresión de RNA mensajero para citoquinas y quemoquinas tanto en el intestino como en el bazo (Davison, 2014; van Immerseel et al., 2005).

En el escenario descripto, se han propuesto diversas estrategias para mitigar, compensar o revertir los efectos negativos de la exposición crónica a elevadas temperaturas en aves. Consideraciones de infraestructura, enriquecimiento ambiental, provisión alternativa de agua y alimento, y selección genética son algunas de las estrategias propuestas (Renaudeau et al., 2012). La suplementación dietaria también es una de ellas, utilizando diversos componentes como tocoferol, glutamina, vitaminas C, polvo de tomate y curcumina

(Leshchinsky & Klasing, 2001; Sahin et al., 2011; Sandhu et al., 2012). El timol (componente principal del orégano) ha sido empleado en especies de producción avícola, como pollos de engorde y codornices, para estudiar sus efectos en parámetros productivos, aspectos comportamentales y respuesta inmune (Hashemipour, Kermanshahi, Golian, & Veldkamp, 2013; Lábaque, Kembro, Luna, & Marin, 2013; Luna, Dambolena, Zygadlo, Marin, & Labaque, 2012). Actividad antiviral, bactericida y antioxidante de este componente natural han sido informadas (Ezzat Abd El-Hack et al., 2016), como así también un efecto potenciador del receptor GABA, asociado a la disminución de los niveles de ansiedad ante situaciones estresantes (García, Bujons, Vale, & Suñol, 2006b; Lábaque et al., 2013). Cabe destacar que ninguno de los mencionados estudios fue desarrollado bajo condiciones de estrés crónico por calor.

En el contexto descripto, surge el interrogante de cómo sería la resolución por parte de las aves de demandas simultáneas que sean integradas en la misma interfaz INE, considerando las mencionadas susceptibilidades a los desafíos entre géneros. Así, la suplementación dietaria con timol podría pensarse como una estrategia alimenticia para mitigar los efectos deletéreos del estrés térmico, explorando

una nueva opción de alimento funcional que permita mejorar la interfaz INE de aves que lo sufran en conjunto con un desafío inmune contra un inóculo.

### **Objetivo**

El objetivo de este estudio fue evaluar si la suplementación de la dieta con timol puede modular los efectos que un estrés crónico por calor induce sobre variables de la interfaz inmunoneuroendócrina cuando se desarrolla de modo simultáneo con un desafío inmune contra un inóculo inactivado de *Salmonella* Enteritidis en codornices japonesas adultas. Debido a las diferencias entre géneros en las respuestas frente a desafíos, también se evaluó si machos y hembras difieren en la resolución de demandas simultáneas integradas en la interfaz INE.

### **Materiales y Métodos.**

#### *Animales y alojamiento.*

Se emplearon codornices japonesas adultas (*Coturnix coturnix*), tanto machos como hembras, por ser un muy buen modelo animal debido a su pequeño tamaño, su corto ciclo de vida y su bajo costo de mantenimiento (Huss, Poynter, & Lansford, 2008). Las aves fueron criadas según protocolos de rutina de nuestro laboratorio (Nazar, Barrios, Kaiser, Marin, & Correa, 2015).

Un total de 83 parejas de 100 días de edad (DE) fueron empleadas, momento en el que fisiológicamente han alcanzado la madurez sexual (estabilidad en postura de huevos). A los 100 DE, las aves fueron trasladadas a las salas experimentales. Fueron alojadas en jaulas enriquecidas con agua y alimento provistos ad libitum durante todo el experimento. El enriquecimiento consistió en parches de cartón corrugado que ocupaba el 50% de la superficie de la jaula y pelotas plásticas, siendo alternados semanalmente. El período de adaptación de las parejas a su nuevo alojamiento fue de 3 días (100 a 102 DE). El fotoperiodo fue de 14 horas de luz y 10 de oscuridad. La temperatura se mantuvo a 25°C (temperatura confort).

#### *Tratamientos.*

La **suplementación de la dieta** fue con timol. El timol fue provisto a través del alimento, pulverizando una solución de timol disuelto en alcohol con la dosis correspondiente, equivalente a 80mg/animal/día. La suplementación dietaria se realizó durante los 18 días previos al comienzo del estrés por calor (103 a 120 DE, asegurándose que el compuesto alcance el *plateau* de concentración plasmática), y continuó durante el protocolo de estrés (121 a 129 DE) hasta el día en el que se realizó la

extracción de sangre (130 DE). La renovación de alimento se realizó cada tres días, otorgando 240 gramos a cada pareja.

La **inoculación** se realizó el día 15 (115 DE) de suplementación dietaria, 15 días previos a la extracción de muestras de sangre. Se inyectó intramuscularmente 300  $\mu$ l de una suspensión inactivada de *Salmonella* Enteritidis ( $10^8$  bacterias / ave), en la región del pectoral mayor derecho (pechuga), tanto en machos como en hembras, de las parejas correspondientes.

El **protocolo de estrés por calor** se realizó incrementando la temperatura diariamente desde los 24°C a los 34°C empezando a las 8:30 hs hasta las 16:30 hs. La temperatura se incrementó en un período de dos horas y se mantuvo a 34°C aproximadamente las 16:30 hs. Posteriormente, la temperatura disminuyó gradualmente hasta retornar a los 24°C a las 19:00 hs. El protocolo de estrés térmico fue desarrollado por 9 días continuos (121 a 129 DE).

De esta forma, quedó establecido un diseño experimental con cuatro factores, cada uno con dos posibles niveles: i) factor sexo: Macho vs Hembra; ii) factor suplementación: No Suplementado vs Suplementado; iii) factor estrés: No Estresado vs Estrés; y vi) factor inóculo: Inóculo vs No Inóculo; como así también

sus todas las posibles interacciones dobles, triples y cuádruples.

*Toma de muestras. Determinaciones de variables representativas de la interfaz INE.*

La toma de muestras se realizó el día posterior a la finalización del protocolo de estrés. Las muestras de sangre fueron tomadas utilizando jeringas de 1 ml, previamente tratadas con ácido etildiaminotetraacético (EDTA) para evitar la coagulación sanguínea. Las muestras de sangre fueron tomadas mediante punción de la vena yugular. Una gota de sangre fue empleada para la realización de extendidos, y el resto fue centrifugado a 2000 g por 15 minutos. El plasma fue alicuotado, y luego utilizado para titulaciones de anticuerpos. Se midieron las siguientes variables representativas de la interfaz INE:

-*Título de anticuerpos contra GRO*: Una semana previa a la extracción de muestras, se inoculó intraperitonealmente una solución de GRO al 10%. Para el ensayo, 30 $\mu$ l de plasma (previamente inactivado el sistema del complemento a 55°C por 30 minutos) se colocaron en el primer pocillo (plasma puro) y 30  $\mu$ l en el segundo pocillo para hacer diluciones seriadas  $\frac{1}{2}$  a lo largo de 10 carriles, cada uno de los cuales contenía previamente 30  $\mu$ l de PBS. El carril 11 fue empleado como blanco y el carril 12 como control negativo. 30 $\mu$ l de una solución

de GRO al 2% se colocó en todos los pocillos, con excepción de 11, y se incubó en estufa a 40°C por un lapso de 45 minutos. Se asignó como título 1 al suero puro y 10 al suero en solución 1/512. (Nazar et al., 2015)

*-Linfoproliferación in-vivo contra PHA-P:* Veinticuatro horas antes de la extracción de sangre, 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 (1mg/ml) de fitohemaglutinina (PHA-P) para inducir una respuesta inmune celular. La zona inyectada fue medida a las 24 horas y se calculó el porcentaje de inflamación (Nazar et al. 2015a,).

*-Recuento de células blancas:* los extendidos de sangre 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) para cada individuo (Shini et al., 2010, Nazar & Marin, 2011).

#### *Análisis Estadístico.*

Los datos de cada variable fueron evaluados mediante Modelos Lineales Generales y Mixtos, empleando como

efectos fijos la suplementación dietaria, el inóculo, el estrés y el sexo, y como efecto aleatorio la jaula de cada pareja. Se determinaron la probabilidad de ocurrencia de los efectos de los tratamientos: suplementación, inóculo y estrés, como todas sus interacciones. 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., 2016).

#### **Resultados y Discusión.**

Para la variable linfoproliferación contra PHA-P, el análisis estadístico mostró efectos significativos para el estrés ( $F= 41.79$ ;  $P<0.01$ ) y para la interacción entre los factores estrés y suplementación ( $F= 4.73$ ;  $P= 0.03$ ). Las aves que atravesaron el protocolo de estrés tuvieron una menor respuesta linfoproliferativa contra la PHA-P (Figura 1). Interesantemente, aquellas aves que atravesaron el protocolo de estrés y fueron suplementadas, tuvieron una respuesta mayor respecto de aquellos que no fueron suplementados (Figura 1). Estos resultados son consistentes con estudios previos que indican que el estrés por calor induce una inmunosupresión de esta variable luego de 9 días de exposición

(Mashaly et al., 2004; Nazar et al., 2018). El timol ha sido descrito como inmunoestimulante (Ezzat Abd El-Hack et al., 2016), y nuestros resultados indican que bajo condiciones de estrés térmico, el timol modularía de manera parcial la respuesta inflamatoria. Cabe destacar que esta

variable es indicativa del potencial pro-inflamatorio (Vinkler, Bainova, Bainová, & Albrecht, 2010), por lo que si las aves no hubiesen estado suplementadas con timol, su capacidad de neutralizar y eliminar potenciales patógenos habría estado disminuida.

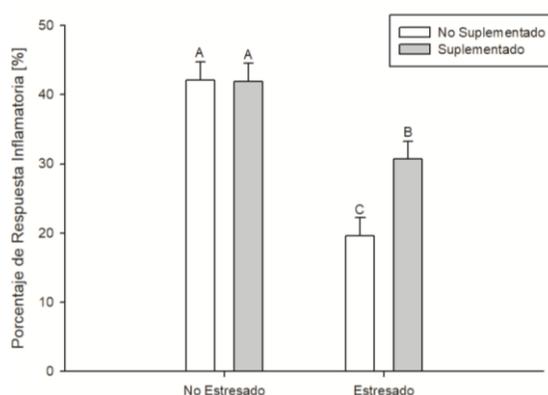


Figura 1. Efecto del estrés crónico por calor y la suplementación dietaria con timol sobre la linfoproliferación *in-vivo* contra PHA-P en codornices japonesas adultas. El estrés crónico por calor se logró aumentando la temperatura de 24°C a 34°C durante 9 días consecutivos. La suplementación dietaria comenzó 18 días previos al comienzo del protocolo de estrés térmico y se continuó hasta el día de muestreo. La toma de muestras se realizó el día posterior a la finalización del protocolo de estrés. Las barras representan la media y las líneas el error estándar. <sup>A,B</sup>Las letras diferentes indican diferencias entre los grupos (Prueba Fischer LSD).

Para la variable título de anticuerpos contra GRO, el análisis estadístico mostró efectos significativos para el sexo ( $F= 13.35$ ,  $P<0.01$ ) (Figura 2A). Hubo una tendencia ( $F=3.62$ ;  $P=0.06$ ) para el sexo y la suplementación, y para la triple interacción sexo, suplementación e inóculo ( $F=3.02$ ;  $P=0.08$ ) (Figura 2B). En coherencia con estudios previos, las hembras presentaron una mayor respuesta de título de anticuerpos (Nazar & Marin, 2011). Hembras que fueron suplementadas, independientemente de si fueron o no

inoculadas, mostraron una tendencia a la disminución del título de anticuerpos contra GRO, teniendo valores similares a los machos (independientemente si fueron o no suplementados) (Figura 2B; #). Finalmente, los machos inoculados y suplementados tuvieron una tendencia a incrementar el título de anticuerpos (Figura 2B; \*). El estrés no tuvo efecto significativo sobre ninguno de los dos sexos; sin embargo estudios previos indican que hembras en etapa juvenil (previa a la maduración sexual y sin postura de huevos), luego de 9 días de exposición a

un estrés crónico por calor tuvieron menor respuesta de título de anticuerpos que aquellas criadas bajo temperaturas confort (Nazar et al., 2018). Esto indicaría que la producción y los niveles de anticuerpos serían susceptibles durante etapas tempranas del desarrollo. Las diferencias de producción de anticuerpos entre sexos asociadas a la suplementación y la inoculación podrían estar relacionadas a condiciones genéticas. En bibliografía, se ha descrito que las hembras tienen un fuerte componente humoral en la respuesta inmune, mientras que los machos se caracterizan por tener una mayor respuesta innata relacionada a diferencias en componentes hormonales (Duffy, Bentley, Drazen, & Ball, 2000; Hayward, Richardson,

Grogan, & Wingfield, 2006; Marin et al., 2002). El hecho de que machos suplementados e inoculados tuvieron una respuesta similar en el título de anticuerpos a hembras suplementadas puede ser una tendencia a equiparar la respuesta humoral diferencial entre sexos debido a la influencia de factores ambientales externos, como la dieta y la exposición a agentes patógenos. Esta hipótesis es un campo abierto debido a que no hay estudios que establezcan relaciones entre la suplementación de la dieta con timol y su posible impacto sobre componentes hormonales como estrógenos o testosterona, por lo que la profundización en este aspecto es necesaria para contrastar dicha hipótesis.

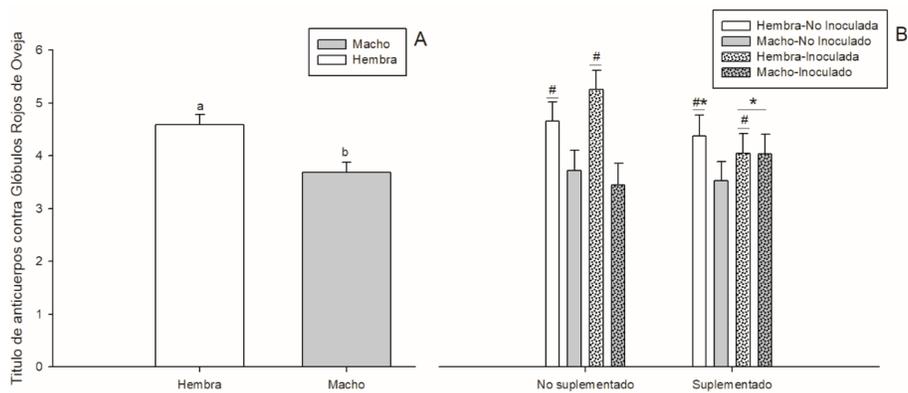
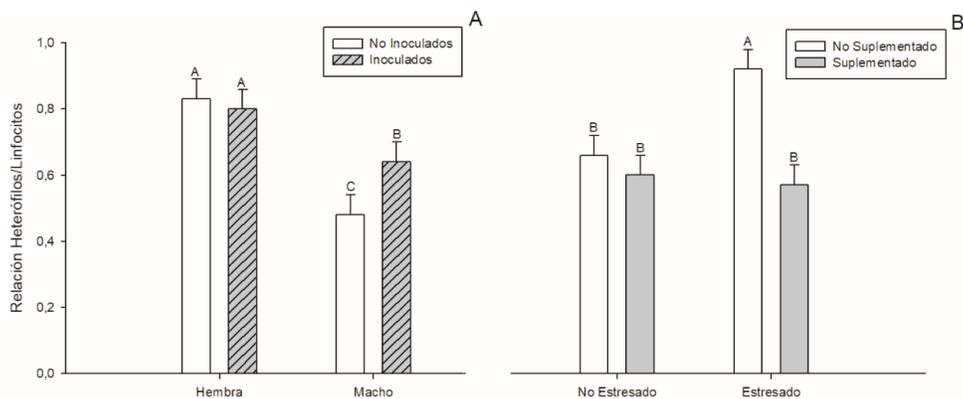


Figura 2. Efecto del sexo (A-B), la suplementación dietaria con timol y el inóculo (B) sobre el título de anticuerpos contra Glóbulos Rojos de Oveja en codornices japonesas adultas. El inóculo consistió en la administración de una *Salmonella enteritidis* inactivada en solución. La suplementación dietaria comenzó 18 días previos al comienzo del protocolo de estrés térmico y se continuó hasta el día de muestreo. La toma de muestras se realizó el día posterior a la finalización del protocolo de estrés. Las barras representan la media y las líneas el error estándar. <sup>a-b</sup>Las letras diferentes indican diferencias entre los grupos (Prueba Fischer LSD). <sup>#, \*</sup>Tendencias estadísticas.

estadísticas.

Para la variable relación H/L, el análisis estadístico mostró efectos significativos para las interacciones sexo e inóculo ( $F=3.86$ ;  $P=0.05$ ) y estrés y suplementación ( $F=5.14$ ;  $P=0.02$ ). Las hembras, independientemente del inóculo, tuvieron mayor respuesta H/L, mientras que machos inoculados mostraron mayores índices de H/L respecto de aquellos no inoculados (Figura 3.A). Es de destacar que este índice es empleado como un indicador de la respuesta del eje HPA, relacionado con niveles de corticosterona en sangre: mayores valores de este índice implican mayores valores de corticosterona en sangre (Mumma, Thaxton, Vizzier-Thaxton, & Dodson, 2006; Scanes, 2016). Además, existen diferencias entre machos y hembras en la susceptibilidad al estrés (Nazar & Marin, 2011), por lo que machos expuestos a un inóculo habrían desencadenado una mayor respuesta del eje HPA, incrementando la consecuente liberación de corticosterona, promoviendo así un incremento del indicador. Además, esto se sustenta en que niveles incrementados de corticosterona sanguíneos han sido

relacionados a un incremento en la cantidad de heterófilos inmaduros que están migrando desde médula ósea hacia el torrente sanguíneo (Shini et al., 2008b, 2008a). Por otro lado, aquellas aves que atravesaron el protocolo de estrés y que no fueron suplementadas mostraron los mayores valores de H/L (Figura 3B), indicando la activación del eje HPA para hacer frente a la exposición al estresor (Lábaque et al., 2013; Nazar et al., 2018). Interesantemente, aquellos individuos que fueron suplementados y que también atravesaron dicho protocolo mostraron valores similares a las aves no estresadas. Estudios previos reportan interacciones entre el timol y el receptor GABA, asociados a una reducción de los niveles de ansiedad frente a la exposición al estresor (García, Bujons, Vale, & Suñol, 2006a), posiblemente evitando el incremento de los niveles de corticosterona sanguíneos. Estos resultados, indicarían entonces que el timol evitaría la alteración de las poblaciones celulares producto del incremento de corticosterona plasmática.



Efecto del sexo y el inóculo (A), y la suplementación dietaria con timol y el estrés crónico por calor (B) sobre la relación Heterófilos/Linfocitos en codornices japonesas adultas. El inóculo consistió en la administración de una *Salmonella enteritidis* inactivada en solución. La suplementación dietaria comenzó 18 días previos al comienzo del protocolo de estrés térmico y se continuó hasta el día de muestreo. El estrés crónico por calor se logró aumentando la temperatura de 24°C a 34°C durante 9 días consecutivos. La toma de muestras se realizó el día posterior a la finalización del protocolo de estrés. Las barras representan la media y las líneas el error estándar. <sup>A-C</sup>Las letras diferentes indican diferencias entre los grupos (Prueba Fischer LSD).

## Conclusiones.

Los efectos de diferentes estímulos ambientales tales como la nutrición, la exposición a agentes patógenos y la influencia de elevadas temperaturas son integrados en la interfaz INE, diferencias asociadas a la susceptibilidad entre machos y hembras a la influencia de estresores (Calefi et al., 2017; Huff et al., 2005; Marin et al., 2002; Nazar & Marin, 2011; Romero et al., 2009). Estas mencionadas diferencias derivaron en una respuesta humoral diferencial, siendo las hembras las que generaron una respuesta humoral más robusta. Esta respuesta diferencial también se vio reflejada en la relación H/L cuando los individuos fueron expuestos a un desafío inmune mediante la administración de un

inóculo inactivado de *Salmonella* Enteritidis, donde los machos resultaron ser más susceptibles, incrementando sus valores de H/L, respecto de las hembras. Considerando que en la avicultura, es habitual el uso de vacunas de *Salmonella* para la protección de las aves contra el patógeno, sería importante considerar estas diferencias para la optimización de planes de vacunación. Si bien la respuesta humoral no se vio afectada por la exposición crónica a elevadas temperaturas, dicho factor sí afectó la respuesta mediada por células como así también la relación H/L, independientemente del sexo y del inóculo. Aves que fueron expuestas al estrés crónico por calor sufrieron una inmunosupresión de la respuesta linfoproliferativa contra la PHA-

P y un incremento de los valores de la relación H/L, indicando mayores niveles plasmáticos de mediadores de la respuesta de estrés y una menor capacidad de migración y reclutamiento celular, como así también de neutralizar o eliminar agentes patógenos vía respuesta innata (Davison, 2014; Scanes, 2016; Vinkler et al., 2010). Interesantemente, el timol evitó la alteración de componentes relacionados a la respuesta de estrés y habría modulado parcialmente (y de manera positiva) el potencial pro-inflamatorio de los individuos. De esta manera, la suplementación dietaria con timol protegería parcialmente contra los efectos inmunosupresores relacionados a la exposición prolongada a elevadas temperaturas.

## Bibliografía

- Calefi, A. S., Quinteiro-Filho, W. M., Ferreira, A. J. P., & Palermo-Neto, J. (2017). Neuroimmunomodulation and heat stress in poultry. *World's Poultry Science Journal*, 73(3), 493–504. doi.org/10.1017/S0043933917000472
- Davison, F. (2014). *Avian Immunology*. Second Edition. Elsevier. London, UK doi.org/10.1016/B978-0-12-396965-1.00001-7
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2016). InfoStat, versión 2016. Córdoba: Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Duffy, D. L., Bentley, G. E., Drazen, D. L., & Ball, G. F. (2000). Effects of testosterone on cell-mediated and humoral immunity in non-breeding adult European starlings. *Behavioral Ecology*, 11(6), 654-662. doi.org/10.1093/beheco/11.6.654
- Ezzat Abd El-Hack, M., Alagawany, M., Ragab Farag, M., Tiwari, R., Karthik, K., Dhama, K., Zorriehzahra, J., & Adel, M. (2016). Beneficial impacts of thymol essential oil on health and production of animals, fish and poultry: a review. *Journal of Essential Oil Research*, 28(5), 365-382. doi.org/10.1080/10412905.2016.1153002
- García, D. A., Bujons, J., Vale, C., & Suñol, C. (2006). Allosteric positive interaction of thymol with the GABAA receptor in primary cultures of mouse cortical neurons. *Neuropharmacology*, 50(1), 25–35. doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.07.009
- Hashemipour, H., Kermanshahi, H., Golian, A., & Veldkamp, T. (2013). Effect of thymol and carvacrol feed supplementation on performance , antioxidant enzyme activities , fatty acid

- composition, digestive enzyme activities, and immune response in broiler chickens. *Poultry Science*, 92(8), 2059–2069. doi.org/10.3382/ps.2012-02685
- Hayward, L. S., Richardson, J. B., Grogan, M. N., & Wingfield, J. C. (2006). Sex differences in the organizational effects of corticosterone in the egg yolk of quail. *General and Comparative Endocrinology*, 146(2), 144–148. doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.10.016
- Honda, B. T. B., Calefi, A. S., Costola-De-Souza, C., Quinteiro-Filho, W. M., Da Silva Fonseca, J. G., De Paula, V. F., & Palermo-Neto, J. (2015). Effects of heat stress on peripheral T and B lymphocyte profiles and IgG and IgM serum levels in broiler chickens vaccinated for Newcastle disease virus. *Poultry Science*, 94(10), 2375–2381. doi.org/10.3382/ps/pev192
- Huff, G. R., Huff, W. E., & Balog, J. M. (2005). Stress response differences and disease susceptibility reflected by heterophil to lymphocyte ratio in turkeys selected for increased body weight. *Poultry Science*, 84(5), 709–717.
- Huss, D., Poynter, G., & Lansford, R. (2008). Japanese quail (*Coturnix japonica*) as a laboratory animal model. *Lab Animal*, 37(11), 513–519. doi.org/10.1038/labani1108-513
- Kapczynski, D. R., Afonso, C. L., & Miller, P. J. (2013). Immune responses of poultry to Newcastle disease virus. *Developmental and Comparative Immunology*, 41(3), 447–453. doi.org/10.1016/j.dci.2013.04.012
- Lábaque, M. C., Kembro, J. M., Luna, A., & Marin, R. H. (2013). Effects of thymol feed supplementation on female Japanese quail (*Coturnix coturnix*) behavioral fear response. *Animal Feed Science and Technology*, 183(1–2), 67–72. doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.04.018
- Leshchinsky, T. V., & Klasing, K. C. (2001). Relationship between the level of dietary vitamin E and the immune response of broiler chickens. *Poultry Science*, 80(11), 1590–1599.
- Luna, A., Dambolena, J. S., Zygadlo, J. A., Marin, R. H., & Lábaque, M. C. (2012). Effects of thymol and isoeugenol feed supplementation on quail adult performance, egg characteristics and hatching success. *British Poultry Science*, 53(5), 631–639. doi.org/10.1080/00071668.2012.721536
- Ma, X., Lin, Y., Zhang, H., Chen, W., Wang, S., Ruan, D., & Jiang, Z. (2014). Heat stress impairs the nutritional

- metabolism and reduces the productivity of egg-laying ducks. *Animal Reproduction Science*. 145(3-4), 182-190.  
doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.01.002
- Marin, R. H., Satterlee, D. G., Cadd, G. G., & Jones, R. B. (2002). T-maze behavior and early egg production in Japanese quail selected for contrasting adrenocortical responsiveness. *Poultry Science*, 81(7), 981-986.  
doi.org/10.1093/ps/81.7.981
- Martin, L. B., Gilliam, J., Han, P., Lee, K., & Wikelski, M. (2005). Corticosterone suppresses cutaneous immune function in temperate but not tropical House Sparrows, *Passer domesticus*. *General and Comparative Endocrinology*, 140(2), 126–135.  
doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.10.010
- Mashaly, M. M., Hendricks, G. L., Kalama, M. A., Gehad, A. E., Abbas, A. O., & Patterson, P. H. (2004). Effect of heat stress on production parameters and immune responses of commercial laying hens. *Poultry Science*, 83(6), 889–894. doi.org/10.1093/ps/83.6.889
- Mumma, J. O., Thaxton, J.P., Vizzer-Thaxton, Y., & Dodson, W. L. (2006). Physiological stress in laying hens. *Poultry Science*, 85(4), 761-769.  
doi.org/10.1093/ps/85.4.761
- Nazar, F. N., Barrios, B. E., Kaiser, P., Marin, R. H., & Correa, S. G. (2015). Immune neuroendocrine phenotypes in *Coturnix coturnix*: Do avian species show LEWIS/FISCHER-like profiles? *PLoS ONE*, 10(3), e0120712.  
doi.org/10.1371/journal.pone.0120712
- Nazar, F. N., & Marin, R. H. (2011). Chronic stress and environmental enrichment as opposite factors affecting the immune response in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, 14(2), 166–173.  
doi.org/10.3109/10253890.2010.523093
- Nazar, F. N., Videla, E. A., Fernandez, M. E., Labaque, M. C., & Marin, R. H. (2018). Insights into thermal stress in Japanese quail (*Coturnix coturnix*): dynamics of immunoendocrine and biochemical responses during and after chronic exposure. *Stress*, 21(3), 257-266.  
doi.org/10.1080/10253890.2018.1442430
- Quinteiro-Filho, W. M., Gomes, A. V. S., Pinheiro, M. L., Ribeiro, A., Ferraz-de-Paula, V., Astolfi-Ferreira, C. S., Ferreira A. J., & Palermo-Neto, J. (2012). Heat stress impairs performance and induces intestinal inflammation in broiler chickens

- infected with Salmonella Enteritidis. *Avian Pathology*, 41(5), 421–427.  
doi.org/10.1080/03079457.2012.709315
- Quinteiro-Filho, W. M., Ribeiro, A., Ferraz-De-Paula, V., Pinheiro, M. L., Sakai, M., Sá, L. R. M., Ferreira A. J., & Palermo-Neto, J. (2010). Heat stress impairs performance parameters, induces intestinal injury, and decreases macrophage activity in broiler chickens. *Poultry Science*, 89(9), 1905–1914.  
doi.org/10.3382/ps.2010-00812
- Renaudeau, D., Collin, A., Yahav, S., de Basilio, V., Gourdine, J. L., & Collier, R. J. (2012). Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production. *Animal*, 6(5), 707–728.  
doi.org/10.1017/s1751731111002448
- Romero, L. M., Dickens, M. J., & Cyr, N. E. (2009). The reactive scope model - A new model integrating homeostasis, allostasis, and stress. *Hormones and Behavior*, 55(3), 375-389.  
doi.org/10.1016/j.yhbeh.2008.12.009
- Sahin, K., Orhan, C., Akdemir, F., Tuzcu, M., Ali, S., & Sahin, N. (2011). Tomato powder supplementation activates Nrf-2 via ERK/Akt signaling pathway and attenuates heat stress-related responses in quails. *Animal Feed Science and Technology*, 165(3–4), 230–237.  
doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.03.003
- Sandhu, M. A., Mirza, F. Q., Afzal, F., & Mukhtar, N. (2012). Effect of heat stress on cellular and humoral immunity and its cure with  $\alpha$ -tocopherol in meat type birds. *Livestock Science*, 148(1–2), 181–188.  
doi.org/10.1016/j.livsci.2012.06.005
- Scanes, C. G. (2016). Biology of stress in poultry with emphasis on glucocorticoids and the heterophil to lymphocyte ratio. *Poultry Science*, 95(9), 2208-2215 .  
doi.org/10.3382/ps/pew137
- Shini, S., Huff, G. R., Shini, A., & Kaiser, P. (2010). Understanding stress-induced immunosuppression: exploration of cytokine and chemokine gene profiles in chicken peripheral leukocytes. *Poultry Science*, 89(4), 841–851.  
doi.org/10.3382/ps.2009-00483
- Shini, S., & Kaiser, P. (2009). Effects of stress, mimicked by administration of corticosterone in drinking water, on the expression of chicken cytokine and chemokine genes in lymphocytes. *Stress*, 12(5), 388–399.  
doi.org/10.1080/10253890802526894
- Shini, S., Kaiser, P., Shini, A., & Bryden, W. L. (2008a). Biological response of chickens (*Gallus gallus domesticus*)

induced by corticosterone and a bacterial endotoxin. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 149(2), 324–333.

doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.10.003

Shini, S., Kaiser, P., Shini, A., & Bryden, W. L. (2008b). Differential alterations in ultrastructural morphology of chicken heterophils and lymphocytes induced by corticosterone and lipopolysaccharide. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 122(1-2), 83-93.

doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.10.009

Sohail, M. U., Ijaz, A., Yousaf, M. S., Ashraf, K., Zaneb, H., Aleem, M., & Rehman, H. (2010). Alleviation of cyclic heat stress in broilers by dietary supplementation of mannan-oligosaccharide and *Lactobacillus*-based probiotic: dynamics of cortisol, thyroid hormones, cholesterol, C-reactive protein, and humoral immunity. *Poultry Science*, 89(9), 1934–1938.

doi.org/10.3382/ps.2010-00751

van Immerseel, F., Methner, U., Rychlik, I., Nagy, B., Velge, P., Martin, G., Foster, N., Ducatelle, R., & Barrow, P. A. (2005). Vaccination and early protection against non-host-specific *Salmonella* serotypes in poultry: Exploitation of innate immunity and

microbial activity. *Epidemiology and Infection*, 133(6), 959-978.

doi.org/10.1017/S0950268805004711

Vinkler, M., Bainová, H., & Albrecht, T. (2010). Functional analysis of the skin-swelling response to phytohaemagglutinin. *Functional Ecology*, 24(5), 1081–1086. doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01711.x

### **Agradecimientos**

Los autores agradecen a la asistencia técnica de María Julia Ortiz, Pablo Prokopiuk y Dario C. Arbelo durante el desarrollo del estudio. F.N.N y R.H.M. son miembros de la carrera de investigador científico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). C.P.A es miembro investigador del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). E.A.V. posee una beca doctoral de Fondo Para la Investigación Científica y Tecnológica (FonCyT – Proyecto 2014-2764).

### **Financiamiento**

Esta investigación fue financiada por FonCyT (proyecto 2014-2764) y la Secretaría de Ciencia y Técnica, Universidad Nacional de Córdoba (SECyT-UNC, proyecto 30820150100031CB).