



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

**¿La coloración feomelánica refleja los niveles de
estrés oxidante en el individuo?**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Vianey Zulema Alejandro Córdova

Director

Dra. Bibiana Carolina Montoya

Co-director

Dr. Lorenzo Pérez Rodríguez



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

**¿La coloración feomelánica refleja los niveles de
estrés oxidante en el individuo?**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Vianey Zulema Alejandro Córdoba

Director

Dra. Bibiana Carolina Montoya Loaiza

Co-Director

Dr. Lorenzo Pérez Rodríguez

Comité tutorial

Dr. Jorge I. Ayala Berdón

Dra. Melissa Plasman

Hoja de financiamiento

Este trabajo de investigación se llevó a cabo en las Instalaciones del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala. Se desarrolló gracias al financiamiento por parte del Proyecto CONACyT Ciencia de Frontera – 490792 así como también a la beca proporcionada al estudiante con clave 631359 otorgada por el CONACYT. La Maestría en Ciencias Biológicas está registrada en el Padrón de Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC).



**COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E**

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Vianney Zulema Alejandro Córdoba** realiza para la obtención del grado de **Maestra en Ciencias Biológicas**, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es “**¿La coloración feomelánica refleja los niveles de estrés oxidante en el individuo?**”.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.


A T E N T A M E N T E
TLAXCALA, TLAX., JULIO 14 DE 2022



DR. JORGE ISRAEL AYALA BERDÓN



DRA. BIBIANA CAROLINA MONTOYA LOAIZA



DRA. MELISSA PLASMAN



DR. ALEJANDRO ARIEL RÍOS CHELÉN



DRA. MARÍA LUISA RODRÍGUEZ MARTÍNEZ



**Universidad
Autónoma de
Tlaxcala**

CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
Coordinación de la División de Ciencias Biológicas
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado

COMITÉ ACADÉMICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sirva este medio para describir el proceso de revisión de la tesis realizada por la estudiante **VIANEY ZULEMA ALEJANDRO CÓRDOVA** titulada “¿La coloración feomelánica refleja los niveles de estrés oxidante en el individuo?” para optar por el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**.

El documento de la tesis de VIANEY ZULEMA ALEJANDRO CÓRDOVA fue revisado por mí y el Dr Lorenzo Pérez Rodríguez como directora y codirector de tesis, respectivamente. Una vez recibido el visto bueno, el documento procedió a ser revisado por los integrantes del comité tutorial y, posteriormente, por los respetables miembros del sínodo. El documento pasó por un proceso de revisión por profesores expertos en el área. En el mes de septiembre del año en curso, el documento fue analizado con el programa ‘Turnitin’ identificando solo <2 % de similitudes entre el texto con otros documentos. Este porcentaje de similitud corresponde a palabras o frases del lenguaje comúnmente usado por otras personas del área para describir métodos concretos, por lo tanto, no puede ser considerado plagio.

Por lo anterior, confirmo que la estudiante **NO INCURRIÓ EN NINGUNA PRÁCTICA NO DESEABLE** en la escritura de su tesis.

Sin más por el momento, me despido.

Tlaxcala, Tlax., a 6 de septiembre de 2022.

BIBIANA C. MONTOYA L.



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:
ISO 9001:2015-NMX-CC-9001-IMNC-2015



Agradecimientos.

- Agradezco al Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, UATx, por todo el apoyo brindando.
- Agradezco a CONACYT por la beca recibida (Clave 631359) y al Proyecto CONACyT Ciencia de Frontera – 490792.
- Agradezco a la Dra. Bibiana Montoya y al Dr. Lorenzo Rodríguez Pérez, por aceptarme para realizar esta tesis bajo su dirección. Por todo el esfuerzo, dedicación y paciencia que me han brindado a lo largo de este trayecto; quienes, con sus conocimientos, experiencia y su motivación, han logrado que pueda terminar mis estudios con éxito. De igual forma agradezco al Dr. Jorge Ayala y la Dra. Melissa Plasman por la participación en esta tesis, por todos sus consejos y sugerencias que no cabe duda de que lo han enriquecido.

Agradecimientos a título personal

Agradezco a mis padres por todo el apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de mi vida y por la motivación que me ha ayudado a no desistir en las metas que me he propuesto, los amo mucho.

Agradezco de manera muy especial a mi hermano Alejandro. Gracias por ser un generoso y un buen hermano conmigo, te amo.

Agradezco a todos mis compañeros de trabajo en especial a América, muchas gracias por todo el apoyo que me brindaste durante mi experimento. Muchas gracias, Chema y a todos los que han ayudado en este proyecto.

Resumen

La coloración en el plumaje de las aves desempeña un papel fundamental en la comunicación entre individuos ya que puede ser un indicador de la condición física o la calidad individual. Las melaninas son los pigmentos más extendidos en la mayoría de los animales. Estas se dividen en eumelaninas y feomelaninas, siendo las últimas las menos estudiadas en el contexto de la comunicación. La síntesis de feomelanina depende de la disponibilidad de cisteína en el organismo, un aminoácido que puede ser adquirido por el organismo por medio de la dieta y también es indispensable para la producción del antioxidante endógeno glutatión. La síntesis de feomelanina y de glutatión podrían competir por la cisteína disponible en el organismo. De ser esto cierto, se esperaría que cuando los niveles de estrés oxidante en el organismo sean altos, se privilegiara el uso de la cisteína para la producción del antioxidante glutatión en detrimento de su uso para la producción de feomelanina. De esta forma, las coloraciones feomelánicas serían más intensas cuando los niveles de estrés oxidante en el organismo fueran bajos y, de esta manera, podrían tener un valor señalizador del estado fisiológico de los individuos, en particular de los niveles de estrés oxidante presentes. En este estudio, se evaluó experimentalmente esta conexión hipotética entre estrés oxidante, síntesis de glutatión y coloración feomelánica. Usamos como modelo codornices japonesas (*Coturnix japonica*) macho, que muestran coloración feomelánica en el plumaje del pecho y las mejillas. Durante el crecimiento de nuevas plumas en estas zonas, los individuos fueron expuestos a uno de tres tratamientos: reto oxidante endógeno (LPS), reto oxidante exógeno (Paraquat) o control (Solución salina). Se encontró que, después de haber sido sometidos al tratamiento, los sujetos de los tres grupos presentaron una reducción en la intensidad de la coloración feomelánica del pecho y no presentaron cambios en la coloración de la mejilla. La magnitud de dichos cambios no difirió entre los tres grupos. Contrario a lo esperado: (i) no se observó un efecto del tratamiento en la proporción glutatión reducido:oxidado (GSH:GSSG), (ii) los niveles de lipoperoxidación fueron más bajos en los tres grupos después del tratamiento que antes del mismo, siendo mayor la disminución en los grupos expuestos al reto oxidante endógeno y exógeno, en comparación con el grupo control y, (iii) los niveles de cisteína plasmática fueron menores después del tratamiento que antes del mismo en los tres grupos. Los resultados sugieren que, en contra de lo predicho por la hipótesis propuesta, los cambios en el balance oxidante podrían no ser el mecanismo principal que subyace a la variación en las coloraciones feomelánicas.

Palabras clave: Estrés oxidante, feomelanina, glutatión, cisteína, señales coloridas.

ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN.....	1
2.ANTECEDENTES.....	3
3. HIPÓTESIS Y PREDICIONES.....	5
4. OBJETIVOS.....	5
4.1 Objetivo general.....	5
4.2. Objetivos particulares.....	5
5. METODOS.....	6
5.1 Animales y condiciones de alojamiento.....	6
5.2 Tratamientos.....	6
5.3 Estimación de estrés oxidante.....	8
5.4 Medición de cisteína.....	9
7. MEDIDAS DE COLOR.....	10
8. ANALISIS ESTADISTICOS.....	11
9. RESULTADOS.....	12
10. DISCUSIÓN.....	16
11. CONCLUSIÓN.....	19
12. REFERENCIAS.....	20
13. ANEXOS.....	24

Introducción

La mayoría de las interacciones entre los animales implican algún tipo de comunicación y las estructuras coloridas son unas de las características que a menudo juegan un papel relevante como señales comunicativas (Hill y McGraw 2006, Delhey y cols. 2010). Por ejemplo, en múltiples especies de aves, la coloración del plumaje de los machos se asocia con las preferencias femeninas en el contexto de la elección de pareja (Morrison y cols. 2014) o funcionan como señales de estatus en la competencia intra-sexual (Senar 2006). Los caracteres coloridos en el plumaje (i.e. parches en el pecho, flancos, baberos, colas, etc.) pueden proporcionar información relevante sobre rasgos del portador como su condición física, habilidad de forrajeo o estatus de dominancia, entre otros (Hill y McGraw 2006, Quesada 2007, López-Rull y Beamonte-Barrientos 2014). Estos rasgos de color podrían haber evolucionado como señales de calidad porque suponen un costo de producción y mantenimiento que solo los individuos de buena calidad se pueden permitir (Fon y Carazo 2009).

Las características coloridas en aves son producidas por el arreglo estructural del tejido, pigmentos dependientes de la dieta o pigmentos sintetizados por el propio organismo. De estos tres tipos de coloraciones, las dependientes de pigmentos dietarios, como los carotenoides, son las que más atención han recibido en el contexto de la comunicación animal (Hill y cols. 2006). No obstante, otros pigmentos sintetizados por el propio organismo, como las melaninas, son de los pigmentos principales que confieren el color a la piel, pelo y plumas de los vertebrados dando origen a coloraciones negro-marrón (Galván y Alonso-Álvarez 2009). Las melaninas presentan dos formas principales: eumelanina y feomelanina. La eumelanina es responsable de coloraciones negras-grises, mientras que, la feomelanina produce colores amarillo-marrón-rojizos (Galván y Solano 2016). La mayoría de los estudios sobre pigmentaciones melánicas de las plumas están enfocados en las coloraciones eumelánicas (McGraw 2006). Sin embargo, las coloraciones feomelánicas son igualmente abundantes y, a menudo, pueden generar rasgos llamativos con potencial de señalización. No obstante, aún se desconoce el mecanismo fisiológico que podría conectar las coloraciones feomelánicas con aspectos clave de la condición del individuo.

La producción de feomelanina depende de la presencia de cisteína, un aminoácido semi-esencial, este aminoácido tiende a agotarse durante la infancia o durante periodos de enfermedad o lesión (Lagunas 2004). Los organismos obtienen la cisteína en gran medida por medio de la dieta (Rodríguez y Galván 2019), aunque también pueden sintetizarla de manera endógena (Zurita

2017). De forma interesante, se ha encontrado que el exceso de cisteína en el organismo es tóxico y puede generar condiciones como la acidosis metabólica, adelgazamiento del cascarón del huevo (en organismos ovíparos) y deficiencias en el crecimiento (Galván y cols. 2019, Rodríguez y cols. 2019). Se ha sugerido que la producción de coloraciones feomelánicas puede ser ventajosa para los organismos, porque les podría ayudar a eliminar el exceso de cisteína circulante, evitando un posible efecto tóxico asociado a niveles altos de este aminoácido (Vina y cols. 1983a,b, Munday 1989, Ito y Wakamatsu 2011, Galván y cols. 2012). Por ejemplo, en un estudio realizado con *Sitta europaea*, encontraron que las aves suplementadas con cisteína produjeron coloraciones feomelánicas más intensas en plumas, pero no presentaron mayores indicadores de toxicidad (i.e. estrés oxidante), ni un efecto negativo en su condición física (Rodríguez y cols. 2019). Estos resultados son consistentes con la propuesta de que la síntesis de feomelanina permite ‘drenar’ el exceso de cisteína. No obstante, este proceso sería ventajoso solo cuando el organismo no se encuentra bajo condiciones que aumentan los niveles de estrés oxidante (Galván y cols. 2012, Galván y Alonso-Álvarez 2017, Rodríguez-Martínez y Galván 2019a,b, Galván y Sanz 2020).

El estrés oxidante es un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la capacidad de la maquinaria antioxidante para neutralizarlas (Finkel y Holbrook 2000). Cuando estas especies reactivas no logran ser neutralizadas de forma efectiva, pueden causar reacciones en cadena que generan daño a las biomoléculas (Finkel y Holbrook 2000, Huerta y cols. 2005, Monaghan y cols. 2009). Las especies reactivas de oxígeno son moléculas o átomos que contienen al menos un electrón no apareado, por lo que son en extremo reactivas y capaces de producir reacciones oxidantes (i.e. pérdida de electrones) con diversas moléculas orgánicas, mecanismo por el cual causan daño, a nivel de células y tejidos, provocando cambios funcionales (Huerta y cols. 2005). Sin embargo, las especies reactivas también juegan un papel importante en procesos como la señalización celular, la regulación del crecimiento, la apoptosis, la inducción de la respuesta mitogénica, la defensa contra agentes infecciosos y como moduladores de otras funciones celulares (Di-Meo y cols. 2016, Carvajal 2019). Las principales fuentes de estrés oxidante a nivel endógeno son la respiración celular y respuesta inmunitaria, mientras que, a nivel exógeno son la exposición a radiación ionizante, radiación ultravioleta, pesticidas y metales pesados (Schröder y Krutmann 2004, Huerta y cols. 2005, Avello y Suwalsky 2006).

Uno de los antioxidantes endógenos más importantes que participan en la reducción (i.e. ganancia de electrones) de especies reactivas de oxígeno es el glutatión (Wu y cols. 2004). Tanto

la producción de glutatión como la producción de feomelanina dependen de la cisteína disponible en el organismo, por lo que se ha propuesto que, la síntesis de estos dos compuestos compite por el uso de la cisteína. De ser esto cierto, se esperaría que, en condiciones de estrés oxidante, se privilegiara el uso de la cisteína para la síntesis del glutatión, por el papel clave que este juega en el mantenimiento del balance oxidante. Esto ocurriría en detrimento de otras funciones menos críticas para el organismo, como la producción de coloraciones feomelánicas (Galván y Alonso-Álvarez 2009, Galván y Moller 2013). De ser así, en condiciones de estrés oxidante, los organismos tenderían a desarrollar coloraciones feomelánicas menos intensas, por lo que dichas coloraciones acabarían funcionando como indicadores fiables de balance oxidante del individuo durante la formación del tegumento (la pluma, en el caso de las aves) (Galván y Sanz 2020).

Antecedentes

De forma consistente con la hipótesis de la existencia de un uso competitivo de la cisteína para la síntesis de glutatión versus feomelanina, en condiciones naturales se ha encontrado una correlación negativa entre la intensidad de la coloración feomelánica en plumas y los niveles de glutatión en plasma en polluelos de águila calzada (*Hieraaetus pennatus*) y de halcón de Eleonor (*Falco eleonora*) (Martínez-Espinosa 2019). Otros estudios, también de tipo correlacional, han mostrado que factores como el estrés oxidante de origen ambiental (i.e. derivado de la exposición a un alto riesgo de depredación) en polluelos del trepatroncos azul (*Sitta europaea*) se asocia con una menor intensidad en la coloración feomelánica en plumas y menores niveles de glutatión (Galván y Sanz 2020). Sin embargo, hasta la fecha, solo se han publicado tres estudios en los que se han evaluado estas ideas de forma experimental, dos de ellos en diamante mandarín (*Taeniopygia guttata*). En el primero de ellos, los investigadores buscaron disminuir la capacidad antioxidante, disminuyendo los niveles de glutatión por medio de la administración de butionina sulfoximina (un inhibidor específico de la síntesis de glutatión). Contrario a lo hipotetizado, la administración de butionina sulfoximina no disminuyó la capacidad antioxidante de los individuos; sin embargo, las aves tratadas con este compuesto sí presentaron coloraciones feomelánicas menos intensas (Rodríguez-Martínez y Galván 2019a). En el segundo estudio, se buscó inducir un estado de estrés oxidante por medio de la administración de herbicida Diquat. Sin embargo, el tratamiento experimental resultó, contrario a lo planeado, en un incremento de la capacidad antioxidante y de la coloración

feomelánica en plumas. El grupo experimental, tuvo mayor proporción de glutatión reducido:oxidado (GSH:GSSG) (i.e. menos estrés oxidativo) y menores niveles de malondihaldehído (MDA), un biomarcador de peroxidación lipídica (i.e. menor daño oxidante en lípidos) (Rodríguez-Martínez y Galván 2019b). Los resultados obtenidos por estos estudios no son consistentes entre sí y, por lo tanto, no proporcionan evidencia sólida en favor o en contra de la hipótesis propuesta. En el tercer estudio experimental publicado, hasta la fecha, se administró Diquat como agente oxidante a machos del gorrión común (*Passer domesticus*). En este estudio se observó una disminución en la intensidad de la coloración feomelánica en plumas. Sin embargo, el tratamiento no afectó los niveles de cisteína ni incrementó los niveles de estrés oxidante como se esperaba (Galván y Alonso-Álvarez 2017). Por lo tanto, la presente investigación evaluó si los desafíos al balance oxidante producen consistentemente una disminución en la coloración feomelánica en plumas, acompañada de mayores niveles de estrés oxidante y una menor disponibilidad de cisteína circulante.

La codorniz japonesa (*Coturnix japonica*) es un ave galliforme con dimorfismo sexual en el tamaño corporal y el color del plumaje. A diferencia de la hembra, el macho presenta un parche de coloración feomelánica en el plumaje de las mejillas y el pecho (Gluckman y Mundy 2017). La intensidad de la coloración del parche de la mejilla está asociada positivamente con las preferencias femeninas en un contexto de selección sexual (Hiyama y cols. 2018). Esto, sumado al hecho de que la codorniz japonesa es un modelo de laboratorio ampliamente usado, hace a esta especie un modelo ideal para evaluar la idea de que el estrés oxidante modula la intensidad de la producción de coloraciones feomelánicas en plumas.

Hipótesis

En condiciones que promueven un incremento en los niveles de estrés oxidante, existe un compromiso entre el uso de la cisteína disponible para la síntesis de glutatión y la producción de feomelanina, sacrificándose lo segundo en favor de lo primero, generando así una relación negativa entre los niveles de estrés oxidante durante el crecimiento de nuevas plumas y la intensidad de la coloración feomelánica del plumaje generado.

Predicciones

Si la hipótesis propuesta es correcta, se espera que, en comparación con los individuos del grupo control (no expuestos a condiciones prooxidantes), los individuos expuestos a un desafío oxidante durante la muda presentarán:

- 1) Plumas generadas con una coloración feomelánica menos intensa (más brillo total).
- 2) Niveles de la proporción glutatión reducido:oxidado (GSH:GSSG) más bajos.
- 3) Daño oxidante en lípidos (estimados a partir de la concentración de MDA, de acá en adelante ‘lipoperoxidación’) mayor.
- 4) Niveles de cisteína en plasma más bajos.

Objetivos

Objetivo general

Analizar un posible compromiso entre la síntesis de glutatión y de feomelanina en presencia de un incremento del estrés oxidante en el individuo.

Objetivos particulares

- Cuantificar la intensidad de la coloración feomelánica de las plumas desarrolladas por individuos en condiciones prooxidantes y en ausencia de estas.
- Cuantificar los niveles de GSH:GSSG, daño oxidante en lípidos y cisteína en sangre en individuos sometidos a condiciones prooxidantes y en ausencia de estas.
- Verificar la relación entre la intensidad de la coloración y los niveles de glutatión y cisteína.

Métodos

Sujetos y condiciones de alojamiento

En este estudio se incluyeron 64 codornices japonesas macho adultas (13 semanas de edad, peso 129.81 ± 2.66 gr) obtenidas en mayo de 2021 por medio de un proveedor comercial local, del Estado de México. Los individuos fueron alojados en el aviario, ubicado en el Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (CTBC), que cuenta con un área total de 5 x 8 m y cuatro espacios de alojamiento exterior techados (2.50 x 1.90 m cada uno). En cada espacio fueron instaladas dos baterías de jaulas con capacidad para 20 aves, alojadas individualmente en espacios de 50 x 29 x 20 cm (largo x ancho x alto). Las aves se mantuvieron expuestas a luz natural y se les suplementó con luz artificial cálida durante 14 horas al día (6:00 – 21:00 horas), con la finalidad mantenerlas en condiciones sexualmente activas. La temperatura ambiental promedio durante el experimento fue de 19 °C, y no difirió entre los diferentes espacios de alojamiento: Cuarto 1 (19.16 ± 0.06 °C) y cuarto 2 (18.44 ± 0.06 °C). Desde la llegada de las codornices al aviario hasta el inicio del experimento transcurrieron 4 meses en los que las aves fueron mantenidas con acceso *ad libitum* a agua y 30 gr diarios de alimento para codorniz (Purina® - Codor Reproductina HP, proteína 21 %, grasa 2%, calcio 3.40 %, fibra 5 % y extracto libre de nitrógeno 45), cantidad adecuada para el mantenimiento de las aves. Cada individuo fue identificado con una etiqueta numerada en la pata izquierda y recibió una dosis de la vacuna Newcastle (B1, MAVER) por vía ocular 20 días después de la llegada al aviario y 114 días antes del inicio del experimento, con la finalidad de prevenir la muerte de los individuos por esta enfermedad viral y altamente contagiosa.

Tratamientos

Los 64 machos adultos incluidos en el experimento fueron asignados de manera aleatoria a uno de tres grupos: control (n=21), reto oxidante endógeno (LPS, n=21), o reto oxidante exógeno (Paraquat, n=22). Los sujetos del grupo control fueron expuestos a 5 inyecciones intraperitoneales de 1 µL/kg de solución salina (PiSA). Los sujetos del grupo con reto oxidante endógeno recibieron 5 inyecciones intraperitoneales de 1 mg/kg de lipopolisacárido de membrana de *E. Coli* (LPS) (Sigma L2630-25MG) con el propósito de estimular la respuesta inmunitaria (Boever y cols. 2008, Bertani y Ruiz 2018), y en consecuencia, estrés oxidante (Crommenacker y cols. 2010, Costantini y cols. 2014, Huerta y cols. 2015). Finalmente, los sujetos que recibieron un reto oxidante exógeno

(Paraquat), fueron expuestos a 5 inyecciones intraperitoneales de 10 mg/kg de Paraquat (Dragocson® 1,10-dimetil-4,40 Dicloruro de biperidinio), un fertilizante de uso agrícola que genera estrés oxidante (Galvani y cols. 2000, Meitern y cols. 2013). Las dosis utilizadas se seleccionaron con base en un estudio piloto realizado y en concordancia con estudios previos que han mostrado efectos sobre los niveles de daño oxidante. En los tres grupos, las inyecciones intraperitoneales fueron administradas cada tercer día, iniciando el día 8 después de la extracción de las plumas y finalizando el día 16 (Fig. 1). Se seleccionó este intervalo para la aplicación de los tratamientos debido a que en un estudio piloto se encontró que la pigmentación de las barbas de la pluma empieza a ser detectable a partir del día 6 después de la extracción de la pluma (Ver Anexo).

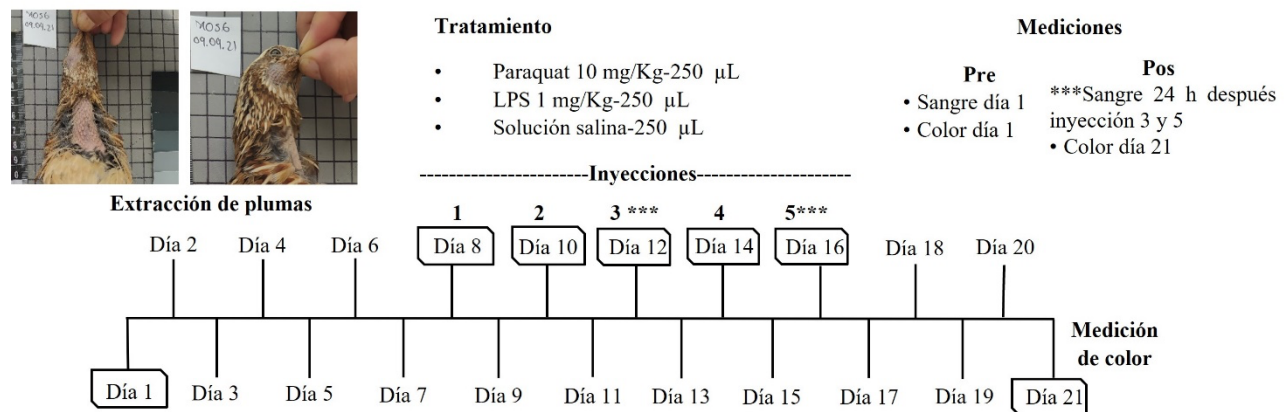


Figura 1. Cronograma de procedimientos realizados durante el experimento

El experimento inició con la medición del peso y color del plumaje de los individuos (ver abajo), al día siguiente se continuó con la extracción de las plumas de un área de 3 \times 4 cm aprox. del pecho (se midió el área con una cinta métrica de papel) y 1 \times 1 cm aprox. de la mejilla derecha (por debajo del ojo de cada individuo). Para cuantificar los niveles iniciales de cisteína, glutatión y lipoperoxidación, antes de la extracción de las plumas se tomó una muestra de 200 μ l de sangre de la vena braquial usando venipuntura y capilares heparinizados. La sangre se centrifugó a 10,000 \times g por 10 minutos para separar el plasma de las células rojas en tubos independientes, ambas fracciones se almacenaron a -80 $^{\circ}$ C hasta el momento de los análisis de laboratorio. Adicionalmente, se tomaron muestras de sangre de 200 μ l, 1 y 24 horas después de la aplicación de la tercera y quinta inyección intraperitoneal del tratamiento correspondiente a cada individuo.

El día 20 después de la extracción de las plumas (21 días después de la primera medición de color), cuando las nuevas plumas estaban completas (forma y tamaño), se tomó una segunda medición de coloración de plumaje del pecho y mejilla para evaluar el efecto del tratamiento. El peso de los individuos fue monitoreado diariamente con una balanza digital de precisión ($\pm 0.01\text{g}$). Adicionalmente, con el propósito de confirmar la presencia de una respuesta febril asociada a la inyección del LPS, 8 h después de la primera y la tercera inyección se tomó la temperatura corporal de todos los individuos por vía cloacal usando un termómetro digital de contacto (Fluke 52- II, 60HZ).

Estimación de estrés oxidante

Glutación. En la fracción de células rojas de las muestras de sangre colectadas se cuantificaron los niveles de glutación reducido (GSH) y oxidado (GSSG), para finalmente estimar la proporción GSH:GSSG. Una situación de estrés oxidante suele caracterizarse por un incremento de GSSG y/o una disminución de GSH, lo que se traduce en un descenso de la proporción GSH:GSSG, que puede usarse como un biomarcador de estrés oxidante (Rodríguez-Martínez y Galvan 2019a). Estos parámetros se analizaron utilizando un kit comercial (Sigma Aldrich, CAS 38185) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se pesó 1 mg de células rojas que fue diluido en 11 μL de agua desionizada, se agregaron 48 μL de ácido sulfosalicílico al 5% y se centrifugó a $8,000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C . Seguidamente, se agregaron 385 μL de agua desionizada a cada muestra. La muestra diluida se dividió en dos alícuotas de 200 μL , una para la medición de GSSG y otra para la de GSH. En el caso del GSSG, se agregó 4 μL de la solución de enmascaramiento a la muestra. En el caso de GSH, las muestras se analizaron en ausencia de la solución de enmascaramiento. La absorbancia de la reacción fue leída por duplicado a 405 nm utilizando un lector de microplacas Multiskan Fisher (Thermo Scientific). La concentración de GSSG en la muestra se determinó usando una curva de calibración de GSSG y la concentración de glutación total (GSH + GSSG) usando una curva de calibración de glutación. Los valores finales se expresan en nanogramos por miligramo. El coeficiente de variación (CV) intra-placa fue del 7.6 % en promedio y el CV entre placas de 5.9 % en promedio.

Lipoperoxidación. El daño oxidante en lípidos (lipoperoxidación) se evaluó determinando el nivel de malondialdehído (MDA) en plasma mediante el método del ácido tiobarbitúrico (es uno de los productos finales de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados en las células). Un aumento

de los radicales libres, al actuar sobre los lípidos de las membranas biológicas, provoca una sobreproducción de malondialdehído cuya concentración puede usarse como un biomarcador de daño oxidante (Gawel y cols. 2004). Para el análisis se tomó 100 μL de plasma, se agregó 100 μL de ácido tricloroacético (10 %, p/v) y se mezcló 3 veces por inversión. Se centrifugó $10,000 \times g$ durante 10 minutos a 4 $^{\circ}\text{C}$, se recuperó $\sim 170 \mu\text{L}$ de sobrenadante y se añadió 100 μL ácido tiobarbitúrico al 0.375 % con pH 4.2. Posteriormente, la curva patrón (diluciones preparadas usando un valor conocido de MDA - 1,1, 3,3-tetra-metoxipropano) y las muestras se llevaron a ebullición a 92 $^{\circ}\text{C}$ durante 45 minutos, finalizado el tiempo de incubación, las preparaciones se dejaron enfriar a -20 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos para detener la reacción. Para calcular la concentración de MDA ($\mu\text{M}/\text{mL}$), se determinó la absorbancia de cada muestra a 530 nm contra una curva patrón de MDA (1,1, 3,3-tetra-metoxipropano, Sigma-Aldrich) utilizando un lector de microplacas Multiskan Fisher (Thermo Scientific). El CV intra-placa fue del 2.9% en promedio y el CV entre placas de 1.4 % en promedio.

Medición de cisteína

Los niveles de cisteína se midieron en plasma mediante un kit comercial (Sigma-Aldrich, Mak255). Las muestras de plasma se centrifugaron a $10,000 \times g$ durante 5 minutos a 4 $^{\circ}\text{C}$ recuperando posteriormente el sobrenadante, se puso 5 μL de cada muestra y punto de la curva patrón en los pozos de la placa de ELISA y se agregaron 5 μL adicionales de buffer para llegar a un volumen de 10 μL . Se añadieron 200 μL master mix a cada pozo (193 μL de buffer + 5 μL de mix de enzimas I diluido en buffer + 1 μL de agente reductor + 1 μL de agente bloqueador). Se mezcló por pipeteo y se incubó la placa durante 30 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$. Al final de la incubación, se agregaron 30 μL de mix enzimas II, se mezcló por pipeteo y se incubó nuevamente por 5 minutos. Después de este segundo periodo de incubación, se añadieron 5 μL de buffer de prueba y se leyó la intensidad de la fluorescencia de la reacción mediante modo cinético durante 30 minutos (λ excitación = 365/ λ emisión = 450 nm) usando un lector de placas Synergy H1F (Biotek). Los niveles de cisteína se expresan como nmoles/ μL y el CV intra-placa fue del 35 % en promedio y el CV entre placas de 37 % en promedio.

Medición de color

El color del pecho y la mejilla de los individuos fue medido usando un espectrofotómetro portátil Minolta CM-2600d que proporciona datos de reflectancia mediante una lámpara xenón en un rango de 360 a 700 nm cada 10 nm. Se tomaron medidas de color de nueve puntos distribuidos a lo largo del parche ventral de los individuos para abarcar una mayor parte del área y tres medidas en la zona del parche de la mejilla. Las mediciones obtenidas para cada parche de color fueron promediadas y se usó este promedio para calcular el brillo total de cada área de plumaje (pecho y mejilla). El brillo total fue estimado como la sumatoria de la reflectancia obtenida cada 10 nm entre los 360-700 nm. Brillos totales más altos corresponden a coloraciones menos intensas (más blanquecinas), mientras que, brillos totales con valores más bajos corresponden a coloraciones feomelánicas más intensas (Fig. 2).

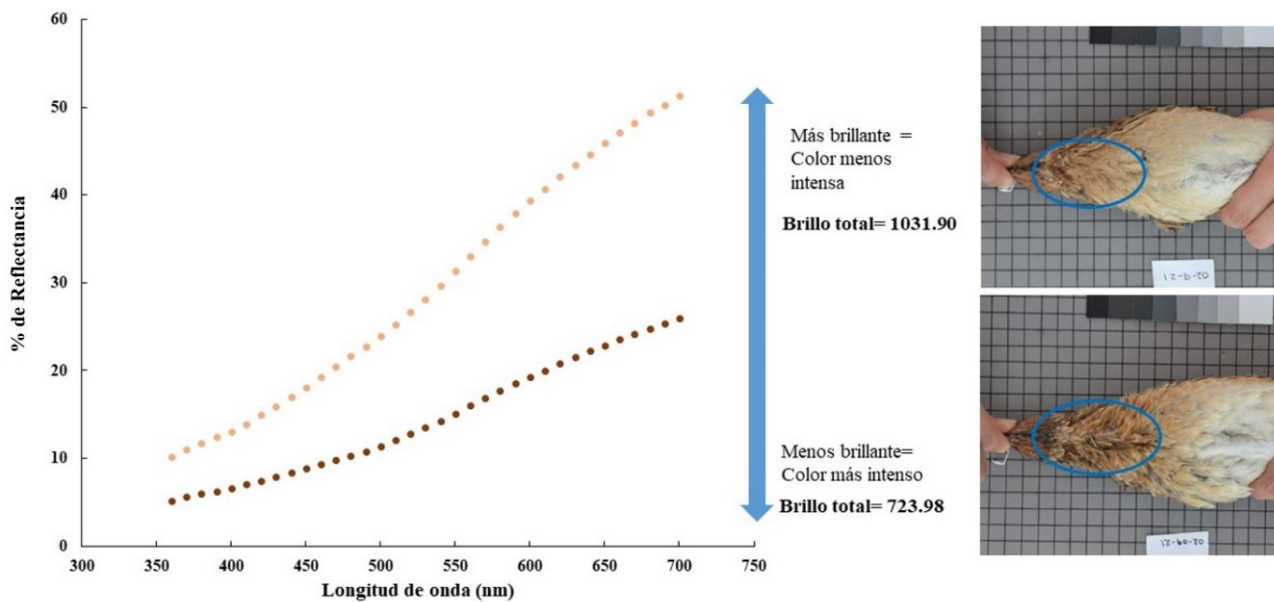


Figura 2. Coloración del parche del pecho en codornices japonesas macho. Los individuos más brillantes presentan coloraciones menos intensas (con menor concentración de feomelanina en la pluma) y viceversa.

Análisis estadísticos

El peso fue cuantificado antes de la primera inyección y 24 horas después de la aplicación de la tercera inyección, la temperatura se midió 8 horas después de la aplicación de la segunda inyección. Estas mediciones se realizaron para explorar si el tratamiento tenía algún efecto en estas variables. Los niveles de cisteína y lipoperoxidación en plasma, así como los de la proporción GSH:GSSG en eritrocitos, fueron cuantificados antes del experimento y 24 horas después de la tercera inyección. Adicionalmente, los niveles de lipoperoxidación en plasma también fueron medidos 24 horas después de la quinta inyección y fueron analizados en un modelo diferente al ajustado para evaluar el efecto sobre este biomarcador 24 horas después de la tercera inyección. Para evaluar el efecto del tratamiento sobre la intensidad de la coloración del plumaje, los biomarcadores de estrés oxidante, los niveles de cisteína, la temperatura corporal y el peso, se utilizaron modelos lineales mixtos donde se incluyó la variable respuesta de interés (coloración, biomarcadores de estrés oxidante, niveles de cisteína, temperatura corporal y peso, al inicio y al final del tratamiento), incluyendo como factores fijos el momento de medición (pre- o pos-tratamiento), tratamiento (control, LPS o Paraquat) y la interacción entre ambos factores. La identidad del individuo fue incluida como factor aleatorio en todos los modelos lineales mixtos mencionados para controlar por la no independencia de las medidas repetidas provenientes del mismo sujeto. Las variables niveles de GSH:GSSG, lipoperoxidación, y cisteína fueron transformadas a logaritmo 10 antes de los análisis estadísticos. Para verificar las diferencias significativas entre los grupos en los modelos de temperatura, lipoperoxidación y cisteína, se realizó un ensayo post-hoc HSD de Tukey, utilizando la paquetería “emmeans”.

Resultados

Peso y temperatura corporal

No se encontraron diferencias entre los grupos experimentales con respecto a la masa corporal pre-tratamiento versus pos-tratamiento (24 horas después de la aplicación de la tercera inyección) (Tabla 1). Sin embargo, el grupo inyectado con LPS presentó una mayor temperatura corporal 8 horas después de la segunda inyección ($P=0.021$), en comparación con los sujetos de los otros dos grupos ($P=0.0974$) (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto del tratamiento (control, LPS y Paraquat) sobre el peso 24 horas después de la tercera inyección y la temperatura 8 horas después de la aplicación de la segunda inyección, en codornices japonesas macho.

	Peso			Temperatura		
	F	GL	P	F	GL	P
Tiempo	0.404	46	0.528	24.29	52	< 0.001
Tratamiento	0.293	46	0.747	1.01	52	0.450
Tiempo × tratamiento	1.296	46	0.283	0.677	52	0.341

*GL = grados de libertad.

Coloración

En los individuos de todos los grupos, se observó un incremento significativo en el brillo total del plumaje del pecho al final del experimento con respecto a las medidas iniciales (Tabla 2). Sin embargo, la magnitud de este incremento no difirió entre los tres grupos experimentales (interacción tiempo × tratamiento no significativa; Tabla 2, Fig. 3). En cuanto al brillo de la mejilla, no se observaron efectos asociados al tratamiento, al tiempo de la medición o a la interacción entre estos dos factores (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto del tratamiento (control, LPS y Paraquat) sobre el brillo del plumaje del pecho y la mejilla de codornices japonesas macho, medidas antes de iniciar el experimento y 20 días después del inicio, una vez que las plumas habían vuelto a crecer bajo la influencia de los tratamientos experimentales.

	Pecho			Mejilla		
	F	GL	P	F	GL	P
Tiempo	91.83	54.24	< 0.001	0.211	61.18	0.647
Tratamiento	0.256	96.90	0.774	0.149	72.88	0.861
Tiempo × tratamiento	1.730	59.20	0.185	0.080	61.14	0.910

*GL = grados de libertad.

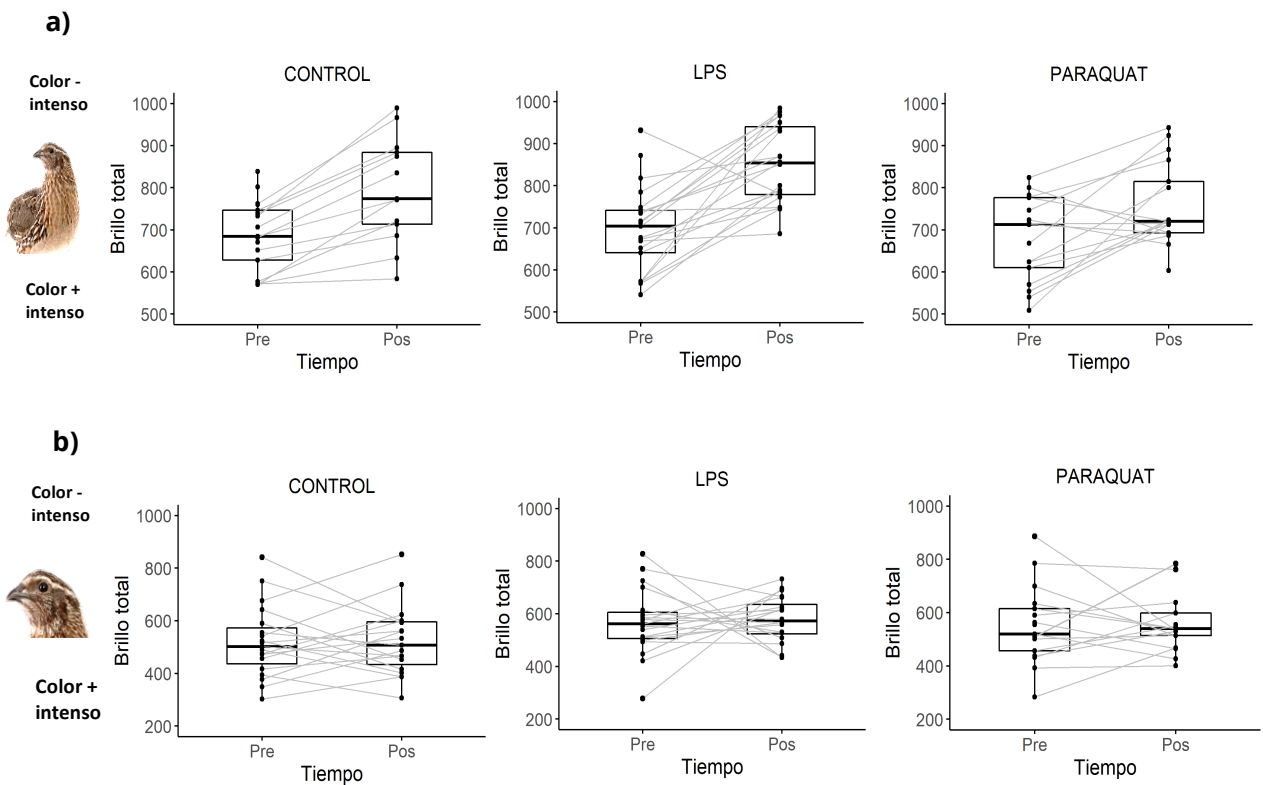


Figura 3. Efecto del tratamiento sobre el brillo total del pecho (a) y mejilla (b) de machos de codorniz japonesa expuestos a inyecciones intra-peritoneales de solución salina (control), LPS o Paraquat. El color fue medido pre- (en las plumas antes de ser extraídas) y pos-tratamiento (20 días después de la extracción – 5 días después de la última inyección). Valores más altos de brillo total indican una coloración feomelánica menos intensa. Las cajas representan el rango intercuartil, los puntos negros representan a cada individuo, la línea media representa la mediana, las líneas grises indican el cambio del brillo total para cada individuo pre- y pos-tratamiento.

Glutión

No se encontraron efectos del tratamiento sobre la proporción GSH: GSSG (Tabla 3, Fig.4).

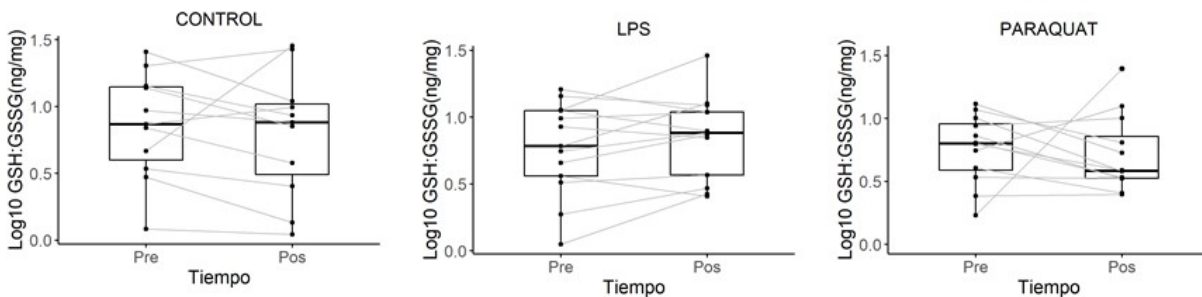


Figura 4. Cambio de la proporción GSH: GSSG para cada grupo experimental (control, LPS y Paraquat). Las cajas representan el rango intercuartil, los puntos negros representan a cada individuo, la línea media representa la mediana, las líneas grises indican el cambio en la concentración GSH: GSSG para cada individuo pre- y pos-tratamiento (24 horas después de la 3ra inyección), los datos fueron transformados a log10 para los análisis estadísticos.

Liperoxidación

No se observaron diferencias asociadas al tratamiento o a la interacción tiempo \times tratamiento, 24 horas después de la tercera inyección. Sin embargo, el tratamiento experimental produjo una disminución de los niveles de liperoxidación pos-tratamiento, 24 horas después de la quinta inyección en todos los grupos (control, LPS y Paraquat), en comparación con los individuos del grupo control, además no hubo disminución significativa entre los grupos control-LPS ($P=0.490$, $Df=33$) y Control-PRQ ($P=0.166$, $Df=33$) y LPS-PRQ ($P=0.698$, $Df=33$) (Fig. 5, Tabla 3).

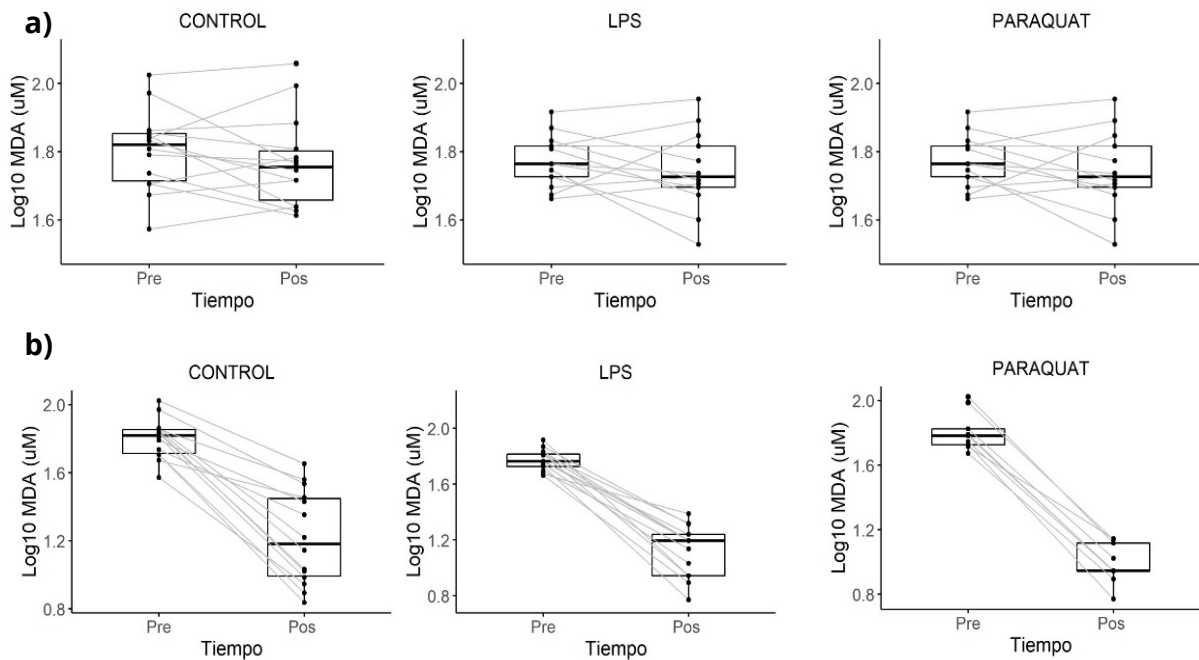


Figura 5. Cambios en los niveles de liperoxidación 24 horas después de la 3ra (a) y 5ta inyección (b), para cada grupo experimental (control, LPS y Paraquat). Las cajas representan el rango intercuartil, los puntos negros representan a cada individuo, la línea media representa la mediana, las líneas grises indican el cambio de los niveles de liperoxidación para cada individuo pre- y pos-tratamiento, los datos fueron transformados a \log_{10} para los análisis estadísticos.

Cisteína

El tratamiento experimental produjo una disminución de los niveles de cisteína pos-tratamiento (24 horas después de la aplicación de la tercera inyección) en todos los grupos (control, LPS y Paraquat), en comparación con los niveles pre-tratamiento. No se observaron diferencias asociadas a la interacción tiempo \times tratamiento. Además, no hubo disminución significativa entre los grupos

control-LPS ($P= 0.998$, $Df=28$) y Control-PRQ ($P=0.308$, $Df=28$) y LPS-PRQ ($P=0.256$, $Df=28$), (Tabla 3; Fig. 6).

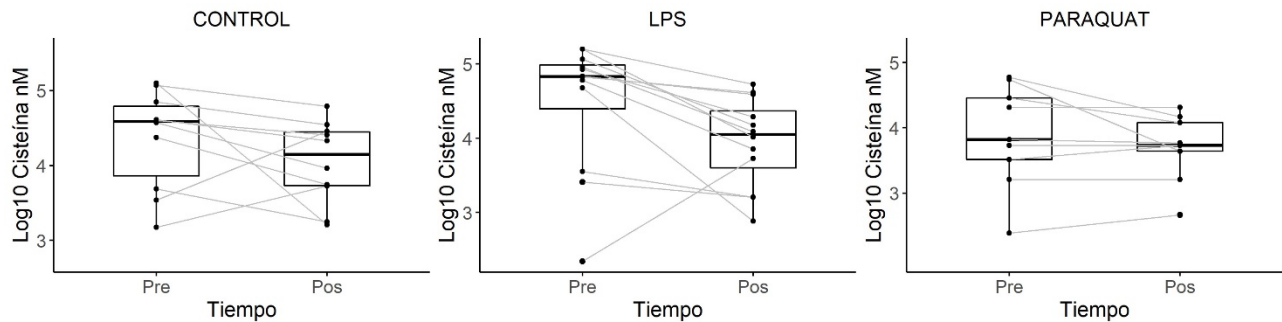


Figura 6. Cambios en los niveles de cisteína por tratamiento (24 horas después de la 3ra inyección), para cada grupo experimental (control, LPS y Paraquat). Las cajas representan el rango intercuartil, los puntos negros representan a cada individuo, la línea media representa la mediana, las líneas grises indican el cambio de los niveles de cisteína para cada individuo pre y pos-tratamiento, los datos fueron transformados a log10 para los análisis estadísticos.

Tabla 3. Resultados de modelos lineales mixtos para el efecto del tratamiento (control, LPS y Paraquat) sobre los niveles de glutatión, lipoperoxidación y cisteína en codornices japonesas macho. La variable tiempo corresponde al momento en que la muestra fue tomada: antes de empezar el experimento o 24 horas después de la aplicación de la tercera o quinta inyección (según sea el caso). Los efectos estadísticamente significativos ($P < 0.05$) se indican en negrita.

	GSH: GSSG			Lipoperoxidación						Cisteína		
	24 horas después de la 3ra inyección			24 horas después de la 3ra inyección			24 horas después de la 5ta inyección			24 horas después de la 3ra inyección		
	<i>F</i>	<i>GL</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>GL</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>GL</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>GL</i>	<i>P</i>
Tiempo	0.230	30.45	0.634	1.457	33	0.235	4.328	33	< 0.001	7.797	28	0.009
Tratamiento	1.435	45.65	0.248	0.564	33	0.574	1.804	33	0.180	1.569	28	0.225
Tratamiento × tiempo	1.513	29.83	0.236	0.196	33	0.822	4.033	33	0.027	0.7151	28	0.497

Discusión

El objetivo de este estudio fue analizar un posible compromiso entre la síntesis de glutatión y feomelanina en presencia de un incremento en los niveles de estrés oxidante en el individuo. Para cumplir con este objetivo, se realizó una manipulación experimental en la que se expuso a los individuos a inyecciones intra-peritoneales de solución salina (control), LPS (reto oxidante endógeno) o Paraquat (reto oxidante exógeno). Se encontró que los sujetos de los tres grupos (control, LPS y Paraquat) disminuyeron por igual la intensidad en la coloración del plumaje del pecho después del tratamiento (incremento del brillo total), lo que indica que la administración de un reto oxidante (endógeno o exógeno) no tiene un efecto sobre la coloración del plumaje generado. Esto sugiere que, en contra de lo propuesto, el estrés oxidante no juega un papel fundamental en la producción de coloraciones feomelánicas. Mientras que en el caso de la coloración del pecho se observó una disminución general del color del plumaje en todos los grupos a lo largo del experimento, la intensidad de la coloración de la mejilla no varió en ninguno de los grupos a lo largo del estudio. En esta especie, la coloración en la mejilla de los machos es un rasgo que juega un papel importante durante la elección femenina, ya que las hembras prefieren aparearse con machos que presentan coloraciones más intensas en esa región (Hiyama y cols. 2018). Esto podría sugerir que los machos pudieron haber regulado la disposición de feomelanina, asignando de manera estratégica sus recursos para mantener la coloración de la mejilla inalterada.

Existen tres estudios previos que han puesto a prueba, de forma experimental y con una aproximación similar a la planteada en este trabajo, la misma hipótesis evaluada en este estudio, dos realizados en el diamante mandarín y otro realizado en el gorrión común. En el primero de ellos, la exposición a una sustancia no tóxica (butionina sulfoximina) que inhibe la síntesis de glutatión, provocó una disminución de la coloración feomelánica de las plumas generadas durante el experimento, conforme a lo predicho. Sin embargo, no se detectaron cambios en los marcadores de estrés oxidante en respuesta al tratamiento experimental en el diamante mandarín (Rodríguez-Martínez y Galván 2019a). En el segundo estudio experimental con diamante mandarín, se manipuló el estrés oxidante de las aves mediante la administración de Diquat (un pro-oxidante similar al Paraquat usado en nuestro trabajo). Ese estudio encontró un incremento -en lugar de la esperada disminución- tanto en la coloración feomelánica de las plumas como en la capacidad antioxidante (Rodríguez-Martínez y Galván 2019b). Finalmente, en el tercer estudio con gorrión común, al administrar Diquat como agente oxidante, conforme a lo esperado, se observó un efecto

negativo sobre la intensidad de la coloración feomelánica en plumas. Sin embargo, no se encontraron diferencias en los niveles de cisteína después del tratamiento entre los sujetos tratados con Diquat o vehículo, ni el incremento esperado en los niveles de estrés oxidante (Galván y Alonso-Álvarez 2017). Estos resultados dispares, unidos a la ausencia de efecto de nuestra manipulación experimental, muestran un panorama general poco concluyente, que no presenta un respaldo claro a la conexión hipotética entre coloración feomelánica y estrés oxidante propuesta.

En este trabajo se esperaba que los niveles de la proporción GSH:GSSG en los grupos expuestos a LPS y Paraquat fueran menores después del tratamiento (es decir, mayor estrés oxidante) en comparación con los niveles iniciales y los sujetos del grupo control. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre los grupos experimentales ni entre los momentos de medición (antes versus después del tratamiento). Además, se esperaba que el daño oxidante en lípidos fuera mayor en los grupos LPS y Paraquat. Sin embargo, los tres grupos presentaron una reducción en los niveles de lipoperoxidación 24 horas después de la quinta inyección (i.e. presentaron un menor daño en lípidos), esta disminución fue mayor en los grupos inyectados con LPS y Paraquat, en comparación con el grupo control. También se predijo que los niveles de cisteína serían menores en los sujetos tratados con LPS y Paraquat en comparación con los sujetos control. Sin embargo, se observó una disminución en los niveles de cisteína en los sujetos de los tres grupos, lo cual indica que pudieron utilizar este recurso a una vía diferente de la protección antioxidante. Estos resultados, sugieren que los tratamientos con LPS y Paraquat no causaron el incremento esperado en el estrés oxidante en comparación con el tratamiento control. Sin embargo, hay evidencia que no respalda esta conclusión. Por un lado, el tratamiento con LPS desencadenó una respuesta febril en las aves del experimento, que indica que la respuesta inmunológica pretendida tuvo lugar efectivamente (Maloney y Gray 1998, Boever y cols. 2008). Estudios previos en aves han mostrado que dosis de 1 mg/kg de LPS se traduce en una respuesta febril de fase aguda que implica un aumento en el estrés oxidante (Han 2020). Por otro lado, en cuanto al Paraquat, dosis idénticas a las aplicadas en este estudio y en la misma especie, han mostrado efectos significativos sobre el daño oxidante de los individuos, usando como biomarcador los niveles de lipoperoxidación, GSH, GSSG y GSH:GSSG (Galvani y cols. 2000). La aparente ausencia de efectos de la manipulación experimental sobre los biomarcadores seleccionados podría deberse a una capacidad limitada de estos para reflejar eficazmente y de forma global un proceso fisiológico complejo como el estrés oxidante. Por ejemplo, estudios experimentales en aves, muestran que la administración de dosis

muy altas (cercas a la DL50) de sustancias similares al Paraquat, no siempre se traducen en cambios detectables en los biomarcadores de estrés oxidante, pese al incremento en la mortalidad (Meitern y cols. 2013). Es importante resaltar que, en los trabajos experimentales anteriormente mencionados, que pusieron a prueba esta hipótesis en diamantes mandarines y gorriones, no siempre se encontraron los efectos esperados en los marcadores de estrés oxidante utilizados. Por ejemplo, el tratamiento con butionina sulfoximina no cambió la proporción GSH:GSSG ni los niveles de MDA a pesar de disminuir la coloración feomelánica (Rodríguez-Martínez y Galván 2019a) y el tratamiento con el agente prooxidante Diquat incrementó, en lugar de disminuir, la proporción GSH:GSSG sin alterar los niveles de MDA, pero aumentando la coloración feomelánica (Galván y Alonso-Álvarez 2017; Rodríguez-Martínez y Galván 2019b). También es posible que el estrés oxidante generado por los tratamientos utilizados no se reflejara en el plasma o los eritrocitos, sino en otros tejidos del organismo no analizados en este estudio; como el hígado o los pulmones (Hoffman 2002, Simitzis y cols. 2012, Henry y cols. 2015, Han 2020). Por todo ello, es razonable pensar que los tratamientos sí supusieron un desafío oxidante para las aves, que no fue detectado debido a los biomarcadores usados, el sustrato biológico en el que se hizo el análisis o el momento con respecto al tratamiento en el que fueron tomadas las muestras.

Pese a la ausencia de efecto de nuestro tratamiento sobre la coloración, resulta interesante analizar el patrón de respuesta global, en todos los parámetros medidos, presentado por los sujetos de los tres grupos. Entre el inicio del estudio y el final de este, las aves experimentaron un descenso en los niveles de cisteína en plasma (Fig. 6), y las plumas que regeneraron durante el experimento mostraron coloraciones feomelánicas en el pecho más pobres que las que tenían al inicio de este (Fig. 3). Estas tendencias son, parcialmente consistentes con lo predicho. Sin embargo, si el factor detonante de estos cambios fuera el estrés oxidante, como propone la hipótesis estudiada, se debió haber encontrado un incremento concomitante en los niveles de lipoperoxidación al final del experimento en comparación con los niveles iniciales y una disminución en la proporción GSH:GSSG. Sin embargo, se encontró una notable disminución en los niveles de lipoperoxidación (Fig. 5) y una ausencia de diferencias detectables en la proporción GSH:GSSG (Fig. 4). Todo ello sugiere que la conexión fisiológica entre cisteína y feomelanina propuesta podría ser cierta, pero el estrés oxidante podría no necesariamente jugar un papel clave como mediador en esta relación. Se requieren, por tanto, más estudios que exploren los factores que pueden causar estas covariaciones (por ejemplo, riqueza de cisteína en la dieta o activación de procesos fisiológicos que impliquen de

alguna manera a este aminoácido), y que permitan establecer conexiones con la calidad o la condición individual para poder determinar el potencial de las coloraciones feomelánicas como señales de condición.

Conclusión

El estrés oxidante puede no estar vinculado directamente con la existencia de un compromiso entre la síntesis de glutatión y feomelanina, por lo cual las coloraciones feomelánicas podrían no reflejar condiciones pro-oxidantes en el organismo.

Referencias

- Bertani B, Ruiz N. 2018. Function and biogenesis of lipopolysaccharides. *EcoSal Plus* 8(1):1-33.
- Boever DS, Beyaert R, Vandemaele F, Baert K, Duchateau L, Goddeeris B, De BP, Croubels S. 2008. The influence of age and repeated lipopolysaccharide administration on body temperature and the concentration of interleukin-6 and IgM antibodies against lipopolysaccharide in broiler chickens. *Avian Pathol* 37(1): 39-44.
- Carvajal, C. 2019. Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Med Leg de Costa Rica* 36(1): 91-100.
- Costantini D, Greives TJ, Hau M, Partecke J. 2014. Does urban life change blood oxidative status in birds? *J Exp Biol* 217 (17): 2994–2997.
- Crommenacker JV, Horrocks NPC, Versteegh MA, Jan K, Tieleman BI, Matson KD. 2010. Effects of immune supplementation and immune challenge on oxidative status and physiology in a model bird: implications for ecologists. *J Exp Biol* 213 (20): 3527–3535.
- Delhey K, Burger C, Fiedler W, Peters A. 2010. Seasonal changes in colour: a comparison of structural, melanin- and carotenoid-based plumage colours. *PloS one* 5(7): e11582.
- Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Manuel V. 2016. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid Med Cell Longev* 2016: 44.
- Ito S, Wakamatsu K. 2011, Human hair melanins: what we have learned and have not learned from mouse coat color pigmentation. *Pigment Cell & Melanoma Research* 24: 63-74
- Finkel T, Holbrook NJ. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. *Nature* 408: 239–247.
- Fon E, Carazo P. 2009. La Evolución de la Comunicación Animal. *Adaptación y Evolución*, 150 años después del Origen de las Especies. pp.1-6.
- Galvani P, Cassani A, Fumagalli P et al. 2000. Effect of Paraquat on Glutathione Activity in Japanese Quail. *Bull Environ Contam Toxicol* 64: 74–80.
- Galván I, Alonso-Álvarez C. 2009. The expression of melanin-based plumage is separately modulated by exogenous oxidative stress and a melanocortin. *Proc R Soc B* 276: 3089–3097.
- Galván I, Erritzøe J, Wakamatsu K, Møller AP. 2012. High prevalence of cataracts in birds with pheomelanin-based colouration. *Comp Biochem Physiol* 162: 259–264.
- Galván I, Moller AP. 2013. Pheomelanin-based plumage coloration predicts survival rates in birds. *Physiol Biochem Zool* 86(2): 84-192.

- Galván I, Solano F. 2016. Bird integumentary melanins: biosynthesis, forms, function and evolution. *En t. J. Mol. Sci* 17: 520.
- Galván I y Alonso-Álvarez C. 2017. Individual quality via sensitivity to cysteine availability in a melanin-based honest signaling system. *J of Exp Biol* 2017 220: 2825-2833.
- Galván I, Jorge A, Nielsen JT. 2019. Pheomelanin synthesis varies with protein food abundance in developing goshawks. *J Comp Physiol B* 189: 441–450.
- Galván I, Sanz JJ. 2020. Differential influence of *Slc7a11* expression and body condition on pheomelanin-based pigmentation in two Eurasian nuthatch *Sitta europaea* populations with different predation risk. *J Avian Biol* 51: e02275.
- Gawel S, Wardas M, Niedworok E, Wardas P. 2004. Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiadomosci lekarskie* 57(9-10): 453-455.
- Gluckman TL, Mundy NI. 2017. The differential expression of MC1R regulators in dorsal and ventral quail plumages during embryogenesis: Implications for plumage pattern formation. *PloS One* 12(3): e0174714.
- Han H, Zhang J, Chen Y, Shen M, Yan E, Wei C, Wang T. 2020. Dietary taurine supplementation attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses and oxidative stress of broiler chickens at an early age. *J of Anim Sci* 98(10): 1093.
- Henry KA, Cristol DA, Varian-Ramos CW. Et al. 2015. Oxidative stress in songbirds exposed to dietary methylmercury. *Ecotoxicology* 24: 520–526.
- Hill GE, McGraw KJ. 2006. Bird coloration vol. I: mechanisms and measurements. Cambridge, MA: Harvard Univ Press 2006: 507–560.
- Hiyama G, Mizushima S, Matsuzaki M, Tobar Y, Choi JH, Ono T, Tsudzuki M, Makino S, Tamiya G, Tsukahara N, Sugita S, Sasanami T. 2018. Female Japanese quail visually differentiate testosterone-dependent male attractiveness for mating preferences. *Sci Rep* 8(1): 10012.
- Hoffman JD. 2002. Role of selenium toxicity and oxidative stress in aquatic birds. *Aquat Toxicol* 57(1-2):11-26.
- Huerta JM, Ortega CME, Cobos PMG, Herrera HJ, Díaz-Cruz A, y Guinzberg PR. 2005. Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en animales domésticos. *Interciencia* 30(12): 728-734.
- Lagunas MVH. 2004. Estudio paramétrico para la producción de la melanina en *Escherichia coli* recombinante. Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico de Celaya, Guanajuato.

- López-Rull I, Beamonte-Barrientos R. 2014. Cortejo: mecanismos y función adaptativa. Martínez-Gómez M, Lucio RA y Rodríguez-Antolín J. *Biología del Comportamiento: aportaciones desde la fisiología* 1: 103-113.
- Maloney SK, Gray DA. 1998. Characteristics of the febrile response in Pekin ducks. *J Comp Physiol B* 168(3):177–182.
- Martínez-Espinosa R. 2019. Glutathión: papel biológico y efectos en las aves.98. 47-53. Recuperado de:https://www.researchgate.net/publication/338612330_Glutathion_papel_biologico_y_efectos_en_las_aves
- Mcgraw KJ. 2006. Mechanics of melanin- based coloration. And Hill GE y McGraw KJ. 2006. *Bird coloration vol. I: mechanisms and measurements*. Cambridge, MA: Harvard Univ Press 2006: 507–560.
- Meitern R, Sild E, Kilk K, Porosk R, Horak P. 2013. On the methodological limitations of detecting oxidative stress: effects of paraquat on measures of oxidative status in greenfinches. *J Exp Biol* 216: 2713–2721.
- Monaghan P, Metcalfe NB, Torres R. 2009. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecol Lett* 12(1):75-92.
- Morrison A, Flood N J, Reudink M W. 2014. Reproductive correlates of plumage coloration of female Mountain Bluebirds. *J. Field Ornithol* 85: 168-179.
- Munday R. 1989. Toxicity of thiols and disulphides: Involvement of free-radical species. *Free Radical Biol and Med* 7(6): 659-673.
- Quesada J. 2007. Evolución de la coloración del plumaje basada en señales múltiples. Tesis de Doctorado. Universidad de Barcelona.
- Rodríguez-Martínez S, Galván I. 2019a. Exposure to a competitive social environment activates an epigenetic mechanism that limits pheomelanin synthesis in zebra finches. *Mol Ecol* 28(16): 3698-3708.
- Rodríguez-Martínez S, Márquez R, Inácio Â, Galván I. 2019. Changes in melanocyte RNA and DNA methylation favour pheomelanin synthesis and may avoid systemic oxidative stress after dietary cysteine supplementation in birds. *Mol Ecol* 28: 1030- 1042.
- Rodríguez-Martínez S, Galván I. 2019b. A source of exogenous oxidative stress improves oxidative status and favors pheomelanin synthesis in zebra finches. *Comp Biochem Physiol C Tox Phar* 228: 108667.

- Senar JC. 2006. Color displays as intrasexual signals of aggression. En Hill GE, McGraw KJ y Kevin J. (Eds.). Bird coloration: function and evolution (Vol. 2). Harvard university press.
- Simitzis PE, Kalogeraki E, Goliomytis M, Charismiadou MA, Triantaphyllopoulos K, Ayoutanti A, Niforou K, Hager-Theodorides AL, Deligeorgis SG. 2012. Impact of stocking density on broiler growth performance, meat characteristics, behavioural components and indicators of physiological and oxidative stress. *Br Poult Sci* 53(6): 721-730.
- Vina J, Romero FJ, Saez GT, Pallardó FV. 1983a. Effects of cysteine and N-acetyl cysteine on GSH content of brain of adult rats. *Experientia* 39(2):164-165.
- Vina J, Saez GT, Wiggins D, Roberts AFC, Hems R, Krebs HA. 1983b. The effect of cysteine oxidation on isolated hepatocytes. *Bioch J.* 212(1): 39-44.
- Uhart M, Zaccagnini ME. 1999. Manual de procedimientos operativos estandarizados de campo para documentar incidentes de mortandad de fauna silvestre en agroecosistemas. Ediciones INTA, Buenos Aires, Argentina.
- Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 134: 489-492.

ANEXOS

Estudio Piloto 1: Crecimiento de plumas e inyección de LPS

El estudio piloto se realizó con el objetivo de: 1) determinar la tasa de crecimiento de las plumas con el fin de estimar el momento óptimo de aplicación de los tratamientos para alterar el estado oxidante de los individuos y 2) verificar el efecto del reto inmunitario sobre la temperatura corporal y los niveles de glutatión en células rojas. Para esto se empleó un total de 8 individuos macho adultos de 7 semanas de edad, con un peso promedio de 183.9 ± 2.6 gr. Se seleccionaron aleatoriamente 4 individuos controles y 4 experimentales.

Para alcanzar el primer objetivo, se extrajeron las plumas del pecho de todos los individuos en un área aproximada de 2×3 cm (ancho \times largo) y se midió de forma diaria la longitud de las plumas en crecimiento hasta el día 19 posterior al procedimiento de extracción, cuando el parche estaba completamente formado.

Para cumplir con el segundo objetivo, los individuos experimentales fueron inyectados intraperitonealmente con 1 mg/kg de Lipopolisacárido (LPS, fracción de la pared celular de bacterias Gram-negativas; Sigma L2630), que previamente ha mostrado inducir estrés oxidante (Boever y cols. 2008). Los individuos del grupo control fueron inyectados únicamente con 250 μ L de vehículo, solución salina. Todos los sujetos recibieron dos inyecciones, iniciando un día después de la extracción de las plumas, las inyecciones estuvieron separadas por 5 días.

Después de cada inyección se registró la temperatura de los individuos cada 2 horas por un periodo de 12 horas, con el objetivo de evaluar la respuesta febril producida por el LPS (Johnson y cols. 1993, Maloney y Gray 1998, Liu y cols. 2014). Después de la primera inyección, se registró la temperatura corporal superficial usando una cámara termográfica infrarroja (Fukle TiR110 Thermal Imager). Después de la segunda inyección, se registró la temperatura corporal interna, vía cloacal, usando un termómetro digital de contacto (Fluke 52- II, 60HZ).

Se tomaron muestras de sangre de 200 μ L mediante punción de la vena braquial del ala izquierda con agujas de 25G y tubos capilares heparinizados (Uhart y Zaccagnini 1999). Este procedimiento se realizó 24 horas después de la segunda inyección. El día antes de la extracción de las plumas y a partir del día 2 después de esta, se tomaron diariamente fotografías ventrales a cada individuo para documentar la tasa de crecimiento de las plumas (Fig. A1).

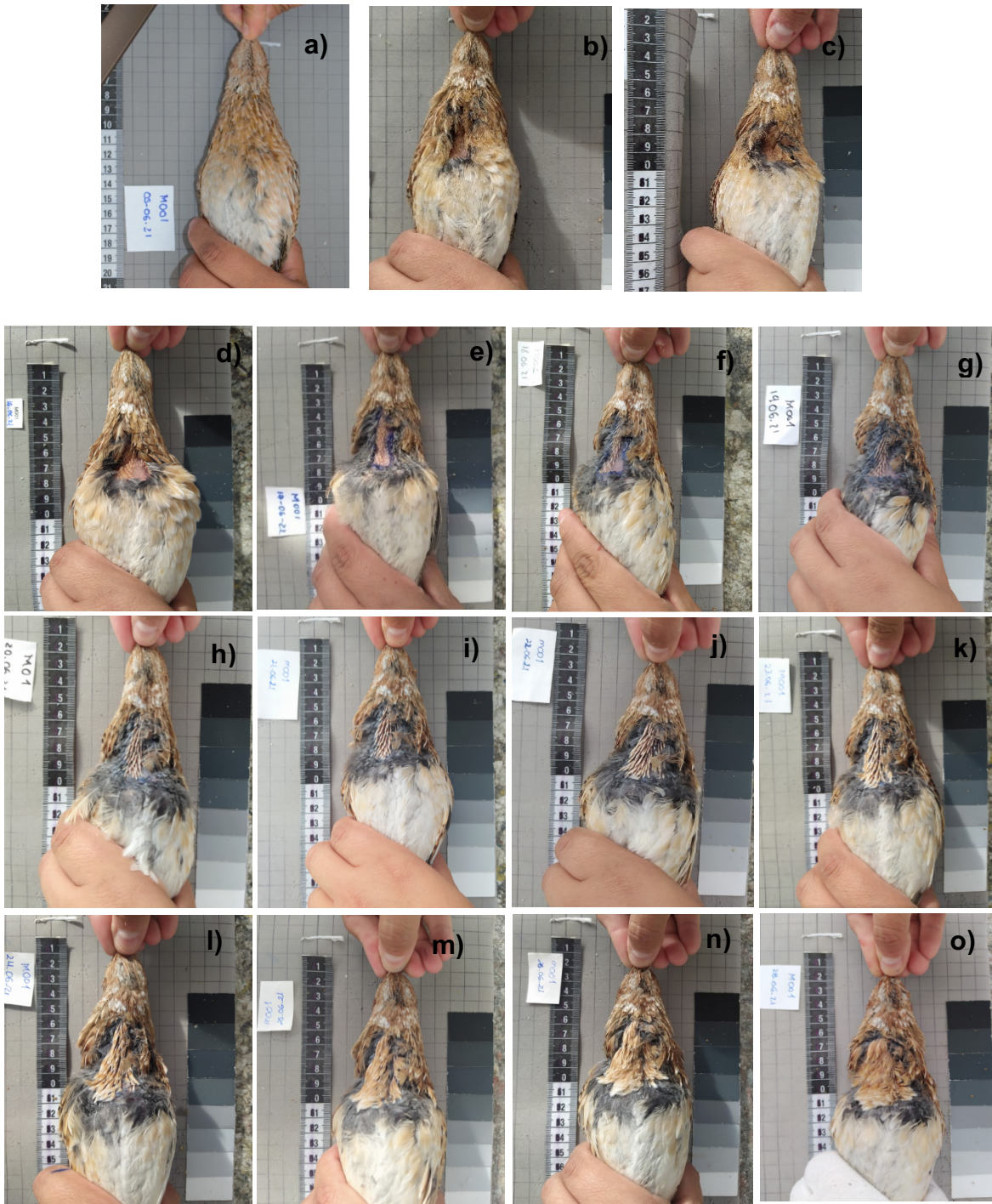


Figura A1. Crecimiento de la pluma. El panel a muestra el plumaje del pecho antes de remover las plumas para dar inicio al experimento. Los paneles b – o presentan fotografías tomadas de forma diaria para documentar el crecimiento de la pluma iniciando dos días después del procedimiento de extracción de las plumas.

Medición de glutatión.

La proporción de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) en eritrocitos se analizó utilizando un kit comercial (Sigma 38185), siguiendo las instrucciones del fabricante (para más detalles ver sección de métodos en el texto principal).

Análisis estadístico

Estudios previos han reportado que la administración intraperitoneal de LPS produce un pico de temperatura corporal se registra a las entre las 8 y 10 horas posteriores a cada inyección (Boever y cols. 2008), por lo cual, se analizó la diferencia de la temperatura corporal de los sujetos experimentales y controles a las 8 y 10 horas después de cada inyección usando dos análisis de varianza (ANOVAs) independientes para cada hora de medición. De forma similar, las diferencias en concentración de GSH y GSSG en eritrocitos en los sujetos controles y experimentales, fue evaluada en las muestras sanguíneas tomadas antes y 24 horas después de la segunda inyección, usando ANOVAs independientes para cada punto de muestreo.

Resultados

Temperatura. Se observó una temperatura corporal más alta en los individuos inyectados con LPS que en los controles 8 horas después de la primera ($F_{1,6} = 9.256$, $P = 0.023$) y la segunda dosis ($F_{1,6} = 7.084$ $P = 0.038$). No se observaron diferencias significativas en la temperatura entre grupos a las 10 h tras la primera o la segunda inyección ($P = 0.0191$ y $P = 0.225$, respectivamente) (Fig. A2).

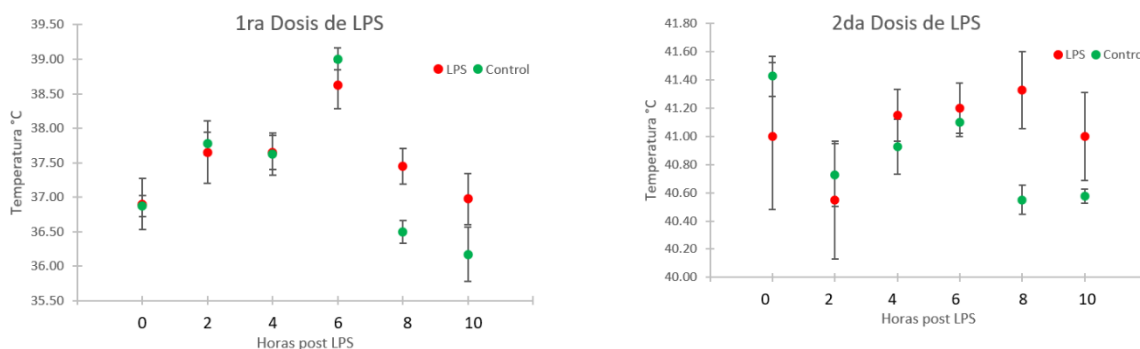


Figura A2. Variación en la temperatura corporal después de recibir una inyección de 1mg/kg LPS o solución salina durante las primeras 10 horas pos-inyección.

Crecimiento de las plumas del pecho.

No se encontró un efecto de la inyección de LPS sobre la tasa de crecimiento de la pluma ($F_{1,67} = 0.129$, $P = 0.721$). La pluma creció en promedio 2 mm al día apartir del día 5 posterior a la extracción, independientemente del tratamiento experimental (Fig. A3)

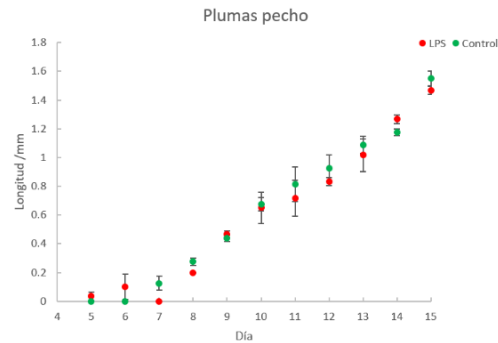


Figura A3. Crecimiento de pluma (mm) posterior a la extracción. Los puntos rojos corresponden a los sujetos inyectados con LPS, mientras que, los puntos verdes corresponden a los sujetos inyectados con solución salina.

Glutación. No se encontró efecto de la inyección de LPS sobre los niveles de GSSG ($F_{1,14} = 0.148$, $P = 0.706$) y GSH ($F_{1,14} = 1.356$, $P = 0.264$; Fig. A4).

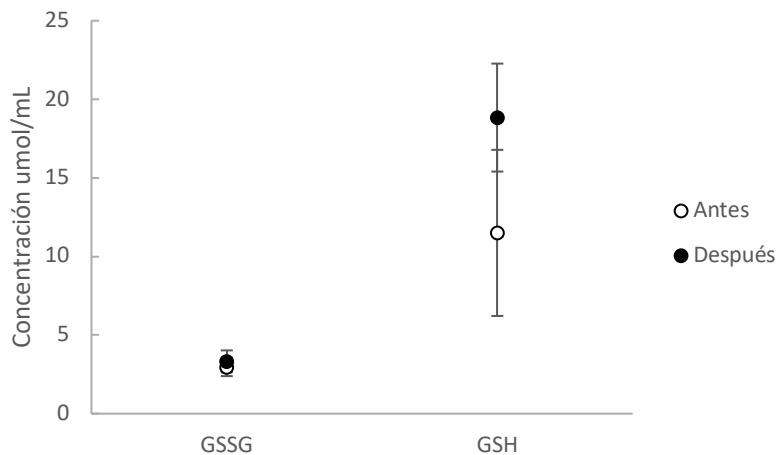


Figura A4. Cambio de los niveles de GSSG y GSH 24 horas después de la segunda inyección de LPS.

Discusión

Los objetivos del estudio fueron: 1) determinar la tasa de crecimiento de las plumas con el fin de estimar el momento óptimo de aplicación de los tratamientos para alterar el estado oxidante de los individuos y 2) verificar la ventana temporal del efecto del reto inmunitario sobre la temperatura corporal y los niveles de glutatión en células rojas. Con respecto al primer objetivo, se encontró que 5 días después de la extracción de plumas, empieza a observarse el desarrollo del cálamo, posteriormente la pluma crece en promedio 2mm por día y a los 17 días está completamente formada. Adicionalmente, se observó que el cálamo empieza a presentar color rojizo al día 8 posterior a la extracción.

Sobre el segundo objetivo, se encontró que la inyección de LPS, en las dosis administradas, no afectó los niveles de GSSG y GSH. En un estudio realizado con pollos encontraron una disminución en los niveles de GSH después de una inyección de LPS, acompañada de un aumento los niveles de lipoperoxidación (biomarcador de oxidación en lípidos) (Han y cols. 2020). En conclusión, el momento adecuado para realizar la inyección es el día 6, debido a que a partir del día 5 después de la extracción de las plumas se observa el crecimiento del cálamo. Sin embargo, se necesita identificar por medio de microscopía el momento en el que empieza a aparecer coloración en las plumas en crecimiento. La administración de LPS tiene un efecto sobre la temperatura corporal 8 horas después de la inyección, mientras que, su efecto sobre los niveles de glutatión no es claro. Es recomendable evaluar el uso de un agente oxidante directo para inducir estrés oxidante e incrementar la periodicidad de la inyección.

Estudio Piloto 2: Inyección de Paraquat

Se realizó un segundo estudio piloto con tres objetivos: 1) evaluar el efecto de la inyección de Paraquat sobre los niveles de glutatión, 2) verificar la dosis requerida para generar un efecto sobre la condición del organismo sin llegar a la letalidad y, 3) identificar el momento de aparición de coloración en la pluma en crecimiento. Se trabajó con 4 individuos macho de 13 semanas de edad, con un peso promedio de 201 ± 2.84 gr.

Para cumplir con los primeros dos objetivos todos los individuos fueron expuestos a la aplicación 5 inyecciones intraperitoneales de (Paraquat, 1,10-dimetil-4,40 Dicloruro de biperidinio). Las inyecciones consistieron en una dosis de 10 mg/kg de masa corporal, diluida en

solución salina con un volumen final de 250 μ L, ya que, en estudios previos con esta misma especie, esta dosis ha mostrado inducir estrés oxidante (Galvani 2000). Las inyecciones fueron aplicadas día de por medio (para mantener el reto oxidante), iniciando un día después de la extracción de las plumas. Para analizar el efecto del Paraquat sobre los niveles de glutatión, se tomaron muestras de sangre de 200 μ L mediante punción de la vena braquial del ala izquierda antes de la primera inyección y 1 h después de la quinta inyección.

Para alcanzar el tercer objetivo, se retiraron las plumas del pecho, en un área de 2 \times 3 cm (ancho \times largo) y se extrajeron calamos en crecimiento los días 7, 8, 9 y 10 para ser observados mediante un microscopio óptico, (ZEISS, Axioskop 2 plus) con el fin de identificar la aparición de coloración en las barbas en formación. A todos los individuos se les proporcionó agua *ad libitum* y 30 gramos de alimento cada 24 horas.

Análisis estadísticos

Se utilizó una ANOVA evaluar el efecto del tratamiento sobre los niveles de glutatión (GSSG y GSH).

Resultados

Niveles de glutatión. No se identificó un efecto de la aplicación de las 5 inyecciones de Paraquat sobre los niveles de glutatión GSSG ($F = 13.623$, $P = 0.706$) y GSH ($F = 12.02$, $P = 0.266$). Se inició con una dosis de Paraquat de 1.2 mg/kg que no produjo ningún efecto a corto plazo de aletargamiento en las codornices (observaciones personales), ante lo cual se modificó la dosis a 20 mg/kg, produciendo la muerte de 1 de los 4 sujetos involucrados en el estudio, por lo cual se hizo una tercera modificación de la dosis, llegando a 10 mg/kg como dosis final, que no produjo nuevas muertes, pero generó disminución en los niveles de actividad (observaciones personales).

Coloración en la pluma en crecimiento. Aunque las barbas de la pluma en crecimiento empiezan a mostrar coloración desde el día 8 después de la extracción, esta coloración se hace completamente evidente el día 9 (Fig. A5).

Discusión

Este segundo estudio piloto se realizó con tres objetivos: 1) evaluar el efecto de la inyección de Paraquat sobre los niveles de glutatión, 2) verificar la dosis requerida para generar un efecto sobre la condición del organismo sin llegar a la letalidad y 3) identificar el momento de aparición de coloración en la pluma en crecimiento. Se encontró que la dosis de Paraquat requerida para no generar mortalidad es de 10 mg/kg. Las plumas de las codornices tardan en volver a crecer completamente 17 días y la adquisición de pigmentos melánicos, en las bárbas, dentro del cálamo es evidente a partir del día 8 después de la extracción. En conclusión, el momento adecuado para iniciar el tratamiento experimental con el objetivo de afectar los niveles de estrés oxidante durante la producción de color en el plumaje en crecimiento, es el día 8 después de la extracción.

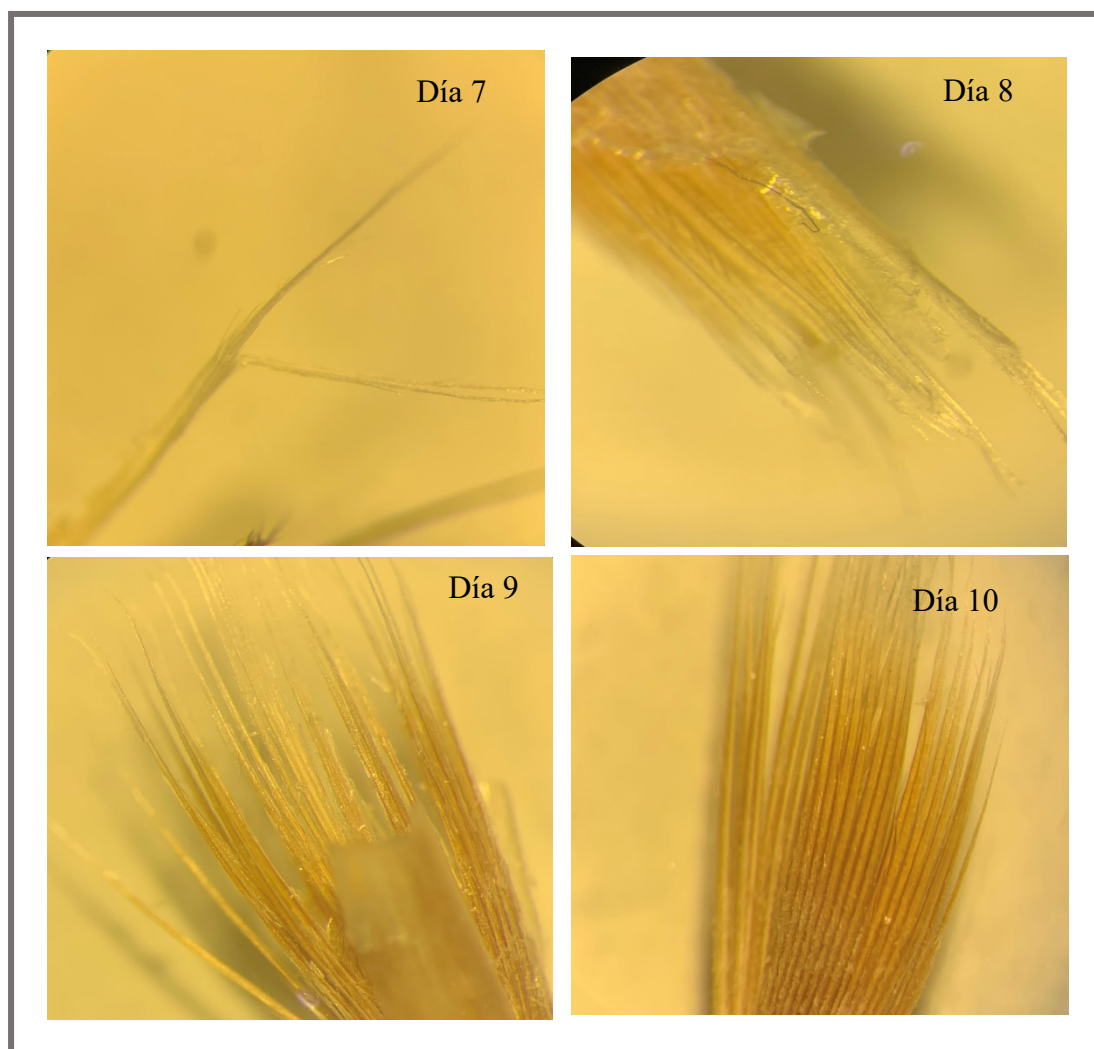


Figura A5. Fotografías de la pigmentación de las barbas al interior del cálamo durante el crecimiento de las nuevas plumas, entre los días 7-10 después de la extracción.