



# Universidad Autónoma de Tlaxcala

---

## Posgrado en Ciencias Biológicas

**Influencia de un trasplante fecal en los niveles de glucocorticoides y el crecimiento de las crías de *Sialia mexicana* en vida libre**

### **T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Alex Mauricio Mopán-Chilito

#### **Directoras**

Dra. Bibiana C. Montoya Loaiza

Dra. L. Roxana Torres Avilés

Tlaxcala, Tlax.

7 de Septiembre, 2023



# Universidad Autónoma de Tlaxcala

---

## Posgrado en Ciencias Biológicas

**Influencia de un trasplante fecal en los niveles de glucocorticoides y el crecimiento de las crías de *Sialia mexicana* en vida libre**

### **T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**P r e s e n t a**

Alex Mauricio Mopán-Chilito

#### **Codirectoras**

Dra. Bibiana C. Montoya Loaiza

Dra. L. Roxana Torres Avilés

#### **Comité Tutorial**

Dr. Aníbal H. Díaz de la Vega Pérez

Dra. Yendi E. Navarro Noya

Tlaxcala, Tlax.

7 de Septiembre, 2023

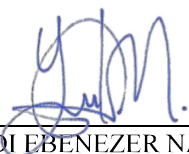


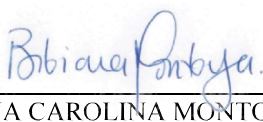
**COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA  
P R E S E N T E**


Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Alex Mauricio Mopán Chilito** realiza para la obtención del grado de **Maestro 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 **“Influencia de un trasplante fecal en los niveles de glucocorticoides y crecimiento de las crías de *Sialia mexicana* en vida libre”**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E  
TLAXCALA, TLAX., A 07 DE AGOSTO DEL 2023

  
\_\_\_\_\_  
DRA. YENDI EBENEZER NAVARRO NOYA

  
\_\_\_\_\_  
DRA. BIBIANA CAROLINA MONTOYA LOAIZA

  
\_\_\_\_\_  
DRA. LETICIA NICOLÁS TOLEDO

  
\_\_\_\_\_  
DR. AMANDO BAUTISTA ORTEGA

  
\_\_\_\_\_  
DR. ANÍBAL HELIOS DÍAZ DE LA VEGA PÉREZ



1993 - 2023  
Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta  
Universidad Autónoma de Tlaxcala  
Universidad Nacional Autónoma de México

# 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/El estudiante ALEX MAURICIO MOPÁN CHILITO titulada “INFLUENCIA DE UN TRASPLANTE FECAL EN LOS NIVELES DE GLUCOCORTICOIDES Y EL CRECIMIENTO DE LAS CRÍAS DE *Sialia mexicana* EN VIDA LIBRE” para optar por su grado de Maestro en Ciencias Biológicas.

El documento de la tesis de ALEX MAURICIO MOPÁN CHILITO fue revisado por mí como directora de tesis antes de presentarse en cada examen tutorial y, posteriormente a los exámenes tutorales, los miembros de su comité tutorial realizaron también sus respectivas observaciones. De manera que el documento, llevó un proceso de revisión por varios profesores expertos en el tema. En el mes de septiembre, el documento final de la tesis fue procesado con el programa del Turnitin marcando poco texto con similitudes, 7%. Los textos detectados con similitud corresponden a lenguaje técnico frecuentemente usado en el área y a elementos característicos de la escritura de reportes científicos (tesis y artículos).

Por lo anterior, confirmo que la estudiante no incurrió en ninguna práctica no deseable en la escritura de la tesis.

Sin más por el momento, reciban atentos saludos.

CORDIALMENTE

Tlaxcala, Tlax., a septiembre 5 de 2023.

BIBIANA CAROLINA MONTOYA LOAIZA

Directora de tesis



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

## **Hoja de financiamiento**

Este trabajo de investigación está vinculado al proyecto de Ciencia de Frontera número 490792, titulado: **“Efectos transgeneracionales: Vinculando los cambios ambientales con la condición fisiológica y el envejecimiento”**. Se llevó a cabo en el centro de investigación “Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta” de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

## **Agradecimientos**

- Al Posgrado en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, UATx, por todo el apoyo brindando.
- A CONHACYT por la beca otorgada (Clave 815599) y al Proyecto CONHACyT Ciencia de Frontera – 490792.
- A mis directoras de tesis Dra. Bibiana Montoya y Dra. Roxana Torres por haberme aceptado en su grupo de investigación y en el proyecto de ciencia de frontera. De igual manera por su apoyo y supervisión durante mi formación académica.
- A mi comité tutorial Dr. Aníbal H. Díaz de la Vega Pérez y Dra. Yendi Navarro Noya por sus revisiones comentarios y sugerencias realizadas durante mi formación académica.

## Resumen

El crecimiento es una fase que demanda energía, por este motivo los desafíos vividos durante esta etapa pueden tener efectos en el fenotipo del individuo a corto, mediano y largo plazo. Estudios recientes han sugerido que la microbiota intestinal podría desempeñar un papel crucial en la regulación energética del huésped, por vía de una mejor utilización de nutrientes y/o por medio de la regulación de los niveles de glucocorticoides (GC). Basado en lo anterior, en este estudio evaluamos en crías del Azulejo de garganta azul (*Sialia mexicana*) la hipótesis de que la microbiota intestinal modula la disponibilidad energética en el organismo por vía del aumento en los niveles de GC línea base. Si nuestra hipótesis es correcta, se espera que las crías suplementadas con trasplantes de microbiota fecal (FMT por sus siglas en inglés) durante la vida temprana presenten: i) niveles más altos de GC línea base a los días 9 y 14, ii) mayor tamaño a los días 9 y 14, y iii) niveles más altos de GC inducidos al día 14 (respuesta al estrés), en comparación con el grupo control. Los polluelos en el grupo experimental recibieron FMT los días 3, 5 y 7 post-eclosión, vía oral, con dosis progresivas de 35  $\mu$ l, 65  $\mu$ l y 95  $\mu$ l, mientras que los polluelos en el grupo control recibieron volúmenes equivalentes de solución salina con la misma frecuencia que el grupo experimental. Conforme a lo predicho, las crías del grupo experimental presentaron niveles más elevados de corticosterona línea base al día 14 que las crías en el grupo control. No obstante, no hubo un efecto significativo del tratamiento en los niveles de corticosterona línea base al día 9, corticosterona inducida ante una prueba de estrés al día 14, crecimiento o supervivencia. Los resultados en conjunto sugieren que la manipulación del microbioma intestinal influye en los niveles de corticosterona línea base, lo que apoya parcialmente la hipótesis de que la microbiota intestinal modula la disponibilidad energética en el organismo por vía de los GC línea base durante la etapa de crecimiento. Lo cual es de particular interés porque nos permite comprender el papel de la microbiota intestinal como un componente vinculado con la regulación energética de los organismos.

## Tabla de contenido

Introducción .....	7
Predicciones .....	12
Objetivos .....	12
Métodos .....	12
Análisis estadístico .....	16
Resultados .....	19
Discusión .....	26
Conclusión .....	33
Referencias .....	33



## Introducción

El crecimiento es una etapa energéticamente demandante debido a la gran cantidad de recursos requeridos para la formación y mantenimiento de estructuras óseas, tejidos, órganos, y demás sistemas corporales (Searcy y cols. 2004; Schmidt y cols. 2012; Monaghan y Haussmann 2015). Por este motivo, un desafío energético (e.g. cambios en la disponibilidad y calidad de alimento, abundancia de competidores y depredadores, perturbación humana o variación climática) durante esta etapa puede generar consecuencias negativas a corto, mediano y largo plazo, llegando a comprometer las perspectivas de supervivencia y reproducción (Lindström 1999; Monaghan 2008; Crespi y cols. 2013). Por ejemplo, las crías del gorrión cantor (*Melospiza melodia*) expuestas a una restricción de alimento (baja cantidad y calidad de alimento), durante tres semanas, presentaron menor tasa de crecimiento (masa corporal, longitud de ala, tarso y plumas), tasa metabólica y supervivencia, en comparación con crías sin restricción de alimento (Searcy y cols. 2004; Schmidt y cols. 2012). De manera similar, se ha encontrado que una restricción de recursos alimenticios durante la etapa de crecimiento aumenta los niveles de glucocorticoides (GC) (Kitaysky y cols. 2010). Los GC participan en la modulación del crecimiento y la supervivencia de los organismos, ya que, movilizan energía en etapas de alta demanda (Monaghan y Haussmann 2015; van Bodegom y cols. 2017).

Los GC son hormonas esteroideas producidas por la corteza suprarrenal y están estrechamente vinculadas a la actividad del eje hipotalámico-pituitario-suprarrenal (HPA), que es el sistema central de respuesta al estrés en los vertebrados (Cottrell y Seckl 2009; Crespi y cols. 2013; van Bodegom y cols. 2017; Heimbürge y cols. 2019). La producción y liberación de GC es regulada por el hipotálamo, el cual estimula la producción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y de la hormona adrenocorticotropa (ACTH), encargadas de controlar la liberación de GC por las glándulas adrenales (van Bodegom y cols. 2017). Cuando los niveles de GC alcanzan cierto umbral, se inhibe la producción de CRH y ACTH mediante retroalimentación negativa (Sapolsky y cols. 2000; McEwen y Wingfield 2003). Los GC se clasifican en dos grupos funcionales: GC línea base y GC inducidos por estrés. Los GC línea base, son aquellos que se producen de manera continua en el organismo, son importantes para mantener la homeostasis energética (equilibrio entre la energía que ingresa y la que se gasta) y

el funcionamiento orgánico durante los cambios del ciclo vital predecibles, como el crecimiento, la reproducción y la migración (McEwen y Wingfield 2003; Crespi y cols. 2013). Por otro lado, los GC inducidos por estrés representan un incremento súbito en la liberación de GC como respuesta fisiológica del eje HPA a circunstancias desafiantes impredecibles (Crespi y cols. 2013), que facilita la movilización rápida de recursos energéticos (Crespi y cols. 2013; Béziers y cols. 2019) y, por consiguiente, permite montar una respuesta ante un reto en el corto plazo. No obstante, mantener altos niveles de GC durante periodos prolongados puede tener efectos negativos en la respuesta inmunitaria de los organismos, disminuyendo la capacidad de respuesta ante infecciones y enfermedades (Sapolsky y cols. 2000; Segerstrom y Miller 2004). La modulación de los GC línea base y los GC de respuesta al estrés depende de factores intrínsecos y extrínsecos del organismo, como la variabilidad individual relacionada con la edad, sexo y genética (Bonier y cols. 2009), los ritmos circadianos y estacionales (Romero 2002), disponibilidad de recursos, depredación (Clinchy y cols. 2004), exposición a contaminantes (Breuner y cols. 2013), e interacciones sociales y jerarquías (Creel 2001).

La teoría de historias de vida propone que los organismos cuentan con una cantidad limitada de recursos para mantener el funcionamiento del organismo (Stearns 1992). Cuando un organismo se enfrenta a un evento impredecible que representa un desafío, utiliza una parte de estos recursos limitados para hacer frente a la situación, comprometiendo de esta forma la disponibilidad de estos recursos para ser usados en otras funciones vitales (Romero y cols. 2009). Si el evento desafiante es leve o de corta duración, el organismo puede compensar los recursos utilizados para hacerle frente y volver a su estado anterior de homeóstasis (equilibrio interno). Sin embargo, si el desafío es intenso o prolongado, el organismo puede agotar sus recursos y no tener la capacidad de recuperar completamente el estado de homeóstasis previo (Romero y cols. 2009). En este contexto, resulta importante destacar que uno de los aspectos clave en la disponibilidad y gestión de estos recursos energéticos es la capacidad del organismo para procesar y absorber nutrientes. Recientemente, se ha encontrado evidencia de que la microbiota intestinal (la comunidad de bacterias, arqueas, eucariontes unicelulares y virus que habitan en el intestino) juega un papel importante en la regulación energética del huésped a

través del aprovechamiento de los nutrientes (Bäckhed y cols. 2004; Ley y cols. 2006; Tremaroli y Bäckhed 2012).

La microbiota presente en el intestino degrada los alimentos, produciendo varios metabolitos, incluidos los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), como el acetato, propionato y butirato (Byrne y cols. 2015). Los AGCC son una fuente importante de energía para las células epiteliales del colon (Donohoe y cols. 2011; Fluitman y cols. 2017), modulan la señalización intracelular y la transcripción génica en diversos tejidos (den Besten y cols. 2013). Se ha demostrado que los AGCC pueden atravesar la barrera hematoencefálica e influir en el sistema nervioso central, modulando la liberación de GC en respuesta a estímulos estresantes (Yano y cols. 2015). De igual manera, los AGCC estimulan las células enteroendocrinas que se encuentran en el intestino generando la liberación de hormonas anorexigénicas como péptido YY (PYY) y glucagón-1 (GLP-1), que participan en la regulación del apetito y la homeostasis de la glucosa (Tolhurst y cols. 2012). Al regular el apetito y la homeostasis de la glucosa, los AGCC influyen en la cantidad de energía que se consume y se almacena, lo cual es fundamental para el mantenimiento de las reservas de energía del organismo. Las células enteroendocrinas también están involucradas en la síntesis y liberación de neurotransmisores como serotonina y dopamina, que participan en la comunicación eje intestino-cerebro, y pueden influir en la activación del eje HPA, lo que, a su vez, afecta la liberación de GC (Fetissov 2017; Foster y cols. 2017; Luo y cols. 2018; Dinan y Cryan 2019; O'Riordan y cols. 2022).

De igual manera, se ha encontrado que los GC pueden alterar la estructura y composición de la microbiota intestinal (Noguera y cols. 2018; Petrullo y cols. 2022), afectando vías de señalización neuroendocrinas y neuroinmunes (eje microbiota-intestino-cerebro) con posibles consecuencias sobre otros procesos vitales (Cryan y cols. 2019). Por ejemplo, en las crías de la gaviota patiamarilla (*Larus michahellis*) se encontró que un aumento experimental de los niveles de corticosterona (el GC principal en las aves), por encima de los niveles de línea base, redujo la abundancia y diversidad de la microbiota intestinal lo cual influyó negativamente sobre la tasa de crecimiento (Noguera y cols. 2018). Lo cual sugiere una relación bidireccional entre la liberación de GC y la microbiota intestinal en donde la microbiota intestinal y sus metabolitos podrían ser un regulador importante de las respuestas fisiológicas y metabólicas del organismo

ante desafíos energéticos, especialmente en etapas altamente demandantes, como el crecimiento o la reproducción (Tremaroli y Bäckhed 2012; Houtz y cols. 2022; Liu y cols. 2022). No obstante, aún se necesitan más trabajos empíricos con animales silvestres para comprender mejor esta relación de doble vía.

La adquisición de la microbiota intestinal es un proceso crucial durante las primeras etapas del desarrollo de los animales, ya que la mayoría de los animales nacen con una baja diversidad microbiana la cual incrementa y se establece después del nacimiento (Funkhouser y Bordenstein 2013; Chen y cols. 2020). Estudios experimentales y correlativos han encontrado que los cambios en la estructura de la comunidad (conjunto de poblaciones de diferentes especies que coexisten en un determinado ambiente) y el ensamblaje (grupo de especies que interactúan entre ellas y participan de procesos ecosistémicos) de la microbiota intestinal durante las primeras etapas del desarrollo, pueden afectar el crecimiento, desarrollo y homeostasis del hospedero (Cox y cols. 2014; Warne y cols. 2017; Warne y cols. 2019; Vera-Ponce de León y cols. 2021). Por ejemplo, en las larvas de la rana de madera (*Lithobates sylvaticus*) y en las ninfas de la cucaracha americana (*Periplaneta americana*), se encontró que la manipulación experimental de su microbiota (inoculación o eliminación) durante las primeras etapas del desarrollo afectó la tasa de crecimiento (tamaño y masa corporal), desarrollo (medidas de la etapa de Gosner y tasa de muda) y tasa metabólica (Warne y cols. 2019; Vera-Ponce de León y cols. 2021). En aves de corral, la maduración de la microbiota intestinal ocurre principalmente durante las 3 primeras semanas de vida (Siegerstetter y cols. 2018). Al usar trasplantes de microbiota fecal (FMT por sus siglas en inglés) durante este periodo crítico del desarrollo, las crías trasplantadas mejoraron su respuesta inmunitaria, además, de presentar mayor crecimiento óseo y ganancia de masa corporal (Siegerstetter y cols. 2018; Yu y cols. 2021). Estos resultados podrían deberse al efecto de recibir microbiota de un donante sano y/o a una aceleración en la maduración de la microbiota intestinal de las crías. En el caso de los animales silvestres, se ha hecho uso del procedimiento FMT principalmente en trabajos de conservación de especies vulnerables, los cuales tienen como objetivo la recuperación de la diversidad de la microbiota intestinal (Guo y cols. 2020). Sin embargo, no se ha utilizado esta

técnica en estudios orientados a comprender el papel de la microbiota intestinal sobre componentes clave del desarrollo.

Un modelo de estudio para evaluar el papel de la microbiota intestinal durante la etapa de crecimiento de los animales en condiciones de libertad (lo que implica estar expuestos a fluctuaciones impredecibles), son las crías de las especies altriciales, ya que dependen completamente del cuidado proporcionado por los padres durante las primeras semanas de vida (Badii y cols. 2013). Por lo que un deterioro en la habilidad de los padres para proporcionar estos cuidados se traduce en una fuente de fluctuación incontrolable de variables ambientales clave (i.e. alimento, temperatura, protección), lo que puede afectar negativamente el balance energético durante esta etapa y comprometer las perspectivas de supervivencia y reproducción de las crías (Monaghan y Hausmann 2015). El Azulejo de garganta azul (*Sialia mexicana*), es una especie altricial, socialmente monógama, con cuidado biparental (Ritchison 2000; Musick 2002). Esta especie se distribuye desde el sur de Canadá pasando por el oeste de Estados Unidos hasta el sur de México. Las poblaciones que se encuentran al norte de su distribución son migratorias de corta distancia o altitudinales; mientras que, las que se encuentran en el sur de México son poblaciones residentes (Ritchison 2000). Su dieta se basa principalmente en el consumo de artrópodos (arañas, moscas, saltamontes, abejas, cochinillas, escarabajos, termitas), y frutos (bayas, cerezas, moras, frambuesas e higos) (Musick 2002). Las parejas de esta especie se reproducen tanto en cavidades naturales, como artificiales (i.e. cajas nido), llegan a incubar por 14 días en promedio entre tres y cinco huevos, con una probabilidad de eclosión de 4 crías en promedio y una edad al emplumado de ~21 días (Porrás-Reyes y cols. 2020). Lo anterior hace de *S. mexicana* un buen modelo de estudio ya que el período de crecimiento de las crías se puede registrar con éxito en condiciones naturales. Dado que el desarrollo es una etapa energéticamente demandante, determinar si la microbiota intestinal se vincula con la disponibilidad energética de las crías (niveles de corticosterona línea base, tasa de crecimiento, respuesta de estrés y supervivencia), nos permitirá comprender si la microbiota intestinal juega un papel como modulador de los compromisos energéticos presentes durante las primeras etapas de vida. Con este propósito se realizó un estudio experimental en el que se suplementó FMT de

individuos adultos a las crías de *S. mexicana* durante sus primeros días de vida (día 3, 5 y 7), y se evaluó la siguiente hipótesis.

### **Hipótesis**

La microbiota intestinal modula la disponibilidad energética de los organismos en vida libre, por vía del aumento en la corticosterona línea base.

### **Predicciones**

Si la hipótesis propuesta es correcta, se espera que, en comparación con las crías del grupo control (no suplementadas con FMT), las crías suplementadas con FMT durante la vida temprana presentarán:

- 1) Mayores niveles de corticosterona línea base al día 9 y 14.
- 2) Mayor tamaño al día 5, 7, 9 y 14.
- 3) Mayores niveles de corticosterona inducida al día 14 (respuesta de estrés).

### **Objetivos**

#### **Objetivo general**

Determinar si la microbiota intestinal suplementada se vincula positivamente con los niveles de corticosterona línea base, la tasa de crecimiento, y respuesta al estrés de las crías del Azulejo de garganta azul en vida libre.

#### **Objetivos particulares**

- Evaluar si la suplementación de FMT aumenta los niveles de corticosterona línea base al día 9 y 14.
- Evaluar si la suplementación de FMT favorece la ganancia de tamaño al día 5, 7, 9 y 14.
- Evaluar si la suplementación de FMT favorece la respuesta de estrés al día 14 (corticosterona inducida).

## Métodos

### Sitio de estudio

Este estudio se llevó a cabo durante los meses de marzo a julio del 2022 en el Parque Nacional La Malinche ubicado en el estado de Tlaxcala, México (19°14'N, 98°02'W). El área se caracteriza por la presencia de parches de bosques de coníferas (*Pinus* y *Abies* spp) y encino (*Quercus* spp) y pastizales en la zona media y alta, así como por la cercanía de campos agrícolas de maíz en la zona baja (Domínguez-Godoy y cols. 2020). Nuestra área de muestreo incluyó la parte baja del bosque y los parches de bosques presentes en cultivo. Es importante mencionar que la población estudiada se encuentra en los límites más sureños de la distribución de *S. mexicana* (Porrás-Reyes y cols. 2020).

### Procedimiento

Durante la temporada de apareamiento, se monitorearon 247 cajas nido, que fueron revisadas dos veces por semana para registrar la actividad de anidación. Una vez identificada una puesta (i.e. cuando observábamos al menos un huevo de Azulejo dentro de la caja), se monitorearon los huevos cada tres días hasta la eclosión (14 días). Antes de la eclosión, cada nido fue asignado de manera secuencial a un grupo, experimental o control. En el grupo experimental, a todas las crías del nido se les administró vía oral FMT preservado en glicerol estéril (n = 21 cajas nido, 73 crías). En el grupo control, a las crías se les proporcionó solución salina con glicerol estéril vía oral (n = 22 cajas nido, 60 crías). Las crías de los dos grupos recibieron el tratamiento correspondiente durante los días 3, 5 y 7 post-eclosión. Se administró una dosis progresiva dependiendo de la edad de las crías, que correspondió a 35 µL, 65 µL y 95 µL de FMT al grupo experimental (ver abajo) y el mismo volumen de solución salina con glicerol estéril (10% [vol]) al grupo control, lo que representa un aumento en volumen aproximado del 85.71% entre la primera y la segunda dosis, y del 46.15% entre la segunda y la tercera (Yu y cols. 2021). Este aumento progresivo en las dosis tenía como finalidad incrementar la probabilidad de colonización de los microorganismos presentes en el stock, acorde con el crecimiento y desarrollo de las crías. Después de la eclosión, se marcó a todas las crías de cada nido para su

identificación individual, usando barniz para uñas de diferentes colores (rojo, negro, verde y azul) en las garras de una de las patas, en cada revisión del nido se remarcaron.

### **Preparación del trasplante de microbiota fecal y suplementación**

El stock para la realización del FMT se obtuvo a partir de muestras de heces de padres de las crías incluidas en el estudio. Los individuos adultos fueron capturados dentro de la caja nido durante la etapa de incubación de manera aleatoria ( $n = 42$  individuos, 4 machos y 38 hembras). Las capturas se realizaron en tres bloques diferentes, debido a que la sincronía en el apareamiento de las parejas reproductivas no es alta. Al momento de la captura, cada individuo fue cuidadosamente retirado de la caja nido utilizando guantes de nitrilo que previamente fueron desinfectados, con el fin de prevenir cualquier contaminación cruzada. Posteriormente, el individuo fue colocado dentro de una bolsa de papel que estaba acondicionada con una lámina de acetato desinfectada en la base, y una rejilla de alambre que separaba a los individuos de la base, para evitar que sus patas entraran en contacto directo con las muestras de heces.

Las muestras de heces fueron recolectadas directamente en tubos Eppendorf estériles, y para preservar la integridad de las muestras durante su traslado, estas fueron colocadas en hielo. Una vez en el laboratorio, las muestras se procesaron por bloques dentro de una campana de extracción siguiendo el procedimiento descrito por Siegerstetter y cols. (2018) con algunas modificaciones. Con la finalidad de asegurar la supervivencia microbiana durante el almacenamiento ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), se duplicó el volumen de heces con una solución de glicerol estéril en solución salina (10% [vol]), esta mezcla se homogeneizó usando vórtex (Siegerstetter y cols. 2018). No se realizó un filtrado de esta solución debido al bajo volumen de heces colectadas en cada captura. El stock (solución concentrada) de la suspensión fecal se dividió en el número de alícuotas necesarias para suplementar a las crías del grupo experimental, es decir una alícuota por caja para cada día ( $n = \sim 66$  alícuotas), y el volumen de cada alícuota dependió de la cantidad de crías presentes en cada caja. Las alícuotas fueron congeladas hasta el momento de su uso, evitando así múltiples ciclos de descongelación y congelación durante las suplementaciones (el intervalo de almacenamiento fue de 1 día a 20 días, media  $\sim 12$  días).



## **Cuantificación niveles de corticosterona línea base e inducidos**

Para cuantificar los niveles de corticosterona línea base a todas las crías se les tomó una muestra de sangre de la vena yugular, antes (día 3: 50  $\mu$ L; masa media de las crías = 5 g) y después del tratamiento (día 7: 150  $\mu$ L; masa media de las crías = 17 g) y antes de completar el emplumado (día 14: 100  $\mu$ L; masa media de las crías = 27 g). El aumento en los volúmenes recolectados se debió al objetivo adicional de analizar la respuesta inmunitaria de las crías, el cual no fue incluido en este estudio. Los volúmenes de sangre extraídos fueron menores al 1% del peso del individuo con base a los límites sugeridos por Voss y cols. (2010) para que no afectaran negativamente el crecimiento ni la supervivencia de las crías (en crías de 5 g extraer hasta 50  $\mu$ L; en crías de 17 g extraer hasta 170  $\mu$ L; en crías de 20 g extraer hasta 200  $\mu$ L). Adicionalmente, se utilizaron agujas de calibre 27G para las muestras intravenosas y de calibre 30G para la venopunción, siguiendo las recomendaciones establecidas para aves que pesan menos de 10 g para garantizar una extracción segura y eficiente.

Las muestras de sangre se recolectaron dentro de los tres minutos posteriores al abrir la caja nido y sacar un individuo (el rango de colecta de la muestra de sangre fue de 15 seg a 180 seg, media = 80 seg, DE= 0.036) para evitar un posible efecto de la manipulación sobre los niveles de corticosterona (Pakkala y cols. 2013). Adicionalmente, el día 14 se realizó una prueba de estrés inducido (prueba de restricción), la cual consistió en poner a las crías dentro de una bolsa de tela oscura, que permaneció colgada durante 20 min (Pakkala y cols. 2013). El procedimiento implicó la extracción individual de las crías de su caja nido para obtener la muestra de sangre para estimar los niveles de corticosterona línea base (100  $\mu$ L), previo a introducirlas en la bolsa de tela para la prueba de restricción. Esto se realizó de manera consecutiva para todas las crías presentes en cada caja nido. Una vez transcurrido el tiempo establecido, se tomó una segunda muestra de sangre (100  $\mu$ L) de la vena braquial a cada cría. Las muestras se almacenaron en tubos Eppendorf que permanecieron en hielo durante el trabajo de campo (5 h aprox.). Posteriormente, se centrifugaron a 10 000 g durante 15 min, para separar el plasma de las células rojas, las muestras separadas fueron almacenadas a -20°C hasta el momento del análisis.

La concentración de corticosterona línea base (día 3, 9 y 14) y corticosterona inducida (día 14) en plasma se estimó mediante ensayo enzimático usando un kit comercial (DRG Corticosterone ELISA kit). Antes de realizar la cuantificación de hormonas, se extrajeron los esteroides totales presentes en el plasma siguiendo el protocolo descrito por Lopez-Garcia y cols. (2013). Brevemente, se tomaron 20  $\mu$ L de plasma, se agregó 1 mL de éter dietílico y se mezcló usando vórtex durante 1 min. Las muestras se congelaron durante 30 min a  $-80^{\circ}\text{C}$ , posteriormente, se recuperó el sobrenadante y se dejó evaporar a temperatura ambiente. Este procedimiento se repitió dos veces y, posteriormente, se agregó 1 mL de metanol a cada muestra, se centrifugó a 2 000 rpm durante 5 min y se dejó evaporar. Los extractos se resuspendieron añadiendo 50  $\mu$ L de agua ultrapura. La recuperación promedio reportada para este método de extracción es del 90 % (Ouyang y cols. 2012, Ouyang y cols. 2013). Cada muestra se cuantificó por duplicado y los valores de absorbancia se interpolaron en una curva de referencia de corticosterona. El coeficiente de variación intra-placa fue de 4.21% y entre placas de 2.93%. Los resultados se expresan como pg corticosterona/mL. La reactividad cruzada del kit fue de 7.4% para progesterona, 3.4% para desoxicorticosterona, 1.6% para 11-Dehydrocorticosterone 0.3% para cortisol, 0.3% para pregnenolona y  $<0.1\%$  para otros esteroides.

### **Cuantificación trayectoria de crecimiento y éxito de emplumado**

Para cuantificar el crecimiento se midió la longitud del tarso, ulna y peso de cada cría, cada dos días a partir del día 3 post-eclosión y hasta el día 9, realizando una medición final el día 14. Para las mediciones se utilizó un vernier analógico ( $\pm 0.02$  mm) y una balanza digital ( $\pm 0.001$  g). Las mediciones fueron tomadas por dos observadores, el coeficiente de variación intra-individuo de estas mediciones fue de 1.96% y entre individuos de 2.93%. Para estimar el éxito de emplumado se registró la supervivencia de las crías hasta el día 14.

### **Análisis estadístico**

Los análisis para evaluar el efecto del tratamiento experimental sobre los niveles de corticosterona tanto de línea base como inducida se realizaron usando una submuestra de las crías que sobrevivieron hasta el día 14, al menos una cría por cada nido ( $n = 43$ ; 22 controles y 21 experimentales). Esta decisión fue adoptada debido a limitaciones impuestas por el volumen

de plasma disponible para los análisis de corticosterona. Sin embargo, es relevante destacar que es poco probable que la decisión adoptada haya sesgado el análisis ya que la supervivencia no se vio afectada por el FMT. Para evaluar el efecto del tratamiento experimental sobre los niveles de corticosterona línea base, se utilizó un modelo lineal mixto (LMM) independiente para cada edad de las crías (3, 9 y 14 días). Cada modelo incluyó la corticosterona línea base como variable de respuesta y el tratamiento, la fecha de puesta, la presencia/ausencia de crías muertas en cada nido (como un indicador de la capacidad de los padres para proveer a las crías) como factores fijos. También se incluyó la interacción del tratamiento con la edad de la cría y con la presencia/ausencia de crías muertas en el nido. La identidad del nido y el sitio de anidación (bosque o cultivo) fueron incluidos como factores aleatorios.

Para evaluar el efecto del tratamiento experimental sobre el cambio en los niveles de corticosterona antes versus después de la prueba de estrés al día 14, se utilizó un LMM. Se calculó el índice de cambio en los niveles de corticosterona como la diferencia entre los niveles de corticosterona inducida menos los niveles de corticosterona línea base dividido sobre los niveles de corticosterona línea base (cort inducida día 14 - cort línea base día 14 / cort línea base día 14). El modelo incluyó el índice cambio en los niveles de corticosterona después de la prueba de estrés como variable de respuesta y, el tratamiento, la fecha de puesta, presencia/ausencia de crías muertas en cada nido y el orden de ingreso de cada cría a la prueba de estrés como factores fijos; así como la interacción del tratamiento con el orden de ingreso de cada cría a la prueba de estrés. La identidad del nido y el sitio de anidación fueron incluidos como factores aleatorios. En un segundo análisis se evaluó el efecto del tratamiento experimental sobre los niveles de corticosterona inducida por la prueba de estrés (i.e. los niveles de corticosterona 30 minutos después del confinamiento) en las crías al día 14 utilizando un LMM, que incluyó la fecha de puesta como covariable, el tratamiento, el orden de ingreso de cada cría a la prueba de estrés y la presencia/ausencia de crías muertas en cada nido como factores fijos; así como la interacción del tratamiento con el orden de ingreso de cada cría a la prueba de estrés. La identidad del nido y el sitio de anidación fueron incluidos como factores aleatorios.

Para evaluar el efecto del tratamiento experimental sobre el crecimiento de las crías (longitud del tarso, ulna y peso), se resumieron las variables de crecimiento mediante un análisis

de componentes principales (PCA) para todas las edades (día 3, 5, 7, 9 y 14). El análisis resultó en 3 componentes principales (CP) que explicaron el 97.95%, 1.322% y 0.727%, respectivamente (autovalores: CP1 = 2.938, CP2 = 0.039 y CP3 = 0.021). Se usó el primer componente del PCA (PC1), excluyendo los valores del día 3, como variable de respuesta en un LMM, que incluyó la fecha de puesta como covariable, el tratamiento, la edad de la cría, los valores del PC1 al día 3 y presencia/ausencia de crías muertas en cada nido como factores fijos; así como la interacción del tratamiento con la edad del pollo y con la presencia/ausencia de crías muertas en cada nido. La identidad de la cría anidada en la identidad del nido, por una parte, y el sitio de anidación, por otra, fueron incluidas como factores aleatorios, con la finalidad de tener en cuenta la no independencia de las medidas repetidas tomadas en los mismos individuos, en individuos pertenecientes al mismo nido y en nidos ubicados en el mismo sitio de anidación.

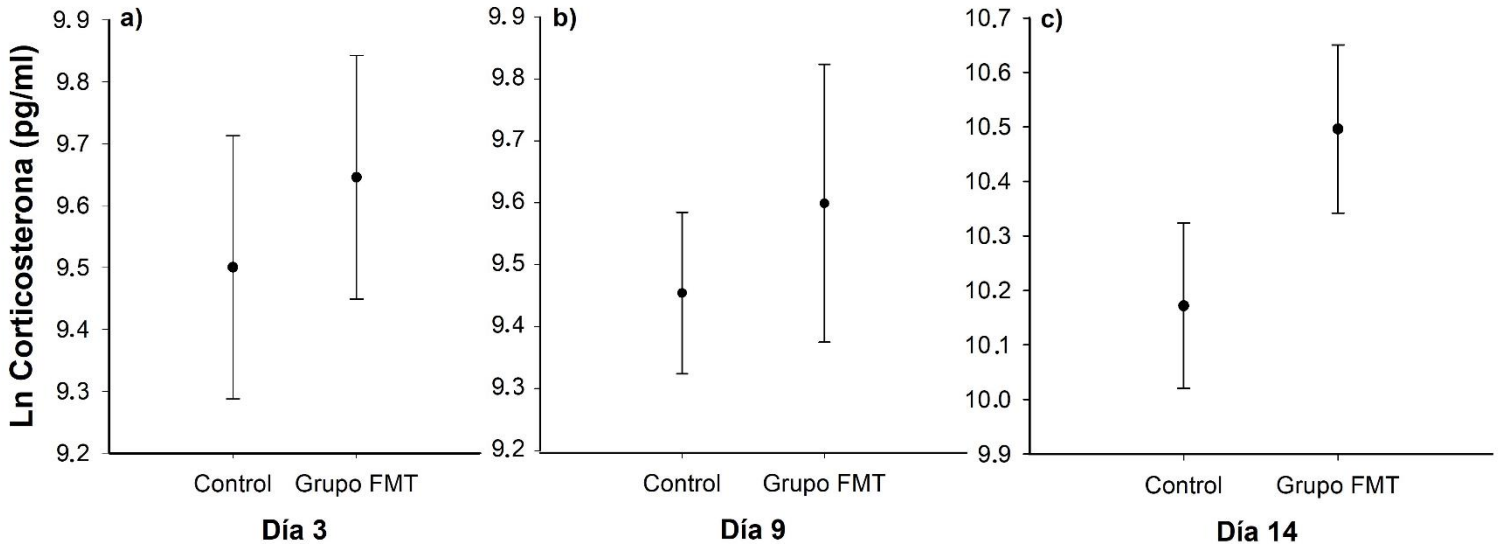
Finalmente, para evaluar el efecto del tratamiento sobre la probabilidad de supervivencia de las crías, se realizó una regresión de Cox, donde se incluyó la fecha de eclosión como covariable, el grupo experimental y la edad del pollo como factores fijos, y como factores aleatorios la identidad de la cría anidada en la identidad del nido, por una parte, y el sitio de anidación, por otra.

Todos los análisis fueron realizados en el software R v.4.2.1. (R Core Team 2023), función `lmer` del paquete `lme4` (Bates y *cols.* 2010, R Baayen 2008), función `coxme` del paquete `coxme` (Therneau 2015) y la función `Surv` del paquete `survival` (Therneau y Lumley 2015). Los modelos fueron simplificados mediante ‘stepwise backward deletion’. Para cada modelo, se evaluaron los supuestos de normalidad en los residuales utilizando el gráfico de cuantil-cuantil (Q-Q) y el gráfico de residuales versus valores predichos. Cuando fue necesario, se implementaron transformaciones logarítmicas.

## Resultados

### Corticosterona línea base

Antes del tratamiento con FMT, los niveles de corticosterona línea base al día 3 de edad de las crías del grupo experimental y control no fueron diferentes ( $\beta = 0.471 \pm 0.297$ ,  $F_{1, 19} = 2.58$ ,  $P = 0.12$ ,  $R^2=0.24$ ; Figura 1a). Después del tratamiento con FMT, no se identificó un efecto del tratamiento sobre los niveles de corticosterona línea base al día 9 (Figura 1b), pero si al día 14 post-eclosión. Al día 14 las crías del grupo experimental presentaron niveles de corticosterona línea base 40% mayores en comparación con las crías del grupo control (Figura 1c, Tabla 1).



**Figura 1.** Efecto del tratamiento con trasplante de microbiota fecal (FMT) sobre los niveles de corticosterona línea base (se muestra media  $\pm$  EE) de crías de Azulejo de garganta azul *S. mexicana* en relación con la edad (día 3, 9 y 14). Las crías del grupo control recibieron solución salina estéril (n = 22) y las crías del grupo experimental recibieron FMT (n = 21).

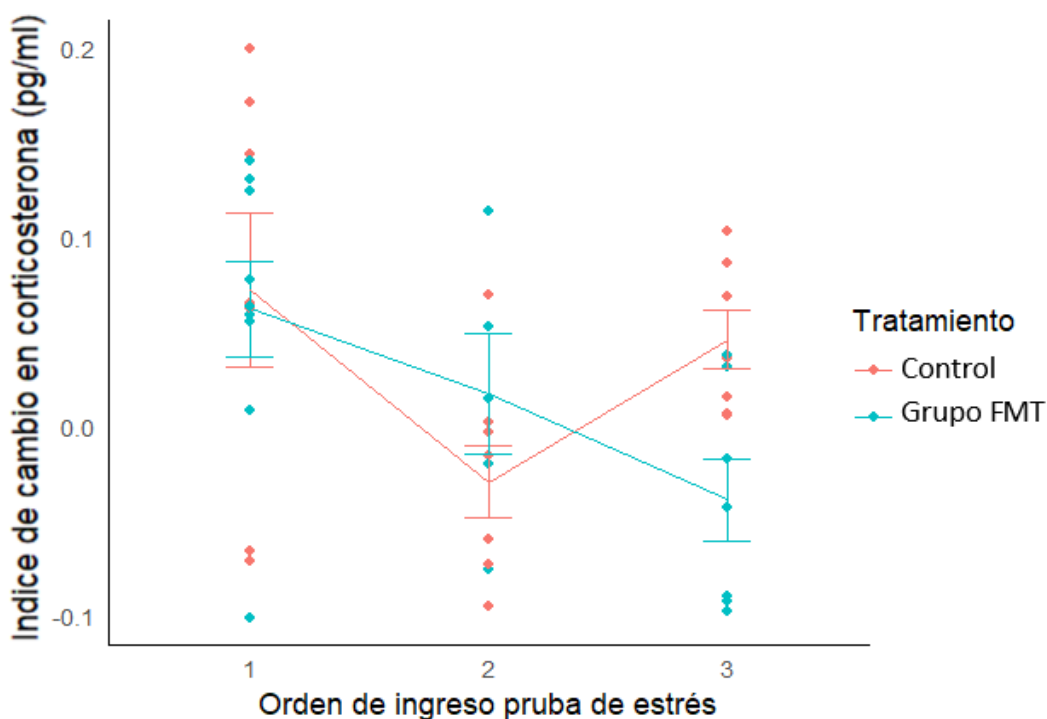
**Tabla 1.** Efecto del tratamiento sobre la corticosterona línea base de las crías (n = 43 crías: 22 controles y 21 experimentales; n = 24 nidos: 12 controles y 12 experimentales) al día 9 y 14. Los análisis se llevaron a cabo usando modelos lineales mixtos (LMM); en negritas se muestra el modelo final.

<i>Corticosterona línea base</i>										
	Estimado ± error	<b>Día 9</b>				<b>Día 14</b>				
		<i>F</i>	<i>Gl. Den</i>	<i>P</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>	Estimado ± error	<i>F</i>	<i>Gl. Den</i>	<i>P</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>
<i>Tratamiento</i>	-	-	-	-	-	<b>0.606 ± 0.214</b>	<b>8.0</b>	<b>40</b>	<b>0.007</b>	<b>0.23</b>
<i>Fecha de puesta</i>	-	-	-	-	-	<b>0.025 ± 0.008</b>	<b>10.2</b>	<b>40</b>	<b>0.002</b>	
<i>Variables eliminadas del modelo</i>										
<i>Fecha de puesta</i>	0.009 ± 0.010	0.95	17.8	0.34	0.27	-	-	-	-	-
<i>Tratamiento</i>	0.288 ± 0.308	0.88	21.1	0.40	-	-	-	-	-	-
<i>Crías muertas</i>	0.209 ± 0.306	0.47	17.8	0.50	-	-0.232 ± 0.204	1.30	39	0.30	-
<i>Tratamiento x Crías muertas</i>	0.501 ± 0.587	0.73	17.2	0.40	-	-0.188 ± 0.394	0.23	38	0.60	-
<b><i>Factores aleatorios</i></b>		<i>DE</i>				<i>DE</i>				
<i>Id. Nido</i>		0.33				0				
<i>Sitio de anidación</i>		0.29				0				

## Respuesta a la prueba de estrés

### Índice de cambio en los niveles de corticosterona al día 14

Se encontró un efecto de la interacción entre tratamiento y orden de ingreso de cada cría a la prueba de estrés, sobre el cambio en los niveles de corticosterona al día 14 (cort inducida día 14 – cort línea base día 14 / cort línea base día 14) (Figura 2, Tabla 2 y Anexo 1). Las crías que ingresaron en primer lugar a la prueba de estrés (orden 1) tuvieron un aumento en los niveles de corticosterona en ambos grupos. Las crías que ingresaron en segundo lugar a la prueba de estrés (orden 2), en promedio, no aumentaron sus niveles de corticosterona en ambos grupos. Sin embargo, las crías que ingresaron en tercer lugar a la prueba de estrés (orden 3) tuvieron un patrón opuesto entre grupos. Las crías del grupo FMT tendieron a disminuir sus niveles de corticosterona, mientras que las crías del grupo control tuvieron un aumento en los niveles de corticosterona.



**Figura 2.** Efecto del tratamiento con trasplante de microbiota fecal (FMT) sobre el índice de cambio en corticosterona (cort inducida día 14 – cort línea base día 14 / cort línea base día 14; se muestra media  $\pm$  EE) de crías *S. mexicana* al día 14, con relación al orden de ingreso de cada cría a la prueba de estrés. Las crías del grupo control recibieron solución salina estéril (n = 22), y las crías del grupo experimental recibieron FMT (n = 21).

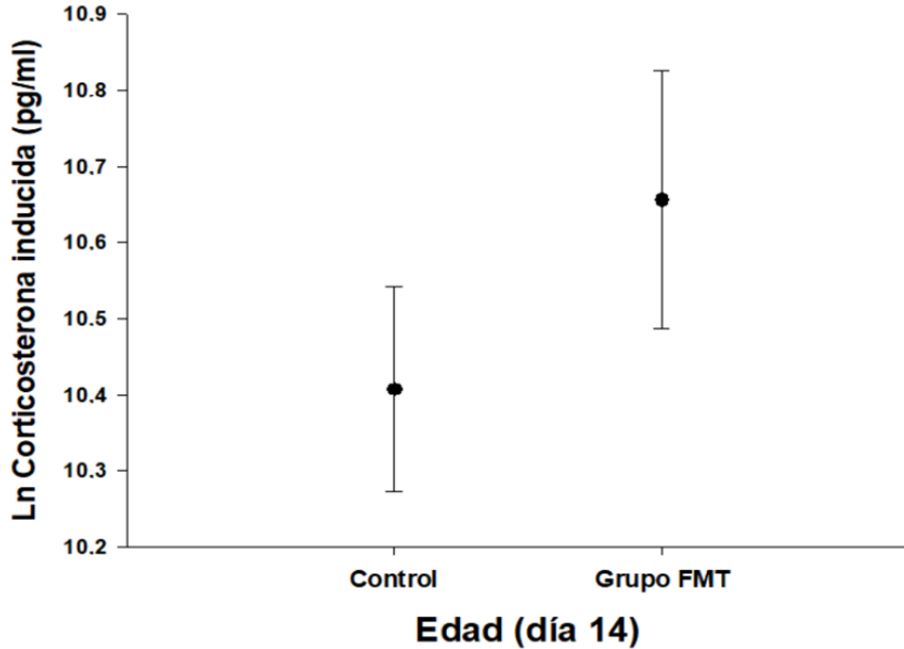
**Tabla 2.** Efecto del tratamiento sobre el índice de cambio en los niveles de corticosterona antes versus después de la prueba de estrés al día 14 (cort inducida día 14 – cort línea base día 14/ cort línea base día 14) (n = 43 crías: 22 controles y 21 experimentales; n = 24 nidos: 12 controles y 12 experimentales). Los análisis se llevaron a cabo usando modelos lineales mixtos (LMM); en negritas se muestra las variables significativas del modelo final.

<i>Índice de cambio en corticosterona</i>					
	Estimado ± error	F	Gl. Den	P	R <sup>2</sup>
<i>Tratamiento</i>	0.347 ± 0.123	2.36	14	0.14	
<i>Fecha de puesta</i>	<b>-0.001 ± 0.001</b>	<b>4.16</b>	<b>15</b>	<b>0.05</b>	
<i>Crías muertas</i>	<b>-0.063 ± 0.022</b>	<b>8.19</b>	<b>11</b>	<b>0.01</b>	<b>0.44</b>
<i>Orden</i>	<b>-0.022 ± 0.034</b>	<b>8.85</b>	<b>27</b>	<b>0.001</b>	
<i>Tratamiento x Orden</i>	<b>-0.079 ± 0.478</b>	<b>3.78</b>	<b>27</b>	<b>0.03</b>	
<b><i>Factores aleatorios</i></b>	<b><i>DE</i></b>				
<i>Id. nido</i>	0.011				
<i>Sitio de anidación</i>	0				

### *Niveles de corticosterona inducida*

Los niveles inducidos de corticosterona al día 14 fueron en promedio 32% mayores en las crías experimentales que en las crías control; sin embargo, esta diferencia no fue significativa (Figura 3, Tabla 3). Se encontró un efecto de la variable crías muertas sobre los niveles de corticosterona inducida por el estrés, las crías de nidos en donde no hubo presencia de crías muertas presentaron mayores niveles de corticosterona inducida (Tabla 3).





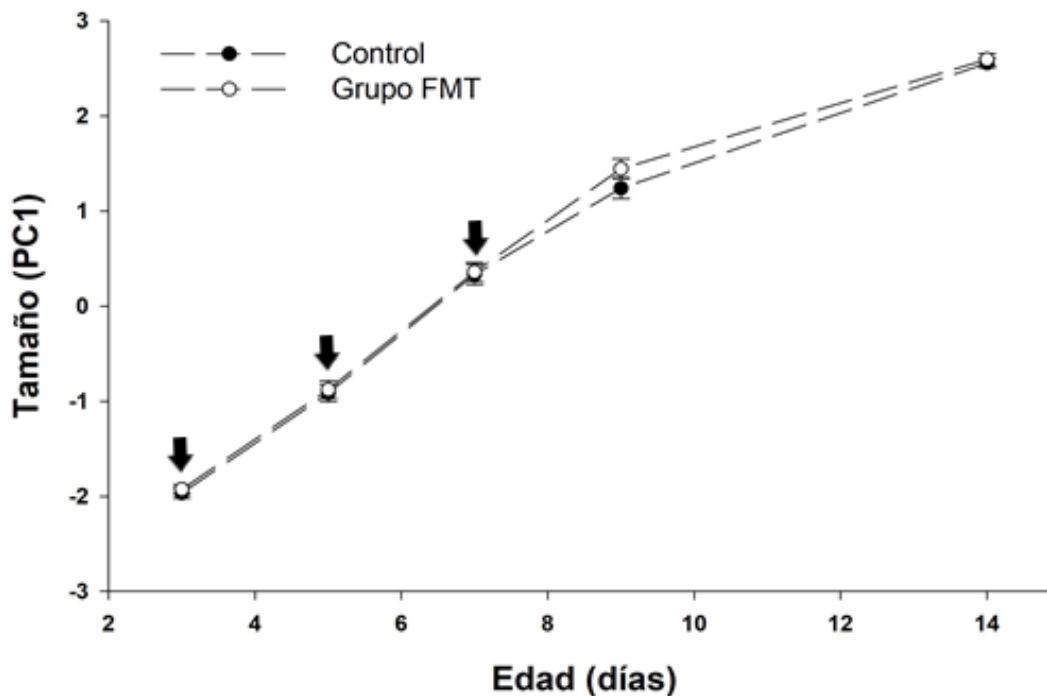
**Figura 3.** Efecto del tratamiento con trasplante de microbiota fecal (FMT) sobre los niveles de corticosterona inducida por el estrés (se muestra media  $\pm$  EE) de crías de *S. mexicana* al día 14 de edad. Las crías del grupo control recibieron solución salina estéril (n = 22), y las crías del grupo experimental recibieron FMT (n = 21).

**Tabla 3.** Efecto del tratamiento sobre la respuesta de estrés (corticosterona inducida) de las crías al día 14 (n = 43 crías: 22 controles y 21 experimentales; n = 24 nidos: 12 controles y 12 experimentales). Los análisis se llevaron a cabo usando modelos lineales mixtos (LMM); en negritas se muestra el modelo final.

<i>Corticosterona inducida</i>					
	Estimado $\pm$ error	F	Gl. Den	P	R <sup>2</sup>
<i>Crías muertas</i>	<b>-0.806 <math>\pm</math> 0.214</b>	<b>14.12</b>	<b>20.66</b>	<b>0.001</b>	<b>0.46</b>
<i>Orden</i>	<b>-0.587 <math>\pm</math> 0.225</b>	<b>3.7</b>	<b>29.88</b>	<b>0.04</b>	
<i>Variables eliminadas del modelo</i>					
<i>Tratamiento</i>	0.236 $\pm$ 0.204	1.35	17.50	0.26	-
<i>Fecha de puesta</i>	0.008 $\pm$ 0.008	0.94	14.88	0.34	-
<i>Tratamiento x Orden</i>	-0.174 $\pm$ 0.444	0.077	26.47	0.92	-
<b><i>Factores aleatorios</i></b>					
	<i>DE</i>				
<i>Id. nido</i>	0.19				
<i>Sitio de anidación</i>	0				

## Crecimiento

Después del tratamiento con FMT, no se identificó un efecto del tratamiento sobre las medidas de tamaño de las crías (PC1) a las edades 5, 7, 9 y 14 días (después de controlar por la medida de tamaño al día 3 PC1) (Figura 4, Tabla 4).



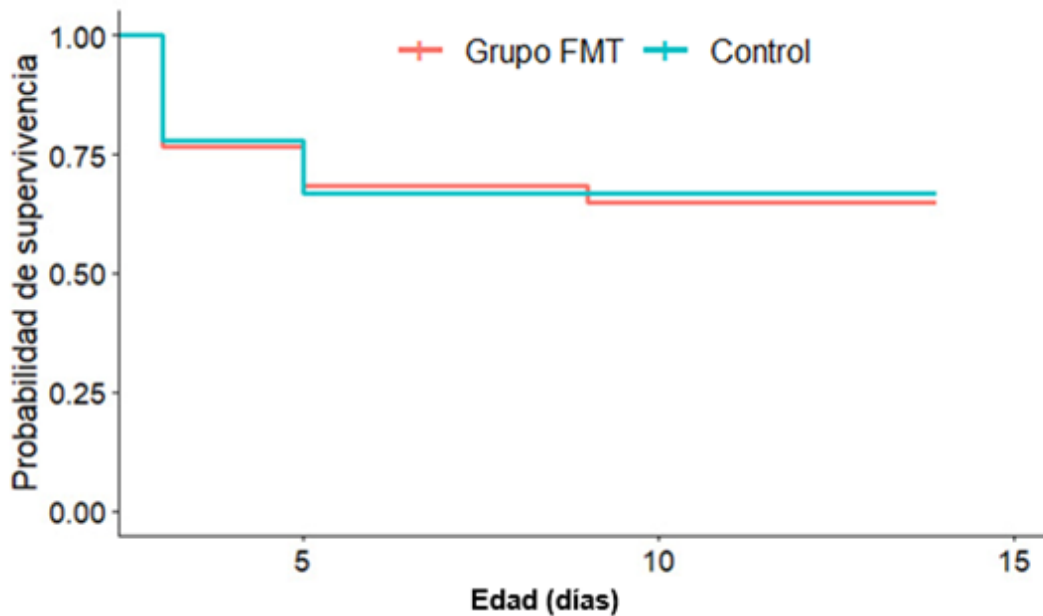
**Figura 4.** Efecto del tratamiento con trasplante de microbiota fecal (FMT) sobre el tamaño (PC1) de crías de azulejo de garganta azul (*S. mexicana*) en relación, a las edades 5, 7, 9, 14 días (se muestra media  $\pm$  EE). Las crías del grupo control recibieron solución salina estéril ( $n = 22$ ), y las crías del grupo experimental recibieron FMT ( $n = 21$ ). Las flechas negras indican las edades 3, 5 y 7 días en las que se administró el FMT.

**Tabla 4.** Efecto del tratamiento con trasplante de microbiota fecal (FMT) sobre las medidas de tamaño (PC1) de las crías al día 5, 7, 9 y 14 ( $n = 133$  crías: 60 controles y 73 experimentales;  $n = 39$  nidos: 19 controles y 20 experimentales). Los análisis se llevaron a cabo usando modelos lineales mixtos (LMM); en negritas se muestra el modelo final.

	<i>Crecimiento (PCI)</i>				
	Estimado $\pm$ error	<i>F</i>	<i>Gl. Den</i>	<i>P</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>
<i>Edad</i>	<b>0.377 <math>\pm</math> 0.007</b>	<b>2704.72</b>	<b>237</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.91</b>
<i>Fecha de puesta</i>	<b>0.015 <math>\pm</math> 0.004</b>	<b>11.68</b>	<b>90</b>	<b>&lt;0.0001</b>	
<i>Variables eliminadas del modelo</i>					
<i>Crías muertas</i>	-0.225 $\pm$ 0.200	1.3	35.88	0.26	-
<i>PCI día 3</i>	0.013 $\pm$ 0.058	0.05	307.00	0.81	-
<i>Tratamiento</i>	0.026 $\pm$ 0.158	0.03	42.27	0.83	-
<i>Tratamiento x Edad</i>	-0.003 $\pm$ 0.011	0.1	371.91	0.76	-
<i>Tratamiento x Crías muertas</i>	-0.055 $\pm$ 0.345	0.6	35.43	0.83	-
<b>Factores aleatorios</b>	<b>DE</b>				
<i>Id. cría / I. nido</i>	0.2047				
<i>Sitio de anidación</i>	0.0009				

### Supervivencia

Después del tratamiento con FMT, no se identificó un efecto del tratamiento sobre la supervivencia de las crías (Figura 5 y Tabla 5). El porcentaje de crías muertas fue de 44%, las cuales murieron en promedio a los 5 y 7 días la edad.



**Figura 5.** Efecto del tratamiento con trasplante de microbiota fecal (FMT) sobre la probabilidad de supervivencia por edad de crías de azulejo de garganta azul (*S. mexicana*). Las crías del grupo control recibieron solución salina estéril (n = 22), y las crías del grupo experimental recibieron FMT (n = 21).

**Tabla 5.** Efecto del tratamiento con trasplante de microbiota fecal (FMT) sobre la supervivencia de las crías (n = 123 crías; 59 controles y 64 experimentales; n = 39 nidos: 19 controles y 20 experimentales). Los análisis se llevaron a cabo usando modelo de Regresión de Cox.

<i>Supervivencia</i>				
	Coef (exp)	Se (exp)	Z	P
<b><i>Variables eliminadas del modelo</i></b>				
<i>Tratamiento</i>	0.9735	0.2212	-0.12	0.90
<i>Crías muertas</i>	0.9735	0.2212	-0.14	0.89
<i>Fecha de puesta</i>	0.9989	0.0079	-0.13	0.90
<i>Tratamiento x Crías muertas</i>	1.0465	0.4554	0.10	0.92
<i>Tratamiento x Fecha de puesta</i>	1.0014	0.0165	0.09	0.93
<b><i>Factores aleatorios</i></b>				
<i>DE</i>				
<i>Id. cría / Id. nido</i>	0.0015			
<i>Sitio de anidación</i>	0.0065			

### Discusión

En este estudio se evaluó la hipótesis de que la microbiota intestinal modula la disponibilidad energética de los organismos en vida libre, por vía del aumento en los niveles de corticosterona línea base. Para probar nuestra hipótesis, se realizó una manipulación experimental en la que se suplementó con FMT (grupo experimental) o solución salina estéril (grupo control) a las crías de *S. mexicana* en vida libre. De acuerdo con lo predicho, se encontró que los individuos experimentales presentaron niveles elevados de corticosterona línea base al día 14. Sin embargo, no se encontró un efecto del tratamiento sobre los niveles de corticosterona línea base al día 9, la respuesta al estrés al día 14, el crecimiento o la supervivencia. Esto sugiere que, la microbiota intestinal podría estar modulando la disponibilidad energética de las crías por vía del aumento de corticosterona línea base como se predecía. No obstante, estos resultados deben interpretarse con cautela, dado que solo una de nuestras tres predicciones se cumplió. De igual manera, aún se requiere corroborar si la manipulación experimental afectó la composición de la microbiota intestinal de las crías que fueron inoculadas con FMT en comparación con las crías del grupo control. Asimismo, es fundamental evaluar la duración de cualquier cambio observado, en caso de que este haya

tenido lugar, para entender el vínculo entre la microbiota intestinal y la disponibilidad energética durante el crecimiento.

El tratamiento tuvo un efecto positivo sobre los niveles de corticosterona línea base al día 14. Al día 14, las crías del grupo FMT presentaron un 40% más altos en los niveles de corticosterona línea base en comparación con las crías del grupo control, aunque no se observaron diferencias significativas en el día 9. Esto sugiere que el efecto del tratamiento sobre los niveles de corticosterona podría no ser inmediato, y requerir un período de exposición a mediano plazo o prolongado al FMT. Se ha observado que el establecimiento y los efectos positivos de la microbiota intestinal sobre la masa y la supervivencia durante las primeras etapas de desarrollo en crías del carbonero común (*Parus major*) no son inmediatos, sino que pueden ser evidentes hasta 8 días después del nacimiento (Davidson y cols. 2021). Esto se debe a que la microbiota requiere un periodo de tiempo para establecerse y ejercer sus efectos en el hospedero. Asimismo, el trasplante de FMT, que implica transferir la microbiota intestinal de un donante al tracto gastrointestinal de un receptor, requiere de un lapso de tiempo para su establecimiento. Por ejemplo, Van Nood y cols. (2013) observaron que el uso de FMT fue altamente efectivo en la erradicación de infecciones por (*Clostridium difficile*), en humanos, con cambios en la composición de la microbiota que se estabilizaron a las tres semanas después del trasplante. De manera similar, Johansson y cols. (2015) observaron que la colonización de ratones libres de gérmenes con bacterias fecales de ratones C57BL/6 (fenotipo de moco normal) llevaba a cambios significativos en el metabolismo del huésped y la función de la barrera intestinal que surgían de 3 a 5 semanas después de la inoculación.

Nuestros resultados apoyan parcialmente la hipótesis de que la microbiota intestinal puede tener un papel en la regulación energética, lo cual está en línea con estudios anteriores en ratones de laboratorio. Al igual que nuestro estudio, que sugiere un efecto de la microbiota intestinal en los niveles de corticosterona, la investigación en ratones ha revelado que ésta puede influir en la modulación energética del hospedero a través de la absorción y el metabolismo de nutrientes (Rowland y cols., 2018). Por ejemplo, el trasplante de microbiota fecal de osos pardos a ratones resulta en una mayor acumulación de grasa en los ratones, lo cual destaca cómo la microbiota intestinal puede suplir las necesidades energéticas de etapas

específicas de los organismos, como la preparación para la hibernación (Sommer y cols. 2016). En particular, se ha observado que los metabolitos producidos por la microbiota intestinal, como los ácidos grasos de cadena corta, pueden influir directamente en la disponibilidad energética (Donohoe y cols. 2011). Adicionalmente, se ha reportado que las bacterias intestinales están involucradas en la regulación del metabolismo energético del huésped mediante la regulación del metabolismo de las vitaminas, especialmente las vitaminas B y K (Gao y cols. 2017). Aunque en nuestro estudio los efectos significativos se observaron únicamente en el día 14 y no en el día 9, este retraso podría ser indicativo de que los efectos de la microbiota intestinal en la regulación energética no se producen de manera inmediata, sino que requieren de un lapso de tiempo para hacerse evidentes.

El tratamiento no tuvo un efecto sobre el crecimiento. Se esperaba que las crías del grupo FMT presentaran una mayor tasa de crecimiento que las crías del grupo control. Esto debido a que la microbiota intestinal suplementada optimizaría la digestión y absorción de nutrientes, y consecuentemente, incrementaría los niveles de energía disponibles para el crecimiento. Sin embargo, no se observaron diferencias post-tratamiento en las medidas de crecimiento entre las crías del grupo FMT y el grupo control. Esto podría deberse a que las crías de aves altriciales suelen manifestar rasgos y estrategias de vida que se asocian a un síndrome de ritmo de vida rápido; esto incluye una elevada tasa de crecimiento, un alto metabolismo, una mayor mortalidad durante la juventud, madurez sexual temprana y una expectativa de vida reducida (Metcalf y Monaghan 2003; Merrill y cols. 2021). Estos rasgos que constituyen el síndrome de ritmo de vida rápido podrían restringir la capacidad de las crías para incrementar aún más su tasa de crecimiento en respuesta a un suplemento como el FMT, ya que es probable que estén alcanzando sus límites fisiológicos en cuanto a la rapidez de su desarrollo. Por ejemplo, Austin y cols. (2020) encontró que las crías de aves tropicales de latitudes bajas, que exhiben un ritmo de vida lento en promedio, presentaban un crecimiento embrionario y post-embrionario entre un 20% y 26% más lento en comparación con las crías de especies de aves templadas con ritmo de vida rápido (49 especies templadas y 153 especies tropicales). Estos resultados sugieren que las crías pueden estar limitadas por los límites fisiológicos de crecimiento de sus tejidos. En el caso de las especies de crecimiento lento, al invertir más en el mantenimiento y desarrollo sostenido de sus

estructuras corporales a lo largo de un período prolongado, no están presionadas para alcanzar su capacidad fisiológica máxima en un corto período. De este modo, estas especies mantienen un mayor margen en sus límites fisiológicos para ajustar sus tasas de crecimiento en respuesta a cambios en el ambiente o en la disponibilidad de recursos. Estas diferencias en las estrategias de vida y en la proximidad a los límites fisiológicos podrían explicar por qué las crías no mostraron un incremento en el crecimiento en respuesta a la inoculación con FMT.

Se ha sugerido que los individuos que crecen a un ritmo acelerado pueden tener una ventaja inicial en términos de tasa de supervivencia durante los primeros días de vida (Metcalf y Monaghan 2001; 2003). Sin embargo, se ha encontrado una relación negativa entre crecer rápido y la supervivencia a largo plazo; es decir, los individuos que crecen más rápido tienden a experimentar una mayor tasa de mortalidad en su etapa adulta, lo cual compromete su éxito reproductivo (Geiger y cols. 2012; Cartwright y cols. 2014). Esto es atribuido a las compensaciones (trade-offs) entre diferentes aspectos biológicos y estrategias de vida de los organismos (Metcalf y Monaghan 2001; Dmitriew 2011). Bajo esta premisa, la estrategia óptima de las crías desde la perspectiva de su aptitud biológica puede no ser maximizar la tasa de crecimiento, sino más bien, es posible que estén destinando más energía a emplumar más rápido y desarrollar órganos reproductivos en vez de propiciar un crecimiento somático adicional (Tatar y Carey 1995). Por tanto, a pesar de que el tratamiento con FMT tenga el potencial de mejorar la absorción de nutrientes, es probable que las crías no sean capaces de aprovechar estos recursos adicionales en favor de un crecimiento mayor. Adicionalmente, a pesar de que el aumento de la corticosterona línea base al día 14 en las crías del grupo FMT (40% más altos), podría indicar una mayor disponibilidad energética, es probable que no haya contribuido al crecimiento, ya que estaba fuera de la ventana de tiempo para influir sobre el tamaño corporal. A esta edad, las crías de *S. mexicana* están en la fase de emplumado y se preparan para dejar el nido a los 21 días (Porrás-Reyes y cols. 2020).

Estudios recientes en pollos domésticos han encontrado que los individuos que reciben un suplemento de FMT presentan un mayor rendimiento del crecimiento y ganancia de peso que los individuos controles durante las tres primeras semanas de vida; sin embargo, después

de las tres semanas de vida el rendimiento del crecimiento en los individuos del grupo FMT no es significativamente mayor que en el grupo de control (Yu y cols. 2021). Se ha sugerido que este efecto transitorio podría deberse a la presencia de bacterias beneficiosas en los FMT provenientes de donantes saludables, las cuales podrían estimular un mayor consumo de alimento y a la vez mejorar la digestión, aumentando la disponibilidad energética, y, en consecuencia, el crecimiento. No obstante, otros estudios han reportado evidencia opuesta sobre la manipulación de la microbiota intestinal en crías de aves silvestres. Por ejemplo, en crías del pingüino de Magallanes (*Spheniscus magellanicus*) y el gorrión doméstico (*Passer domesticus*) se encontró que la reducción experimental de la microbiota intestinal mediante la administración de antibióticos puede mejorar el crecimiento del huésped (Potti y cols. 2002; Kohl y cols. 2018). Se ha sugerido que este efecto puede ser debido a una disminución en la competencia entre el hospedero y la microbiota intestinal por los recursos nutricionales, permitiendo que el huésped invierta más energía hacia su propio crecimiento. Esto plantea el interrogante de si la diversidad microbiana en sí misma es siempre beneficiosa, o si la clave está en la presencia de ciertas especies microbianas beneficiosas, y no necesariamente en la diversidad general.

El tratamiento no tuvo un efecto sobre la respuesta al estrés a la edad de 14 días. Se esperaba que las crías del grupo FMT presentaran mayores niveles de corticosterona inducida. Aunque la suplementación del tratamiento no mostró un efecto directo en la respuesta al estrés, se encontró una interacción significativa entre el tratamiento y el orden en que las crías ingresaron a la prueba de estrés. Esto sugiere que el tiempo que cada cría pasó en la caja nido antes de ingresar a la prueba de estrés puede haber tenido una influencia en el efecto del tratamiento sobre la respuesta de estrés. Las crías de ambos grupos que ingresaron en primer lugar a la prueba de estrés (orden 1), y que por ende tuvieron un tiempo de espera más corto, tuvieron un aumento mayor en los niveles de corticosterona tras la prueba de estrés (Figura 2 y Anexo 1). Por otro lado, las crías de ambos grupos que ingresaron en segundo lugar a la prueba de estrés (orden 2), y las crías del grupo FMT que ingresaron en tercer lugar a la prueba de estrés (orden 3) no aumentaron sus niveles de corticosterona, lo que podría interpretarse como una respuesta de retroalimentación negativa por parte del eje HPA (Zimmer y cols. 2019). Esto podría deberse a que los niveles de corticosterona



inducidos podrían haber alcanzado un límite máximo, más allá del cual no aumentarían independientemente de la intensidad o duración del estresor como consecuencia de un efecto techo (Sapolsky y cols. 2000). El cual funciona como un mecanismo protector que previene los daños potenciales de mantener altos niveles de corticosterona, los cuales pueden ser perjudiciales para el organismo (Charmandari y cols. 2005).

Este efecto techo pudo haberse manifestado en las crías de ambos grupos que ingresaron a la prueba de estrés en el orden 2 y en las crías del grupo FMT que ingresaron en el orden 3. En el caso de las crías que ingresaron en el orden 2, a pesar de haber ingresado un tiempo después del orden 1, el intervalo transcurrido entre estos dos órdenes pudo no haber diferido y por ende sus niveles de corticosterona aun elevados mostraron una disminución. Por su parte, las crías del grupo FMT que ingresaron en el orden 2 y 3 ya mostraban niveles más altos de corticosterona línea base al día 14, lo que sugiere una limitación en su capacidad de aumentar la corticosterona inducida (Figura 2). Esto puede interpretarse como una respuesta del eje HPA para restaurar la homeostasis. Por el contrario, las crías del grupo control que ingresaron en el orden 3 tuvieron un aumento en los niveles de corticosterona, lo que podría ser atribuido a una menor disponibilidad de energía para responder al estrés, ya que el intervalo de tiempo entre el orden 1 y 3 fue mayor en comparación con el intervalo entre el orden 1 y 2.

De igual manera, el tipo de prueba o el tiempo de duración de la misma podría no haber sido suficiente para inducir una respuesta de estrés, tal como se ha observado en otras especies de aves. Por ejemplo, Pakkala y cols. (2013) realizaron un estudio experimental en palomas bravías (*Columba livia*) para evaluar cómo diferentes factores estresantes agudos afectan los niveles de corticosterona. El experimento consistió en tres protocolos de estrés diferentes: en el primero, similar a este estudio, las aves fueron colocadas en bolsas de tela durante 30 minutos (captura-restricción); en el segundo, se sujetó a las aves con arneses durante el mismo período de tiempo; y finalmente, en el tercer protocolo, las aves fueron expuestas a un ataque real pero no letal por parte de un depredador. A diferencia de nuestro estudio, el protocolo de captura-restricción sí indujo una respuesta de estrés, pero el ataque del depredador resultó en un aumento de más del doble en los niveles de corticosterona en comparación con el aumento observado con el protocolo de captura-restricción. Esto sugiere

que el tipo de estresor influye en la respuesta de corticosterona inducida. Algunos individuos pueden ser más sensibles o más resilientes al estrés en comparación con otros, exhibiendo respuestas de estrés más pronunciadas a estresores más amenazantes o relevantes para su supervivencia, y respuestas atenuadas a estresores menos relevantes. En el caso de las crías en nuestro estudio, la prueba de restricción dentro de una bolsa negra pudo haber sido percibida como una amenaza poco relevante. Esto podría deberse a que las cajas nido donde se encontraban las crías son oscuras en su interior, y trasladarlas a otro lugar oscuro no representaría un cambio relevante en su entorno. Dicho de otra manera, este estresor podría haber sido ecológicamente menos relevante para nuestro modelo, ya que las crías estarían naturalmente aclimatadas a condiciones oscuras y con posibilidades de movilidad restringidas similares a las de sus nidos.

Finalmente, la posibilidad de que el FMT haya representado un reto para las crías también debe ser considerada. Mientras que la hipótesis principal de este estudio fue que el FMT modificaría la disponibilidad energética a través de un aumento en la corticosterona línea base, el FMT podría haber introducido cambios desconocidos en la microbiota intestinal que podrían haber actuado como un reto. Los FMT pueden alterar la microbiota intestinal de los animales y, aunque a menudo se utilizan en medicina como una forma de restaurar una microbiota saludable, su impacto en un individuo en crecimiento con una microbiota en desarrollo puede ser impredecible (Borody y Khoruts 2012, Smits y cols. 2013). Las crías podrían haber experimentado estrés por enfermedad como resultado de la perturbación de su microbiota intestinal, lo que podría haber contribuido a incrementar los niveles de corticosterona línea base observados en el día 14. El hecho de que las crías que recibieron el FMT no mostraran efectos negativos en términos de tamaño y supervivencia, a pesar del incremento en los niveles de corticosterona línea base, es una evidencia notable de la resiliencia de las crías de *S. mexicana* en respuesta a desafíos ambientales, tal como se ha observado en otros estudios para la misma población con diferentes manipulaciones (Montoya y cols. 2020; Hernández y cols. 2022). A pesar de las alteraciones potenciales en su microbiota intestinal y los posibles efectos asociados al estrés, las crías fueron capaces de continuar su desarrollo y alcanzar el mismo tamaño que los controles. Esto habla de la notable capacidad de *S. mexicana* para hacer frente a los desafíos, y ofrece una visión interesante de

cómo la fisiología, la microbiota, y el ambiente interactúan para influir en el desarrollo y la supervivencia. Pese a que sólo identificamos un efecto del tratamiento sobre los niveles basales de corticosterona al día 14 (Figura 1c), se plantea la posibilidad que al extender la duración de la inoculación con FMT más días, se hubiera observado un efecto más marcado. No hubo consecuencias negativas derivadas de la administración de FMT, lo cual es relevante, considerando que existía la posibilidad de transferencia de microorganismos patógenos. Se requiere, por tanto, confirmar si hubo cambios en la composición de la microbiota de las crías que fueron inoculadas con FMT en comparación con las crías del grupo control, y evaluar la duración de cualquier cambio observado, en caso de que este haya tenido lugar, con el fin de entender más cabalmente los efectos y la relevancia de la microbiota intestinal en este contexto.

### **Conclusión y Perspectiva**

Los resultados indican que la manipulación de la microbiota intestinal influye en los niveles de corticosterona línea base, lo que apoya parcialmente la hipótesis de que la microbiota intestinal podría influir sobre la disponibilidad energética en el organismo. Sin embargo, no se encontraron efectos significativos de la manipulación de la microbiota intestinal en la respuesta al estrés, crecimiento y supervivencia de las crías. No obstante, se requiere confirmar los efectos del FMT en la microbiota intestinal de las crías, así como en la respuesta inmunitaria tras el tratamiento. Estos resultados son de particular interés porque nos permite comprender el papel de la microbiota intestinal como un componente vinculado con la regulación energética y la homeostasis de los organismos.

### **Referencias**

- Austin, S. H., Robinson, W. D., Robinson, T. R., Ellis, V. A., & Ricklefs, R. E. (2020). Development syndromes in New World temperate and tropical songbirds. *Plos one*, *15*(8), e0233627. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233627>
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy, A., ... & Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the national academy of sciences*, *101*(44), 15718-15723. <https://doi.org/10.1073/pnas.040707610>
- Badii, M. H., Rodríguez, H., Cerna, E., Ochoa, Y., Landeros, J., & Valenzuela, J. (2013). Estrategias de Historia de Vida Life History Strategies. *Daena: International Journal of Good Conscience*, *8*(1), 94-102.

- Béziers, P., San-Jose, L. M., Almasi, B., Jenni, L., & Roulin, A. (2019). Baseline and stress-induced corticosterone levels are heritable and genetically correlated in a barn owl population. *Heredity*, *123*(3), 337-348. <https://doi.org/10.1038/s41437-019-0203-5>
- Breuner, C. W., Delehanty, B., & Boonstra, R. (2013). Evaluating stress in natural populations of vertebrates: total CORT is not good enough. *Functional Ecology*, *27*(1), 24-36. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12016>
- Byrne, C. S., Chambers, E. S., Morrison, D. J., & Frost, G. (2015). The role of short chain fatty acids in appetite regulation and energy homeostasis. *International journal of obesity*, *39*(9), 1331-1338. <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.84>
- Bonier, F., Martin, P. R., Moore, I. T., & Wingfield, J. C. (2009). Do baseline glucocorticoids predict fitness?. *Trends in ecology & Evolution*, *24*(11), 634-642. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.04.013>
- Borody, T. J., & Khoruts, A. (2012). Fecal microbiota transplantation and emerging applications. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, *9*(2), 88-96. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2011.244>
- Cartwright, S. J., Nicoll, M. A., Jones, C. G., Tatayah, V., & Norris, K. (2014). Anthropogenic natal environmental effects on life histories in a wild bird population. *Current Biology*, *24*(5), 536-540. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.01.040>
- Charmandari, E., Tsigos, C., & Chrousos, G. (2005). Endocrinology of the stress response. *Annu. Rev. Physiol.*, *67*, 259-284. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.67.040403.120816>
- Chen, C. Y., Chen, C. K., Chen, Y. Y., Fang, A., Shaw, G. T. W., Hung, C. M., & Wang, D. (2020). Maternal gut microbes shape the early-life assembly of gut microbiota in passerine chicks via nests. *Microbiome*, *8*(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00896-9>
- Cottrell, E. C., & Seckl, J. (2009). Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of adult disease. *Frontiers in behavioral neuroscience*, *3*, 19. <https://doi.org/10.3389/neuro.08.019.2009>
- Cox, L. M., Yamanishi, S., Sohn, J., Alekseyenko, A. V., Leung, J. M., Cho, I., ... & Blaser, M. J. (2014). Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences. *Cell*, *158*(4), 705-721.
- Clinchy, M., Zanette, L., Boonstra, R., Wingfield, J. C., & Smith, J. N. (2004). Balancing food and predator pressure induces chronic stress in songbirds. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *271*(1556), 2473-2479. <https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2913>
- Creel, S. (2001). Social dominance and stress hormones. *Trends in ecology & evolution*, *16*(9), 491-497. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02227-3](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02227-3)

- Crespi, E. J., Williams, T. D., Jessop, T. S., & Delehanty, B. (2013). Life history and the ecology of stress: how do glucocorticoid hormones influence life-history variation in animals?. *Functional Ecology*, 27(1), 93-106. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12009>
- Cryan, J. F., O'Riordan, K. J., Cowan, C. S., Sandhu, K. V., Bastiaanssen, T. F., Boehme, M., ... & Dinan, T. G. (2019). The microbiota-gut-brain axis. *Physiological reviews*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2018>
- Davidson, G. L., Somers, S. E., Wiley, N., Johnson, C. N., Reichert, M. S., Ross, R. P., ... & Quinn, J. L. (2021). A time-lagged association between the gut microbiome, nestling weight and nestling survival in wild great tits. *Journal of Animal Ecology*, 90(4), 989-1003. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13428>
- Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2017). The microbiome-gut-brain axis in health and disease. *Gastroenterology Clinics*, 46(1), 77-89. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2016.09.007>
- Dmitriew, C. M. (2011). The evolution of growth trajectories: what limits growth rate?. *Biological Reviews*, 86(1), 97-116. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2010.00136.x>
- Domínguez-Godoy, M. A., Hudson, R., Pérez-Mendoza, H. A., Ancona, S., & de la Vega, A. H. D. (2020). Living on the edge: lower thermal quality but greater survival probability at a high altitude mountain for the mesquite lizard (*Sceloporus grammicus*). *Journal of Thermal Biology*, 94, 102757.
- Donohoe, D. R., Garge, N., Zhang, X., Sun, W., O'Connell, T. M., Bunger, M. K., & Bultman, S. J. (2011). The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell metabolism*, 13(5), 517-526. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.02.018>
- Fetissov, S. O. (2017). Role of the gut microbiota in host appetite control: bacterial growth to animal feeding behaviour. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(1), 11-25. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.150>
- Funkhouser, L. J., & Bordenstein, S. R. (2013). Mom knows best: the universality of maternal microbial transmission. *PLoS biology*, 11(8), e1001631. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001631>
- Foster, J. A., Rinaman, L., & Cryan, J. F. (2017). Stress & the gut-brain axis: regulation by the microbiome. *Neurobiology of stress*, 7, 124-136. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2017.03.001>
- Fluitman, K. S., De Clercq, N. C., Keijser, B. J., Visser, M., Nieuwdorp, M., & IJzerman, R. G. (2017). The intestinal microbiota, energy balance, and malnutrition: emphasis on the role of short-chain fatty acids. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*, 12(3), 215-226. <https://doi.org/10.1080/17446651.2017.1318060>

- Gao, P., Ma, C., Sun, Z., Wang, L., Huang, S., Su, X., ... & Zhang, H. (2017). Feed-additive probiotics accelerate yet antibiotics delay intestinal microbiota maturation in broiler chicken. *Microbiome*, 5(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0315-1>
- Geiger, S., Le Vaillant, M., Lebard, T., Reichert, S., Stier, A., Le Maho, Y., & Criscuolo, F. (2012). Catching-up but telomere loss: half-opening the black box of growth and ageing trade-off in wild king penguin chicks. *Molecular Ecology*, 21(6), 1500-1510.
- Guo, W., Ren, K., Ning, R., Li, C., Zhang, H., Li, D., ... & Dai, M. (2020). Fecal microbiota transplantation provides new insight into wildlife conservation. *Global Ecology and Conservation*, e01234. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2020.e01234>
- Heimbürge, S., Kanitz, E., & Otten, W. (2019). The use of hair cortisol for the assessment of stress in animals. *General and Comparative Endocrinology*, 270, 10-17. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.09.016>
- Hernández, A., Hernández-Martínez, A., Nicolás, L., Torres, R., & Montoya, B. (2022). Competitive events during nest-building influence offspring growth and behaviour, but not testosterone deposition in the egg yolk in Western Bluebirds (*Sialia mexicana*). *Ibis*, 164(4), 1049-1062. <https://doi.org/10.1111/ibi.13098>
- Houtz, J. L., Taff, C. C., & Vitousek, M. N. (2022). Gut Microbiome as a Mediator of Stress Resilience: A Reactive Scope Model Framework. *Integrative and Comparative Biology*, 62(1), 41-57. <https://doi.org/10.1093/icb/icac030>
- Johansson, M. E., Jakobsson, H. E., Holmén-Larsson, J., Schütte, A., Ermund, A., Rodríguez-Piñero, A. M., ... & Hansson, G. C. (2015). Normalization of host intestinal mucus layers requires long-term microbial colonization. *Cell host & microbe*, 18(5), 582-592. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.10.007>
- Kohl, K. D., Brun, A., Bordenstein, S. R., CAVIEDES-VIDAL, E., & Karasov, W. H. (2018). Gut microbes limit growth in house sparrow nestlings (*Passer domesticus*) but not through limitations in digestive capacity. *Integrative zoology*, 13(2), 139-151. <https://doi.org/10.1111/1749-4877.12289>
- Kitaysky, A. S., Piatt, J. F., Hatch, S. A., Kitaiskaia, E. V., Benowitz-Fredericks, Z. M., Shultz, M. T., & Wingfield, J. C. (2010). Food availability and population processes: severity of nutritional stress during reproduction predicts survival of long-lived seabirds. *Functional Ecology*, 24(3), 625-637. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2009.01679.x>
- Ley, R. E., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, 124(4), 837-848. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.017>
- Lindström, J. (1999). Early development and fitness in birds and mammals. *Trends in ecology & evolution*, 14(9), 343-348.

- Liu, X., Nagy, P., Bonfini, A., Houtz, P., Bing, XL, Yang, X. y Buchon, N. (2022). Los microbios afectan la composición de las células epiteliales intestinales a través de la regulación inmunodependiente de la diferenciación de las células madre intestinales. *Informes celulares*, 38 (13), 110572. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110572>
- López-García, K., Cuevas, E., Corona-Quintanilla, D. L., Jiménez-Estrada, I., Martínez-Gómez, M., & Castelán, F. (2013). Effect of multiparity on morphometry and oestrogen receptor expression of pelvic and perineal striated muscles in rabbits: is serum oestradiol relevant?. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 169(1), 113-120. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2013.03.032>
- Luo, Y., Zeng, B., Zeng, L. I., Du, X., Li, B. O., Huo, R., ... & Xie, P. (2018). Gut microbiota regulates mouse behaviors through glucocorticoid receptor pathway genes in the hippocampus. *Translational psychiatry*, 8(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0240-5>
- McEwen, B. S., & Wingfield, J. C. (2003). The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and behavior*, 43(1), 2-15. [https://doi.org/10.1016/S0018-506X\(02\)00024-7](https://doi.org/10.1016/S0018-506X(02)00024-7)
- Merrill, L., Jones, T. M., Brawn, J. D., & Ward, M. P. (2021). Early-life patterns of growth are linked to levels of phenotypic trait covariance and postfledging mortality across avian species. *Ecology and Evolution*, 11(22), 15695-15707.
- Metcalf, N. B., & Monaghan, P. (2001). Compensation for a bad start: grow now, pay later?. *Trends in ecology & evolution*, 16(5), 254-260. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02124-3](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02124-3)
- Metcalf, N. B., & Monaghan, P. (2003). Growth versus lifespan: perspectives from evolutionary ecology. *Experimental gerontology*, 38(9), 935-940. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(03\)00159-1](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(03)00159-1)
- Monaghan, P. (2008). Early growth conditions, phenotypic development and environmental change. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1497), 1635-1645. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.0011>
- Monaghan, P., & Haussmann, M. F. (2015). The positive and negative consequences of stressors during early life. *Early Human Development*, 91(11), 643-647. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.08.008>
- Montoya, B., Ancona, S., Beamonte-Barrientos, R., & Martínez-Gómez, M. (2020). Does vitamin E supplementation enhance growth benefits of breeding helpers at no oxidative costs?. *Physiological and Biochemical Zoology*, 93(1), 37-48. <http://dx.doi.org/10.1086/706464>
- Musick, T. 2002. "*Sialia mexicana*" (On-line), Animal Diversity Web. Consultado el 27 de abril de 2023 en [https://animaldiversity.org/accounts/Sialia\\_mexicana/](https://animaldiversity.org/accounts/Sialia_mexicana/)

- Noguera, J. C., Aira, M., Pérez-Losada, M., Domínguez, J., & Velando, A. (2018). Glucocorticoids modulate gastrointestinal microbiome in a wild bird. *Royal Society open science*, 5(4), 171743. <https://doi.org/10.1098/rsos.171743>
- O'Riordan, K. J., Collins, M. K., Moloney, G. M., Knox, E. G., Aburto, M. R., Fülling, C., ... & Cryan, J. F. (2022). Short chain fatty acids: microbial metabolites for gut-brain axis signalling. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 111572. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2022.111572>
- Ouyang, J. Q., Quetting, M., & Hau, M. (2012). Corticosterone and brood abandonment in a passerine bird. *Animal Behaviour*, 84(1), 261-268. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2012.05.006>
- Ouyang, J. Q., Muturi, M., Quetting, M., & Hau, M. (2013). Small increases in corticosterone before the breeding season increase parental investment but not fitness in a wild passerine bird. *Hormones and Behavior*, 63(5), 776-781. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.03.002>
- Pakkala, J. J., Norris, D. R., & Newman, A. E. (2013). An experimental test of the capture-restraint protocol for estimating the acute stress response. *Physiological and Biochemical Zoology*, 86(2), 279-284
- Petrullo, L., Ren, T., Wu, M., Boonstra, R., Palme, R., Boutin, S., ... & Dantzer, B. (2022). Glucocorticoids coordinate changes in gut microbiome composition in wild North American red squirrels. *Scientific reports*, 12(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06359-5>
- Porrás-Reyes, B., Ancona, S., Ríos-Chelén, A. A., Bautista, A., & Montoya, B. (2021). Sex bias in parental care is associated with brood age and fledglings' growth rate in Western Bluebirds *Sialia mexicana*. *Journal of Ornithology*, 162(2), 409-419. <https://doi.org/10.1007/s10336-020-01836-y>
- Potti, J., Moreno, J., Yorio, P., Briones, V., García-Borboroglu, P., Villar, S., & Ballesteros, C. (2002). Bacteria divert resources from growth for magellanic penguin chicks. *Ecology Letters*, 5(6), 709-714. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2002.00375.x>
- Ritchison, G. (2000). Eastern Bluebird. Stackpole Books.
- Romero, L. M. (2002). Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. *General and comparative endocrinology*, 128(1), 1-24. [https://doi.org/10.1016/S0016-6480\(02\)00064-3](https://doi.org/10.1016/S0016-6480(02)00064-3)
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2008.12.009>
- Rowland, I., Gibson, G., Heinken, A., Scott, K., Swann, J., Thiele, I., & Tuohy, K. (2018). Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *European journal of nutrition*, 57, 1-24. <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1445-8>



- Sapolsky, R. M., Romero, L. M., & Munck, A. U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine reviews*, *21*(1), 55-89. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.1.0389>
- Schmidt, K. L., MacDougall-Shackleton, E. A., & MacDougall-Shackleton, S. A. (2012). Developmental stress has sex-specific effects on nestling growth and adult metabolic rates but no effect on adult body size or body composition in song sparrows. *Journal of Experimental Biology*, *215*(18), 3207-3217. <https://doi.org/10.1242/jeb.068965>
- Searcy, W. A., Peters, S., & Nowicki, S. (2004). Effects of early nutrition on growth rate and adult size in song sparrows *Melospiza melodia*. *Journal of Avian Biology*, *35*(3), 269-279. <https://doi.org/10.1111/j.0908-8857.2004.03247.x>
- Seegerstrom, S. C., & Miller, G. E. (2004). Psychological stress and the human immune system: a meta-analytic study of 30 years of inquiry. *Psychological bulletin*, *130*(4), 601. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.130.4.601>
- Siegerstetter, S. C., Petri, R. M., Magowan, E., Lawlor, P. G., Zebeli, Q., O'Connell, N. E., & Metzler-Zebeli, B. U. (2018). Fecal microbiota transplant from highly feed-efficient donors shows little effect on age-related changes in feed-efficiency-associated fecal microbiota from chickens. *Applied and environmental microbiology*, *84*(2), e02330-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02330-17>
- Smits, L. P., Bouter, K. E., De Vos, W. M., Borody, T. J., & Nieuwdorp, M. (2013). Therapeutic potential of fecal microbiota transplantation. *Gastroenterology*, *145*(5), 946-953. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.08.058>
- Sommer, F., Ståhlman, M., Ilkayeva, O., Arnemo, J. M., Kindberg, J., Josefsson, J., ... & Bäckhed, F. (2016). The gut microbiota modulates energy metabolism in the hibernating brown bear *Ursus arctos*. *Cell reports*, *14*(7), 1655-1661. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.026>
- Stearns, S. C. (1992). *The evolution of life histories* (Vol. 249, p. xii). Oxford: Oxford university press.
- Tatar, M., & Carey, J. R. (1995). Nutrition mediates reproductive trade-offs with age-specific mortality in the beetle *Callosobruchus maculatus*. *Ecology*, *76*(7), 2066-2073. <https://doi.org/10.2307/1941681>
- Therneau, T. M. (2015). Package 'coxme'. *R package version*, *2*(5).
- Therneau, T. M., & Lumley, T. (2015). Package 'survival'. *R Top Doc*, *128*(10), 28-33.
- Tolhurst, G., Heffron, H., Lam, Y. S., Parker, H. E., Habib, A. M., Diakogiannaki, E., ... & Gribble, F. M. (2012). Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes*, *61*(2), 364-371. <https://doi.org/10.2337/db11-1019>
- Tremaroli, V., & Bäckhed, F. (2012). Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, *489*(7415), 242-249. <https://doi.org/10.1038/nature11552>

- van Bodegom, M., Homberg, J. R., & Henckens, M. J. (2017). Modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by early life stress exposure. *Frontiers in cellular neuroscience*, *11*, 87. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00087>
- Van Nood, E., Vrieze, A., Nieuwdorp, M., Fuentes, S., Zoetendal, E. G., de Vos, W. M., ... & Keller, J. J. (2013). Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *New England Journal of Medicine*, *368*(5), 407-415. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1205037>
- Vera-Ponce de León, A., Jahnes, B. C., Otero-Bravo, A., & Sabree, Z. L. (2021). Microbiota Perturbation or Elimination Can Inhibit Normal Development and Elicit a Starvation-Like Response in an Omnivorous Model Invertebrate. *Msystems*, *6*(4), e00802-21. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00802-21>
- Voss, M., Shutler, D., & Werner, J. (2010). A hard look at blood sampling of birds. *The Auk*, *127*(3), 704-708. <https://doi.org/10.1525/auk.2010.10033>
- Warne, R. W., Kirschman, L., & Zeglin, L. (2017). Manipulation of gut microbiota reveals shifting community structure shaped by host developmental windows in amphibian larvae. *Integrative and comparative biology*, *57*(4), 786-794. <https://doi.org/10.1093/icb/ixc100>
- Warne, R. W., Kirschman, L., & Zeglin, L. (2019). Manipulation of gut microbiota during critical developmental windows affects host physiological performance and disease susceptibility across ontogeny. *Journal of Animal Ecology*, *88*(6), 845-856. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12973>
- Yano, J. M., Yu, K., Donaldson, G. P., Shastri, G. G., Ann, P., Ma, L., ... & Hsiao, E. Y. (2015). Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell*, *161*(2), 264-276. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.047>
- Yu, J., Zhou, Y., Wen, Q., Wang, B., Gong, H., Zhu, L., ... & Wu, M. (2021). Effects of faecal microbiota transplantation on the growth performance, intestinal microbiota, jejunum morphology and immune function of laying-type chicks. *Animal Production Science*, *62*(4), 321-332. <https://doi.org/10.1071/AN21093>
- Zimmer, C., Taff, C. C., Ardia, D. R., Ryan, T. A., Winkler, D. W., & Vitousek, M. N. (2019). On again, off again: acute stress response and negative feedback together predict resilience to experimental challenges. *Functional Ecology*, *33*(4), 619-628. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13281>

## Anexo

**Anexo 1.** Prueba post-hoc del efecto del tratamiento sobre el índice de cambio en los niveles de corticosterona antes versus después de la prueba de estrés al día 14 (cort inducida día 14 – cort línea base día 14/ cort línea base día 14) (n = 43 crías: 22 controles y 21 experimentales; n = 24 nidos: 12 controles y 12 experimentales). En negritas se muestra los contrastes significativos.

Contraste	Estimado ± Error	<i>Gl. Den</i>	<i>t</i>	<i>P</i>
Control Orden1 - FMT Orden1	0.0129 ± 0.0341	33.7	0.379	0.9989
<b>Control Orden1 - Control Orden2</b>	<b>0.1097 ± 0.0340</b>	<b>30.8</b>	<b>3.229</b>	<b>0.0319</b>
Control Orden1 - FMT Orden2	0.0879 ± 0.0400	34.9	2.201	0.2631
Control Orden1 - Control Orden3	0.0229 ± 0.0359	27.8	0.640	0.9869
Control Orden1 - FMT Orden3	0.1346 ± 0.0361	34.4	3.727	0.0084
FMT Orden1 - Control Orden2	0.0968 ± 0.0338	34.4	2.862	0.0710
FMT Orden1 - FMT Orden2	0.0750 ± 0.0389	32.8	1.928	0.4040
FMT Orden1 - Control Orden3	0.0100 ± 0.0371	32.5	0.270	0.9998
<b>FMT Orden1 - FMT Orden3</b>	<b>0.1217 ± 0.0337</b>	<b>32.6</b>	<b>3.606</b>	<b>0.0120</b>
Control Orden2 - FMT Orden2	-0.0218 ± 0.0384	34.9	-0.569	0.9925
Control Orden2 - Control Orden3	-0.0868 ± 0.0345	30.7	-2.515	0.1509
Control Orden2 - FMT Orden3	0.0249 ± 0.0348	34.8	0.716	0.9788
FMT Orden2 - Control Orden3	-0.0650 ± 0.0415	34.2	-1.568	0.6245
FMT Orden2 - FMT Orden3	0.0467 ± 0.0375	20.6	1.244	0.8103
Control Orden3 - FMT Orden3	0.1117 ± 0.0383	33.9	2.919	0.0629