

Efecto del estrés y del enriquecimiento ambiental temprano sobre parámetros de inmunidad celular de codornices japonesas juveniles

Effect of stress and early environmental enrichment on cellular immunity of juvenile Japanese quail

Nazar¹, F.N. y Marín, R.H.

Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba

Resumen

El estudio del estrés en aves de granja reviste gran interés ya que está relacionado negativamente con su bienestar y habilidad para enfrentar cambios ambientales. En las últimas décadas surge el uso del Ambiente Enriquecido (AE) para prevenir los efectos deletéreos del estrés. En éste trabajo se evaluaron parámetros de inmunidad celular en grupos mixtos de codornices criadas desde su eclosión en un AE, en aves expuestas a estrés crónico y combinando ambas condiciones. El objetivo fue determinar si el AE presenta efectos inmunoactivadores en las aves y si estos efectos pueden compensar la inmunodepresión que induce el estrés. Se alojaron codornices japonesas al azar en 12 habitáculos con temperatura y fotoperíodo controlados y acceso libre a agua y comida. Las aves fueron asignadas a uno de cuatro tratamientos que combinó los efectos del enriquecimiento ambiental (con vs. sin enriquecimiento) y de la exposición a un estrés crónico (con vs. sin estrés). Como estresor se empleó inmovilización parcial durante 15 minutos, aplicado durante 10 días consecutivos (día 33 al 42 de edad). Luego se realizaron las siguientes pruebas de inmunidad: porcentaje de linfocitos, relación heterófilo/linfocitaria (H/L) y análisis de hipersensibilidad demorada (AHD). Los resultados obtenidos indican que el estrés influye sobre el recuento leucocitario y el AHD disminuyendo ambos parámetros. El AE también influyó sobre los parámetros de un modo independiente al estrés y en sentido inverso. Se observó además que aves estresadas y criadas en un ambiente no enriquecido manifiestan valores más elevados de relación H/L. Esto sugiere que el AE podría ser empleado para mejorar el estado inmunológico de las aves durante su cría ayudando incluso a reducir las consecuencias negativas que el estrés presenta sobre su sistema inmune.

Palabras clave: estrés crónico, sistema inmune, enriquecimiento ambiental, aves de corral.

Summary

Stress compromises a variety of conditions or forces that affect an organism and lessen animal's welfare. This study evaluates the effect of stress combined with an early enrichment of the rearing environment on the cellular immune response of juvenile Japanese quail. Immediately after hatch, half of the birds were assigned to enriched and the other half to not enriched boxes,

Recibido: mayo de 2010

Aceptado: mayo 2011

1. Biólogo. Ciencia Avícola. ICTA - Edificio de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas. Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. UNC. Avenida Velez Sarsfield 1611 (X5016GCA). Córdoba. Argentina. niconazar@yahoo.com.ar

in mixed-sex groups. Half of the birds in the enriched boxes and half of the bird corresponding to the not enriched boxes were daily restrained for 15 min during ten days (stressed from day 33 to 42 of age). The inflammatory response (lymphoproliferative to phytohemagglutinin-p), percentage of lymphocytes and heterophil/lymphocyte ratio were assessed. The enrichment of the rearing environment produced immune activation or compensation of the suppressive effects that the stress exposure showed on every parameter. The results suggest that an early enrichment of the rearing environment is an effective modulator of the immune response, and that it may help counteract some of the immunological negative consequences of the stress.

Key words: stress, immune system, environmental enrichment, poultry.

Introducción

Las prácticas de manejo avícolas implican manipulaciones y procedimientos que resultan estresantes para las aves. De Kloet (2003) propone definir al estrés como un sistema que orquesta las respuestas del organismo a diversos estímulos ambientales. El estrés puede clasificarse como de tipo agudo o crónico, de acuerdo a si los animales son respectivamente expuestos una o más veces a los eventos estresantes (Tome, 1984).

Entre las reacciones que más interfieren sobre la producción avícola se encuentran el miedo y la ansiedad (Jones, 1996). El desencadenamiento de estos y de la respuesta de estrés inhibe otros sistemas y sus comportamientos asociados (Jones, 1996; Mormede et al., 2007). Esto implica una menor habilidad para adaptarse a los cambios ambientales, para interactuar exitosamente y para utilizar recursos (pérdidas de energía, disminución en crecimiento y producción, etc) (Marín et al., 1999; Jones et al., 1999).

A nivel sistémico, la respuesta de estrés involucra cambios de orden neuroendócrino siendo el eje Hipotálamo-Pituitario-Adrenal (HPA) un ejemplo, incrementando finalmente la liberación de glucocorticoides (GC) (Marín y Arce, 1996; Mormede et al., 2007). El sistema inmune (SI) es uno de los sistemas afectados por el estrés (Dohms y Metz, 1991; Muma et al., 2006); ejemplos de esto son: la depresión a nivel celular inducida por baja temperatura de crianza (Rybakina et al., 1997), la depresión en la respuesta celular de cisnes de collar pichones sometidos a competencia por recursos alimenticios (Eraud et al., 2008), la disminución en la producción de

anticuerpos en gallinas ponedoras tratadas con hormona adrenocorticotrófica (Odihambo et al., 2006), entre otros.

En los últimos años surge el uso de un "Ambiente Enriquecido" (AE) intentando prevenir algunos de los efectos deletéreos del estrés (Marashi et al., 2002; Miller et al., 2005). La práctica consiste en modificar el espacio que los animales habitan, proveyendo la posibilidad de desarrollar nuevos comportamientos. Las modificaciones definen cuatro categorías de enriquecimiento: estructural, sensorial, de contacto y social (Miller et al., 2005), pudiendo desarrollarse enriquecimientos mixtos. Diversos registros de los efectos del AE sobre animales sometidos a estrés incluyen: disminución en los niveles de ansiedad en codornices japonesas (Fox et al., 2006; Miller et al., 2005) y reducción de comportamientos anormales y estereotipados en gallinas ponedoras (Huber-Eicher et al., 1998). Estas diferencias comportamentales implicarían diferencias en la fisiología de la respuesta de estrés y sería posible pensar que el AE puede también influir sobre el SI. Marashi et al. (2002) evaluaron parámetros inmunes en mamíferos concluyendo que existe una modulación no consistente por el AE. Por su parte, Huff et al. (2003) observaron que el enriquecimiento de recambio diario podría traducirse en perjuicios al SI de pavos.

En base a lo previamente desarrollado, en el presente trabajo se analiza si el AE desde edades tempranas induce cambios en el SI de codornices y si la exposición a un estrés crónico por inmovilización puede interactuar con dicha respuesta. Se midió inmunidad celular mediante un análisis de hipersensibili-

dad demorada (AHD) ante la inyección de fitohemaglutinina-P (PHA-P) (Stadecker et al., 1977) y a través de extendidos de sangre (recuento e identificación de leucocitos).

Materiales y Métodos

Cría de animales y tratamientos.

Los estudios se desarrollaron en codornices japonesas debido a que no solo son una especie importante en la agricultura en numerosos países (Baumgartner, 1994), sino que además son consideradas un excelente modelo de laboratorio para la extrapolación de datos a otras especies de aves de granja de mayor importancia comercial (como el pollo doméstico) debido a su alta similitud fisiológica (Huss et al., 2008; Wilson et al., 1961).

Inmediatamente luego de la eclosión, 180 aves fueron alojadas al azar en uno de 12 habitáculos de 90 x 45 x 60 cm (largo x ancho x alto) (15 animales por habitáculo). El ciclo de luz-oscuridad empleado fue de 14 horas de luz y 10 de oscuridad. Las luces se encendían a las 06:00 h. El manejo de la temperatura se realizó de acuerdo al método descrito por Shanaway (1994). La humedad relativa varió entre el 50 y 60%. El agua y el alimento balanceado para codornices fueron provistos libremente empleando un comedero que abarcaba todo el frente de la caja de cría y ocho bebederos automáticos de tipo "nipple" por caja. La composición del alimento fue de 20% (como mínimo) de proteínas crudas y un rendimiento energético de 2.900 kcal/kg.

Para éste estudio se utilizaron cinco animales de cada habitáculo y los restantes se emplearon para mantener una densidad de aves similar a la que se emplea en las baterías de codornices destinadas a la producción de huevos (Shanaway, 1994). Desde el día posterior a su nacimiento los animales fueron alojados en grupos mixtos en uno de cuatro ambientes de cría que difirieron en los tratamientos a recibir, a saber: "ambiente enriquecido y estrés"; "ambiente enriquecido y sin estrés"; "ambiente no enriquecido y estrés"; "ambiente no enriquecido y sin estrés".

Para la correcta identificación de cada animal, a los 28 días de edad se le colocó a cada ave una banda numerada en el ala derecha. Se realizaron tres réplicas de cada uno de los cuatro tratamientos, ocupando así los 12 habitáculos de cría mencionados anteriormente y conformando un total de 60 animales estudiados (15 de cada uno de los cuatro tratamientos, cinco aves de cada una de las réplicas).

El enriquecimiento ambiental aplicado consistió de tres tipos diferentes, uno estructural, uno de contacto y uno mixto. Los grupos de enriquecimiento estuvieron dispuestos en las cajas de cría correspondientes desde el momento en que los animales fueron alojados. Se empleó una rotación semanal hasta los 42 días de edad (cinco rotaciones en total) extendiéndose el enriquecimiento hasta el final de la experiencia (49 días). Así, se intentó reducir el acostumbamiento de los animales a cada tipo de enriquecimiento y al mismo tiempo evitar el disturbio y potencial estrés asociado al recambio de los elementos de enriquecimiento (Huff et al., 2003).

El estresor que se utilizó fue de tipo crónico por inmovilización mecánica parcial durante 15 minutos por día. Se implementó previo al inicio de las pruebas inmunológicas (ver abajo) y durante 10 días consecutivos (desde el día 33 al 42). La inmovilización consistió en restringir el movimiento del animal de tal manera que no pueda abrir las alas ni escaparse, pero si pueda mover la cabeza y patas (Jones et al., 2000). Este tipo de estresor ya ha sido demostrado que induce una respuesta de estrés en codornices (Satterlee y Johnson, 1988).

Estudios inmunológicos.

Análisis de hipersensibilidad tardía: A los 43 días de edad se realizó una inyección de 0,075 ml de una solución de PHA-P (100 ug/ml) en la zona periférica a la vena braquial del ala derecha para analizar inmunidad celular. El calibre de la zona inyectada se midió con micrómetro inmediatamente después a la inyección y luego a las 24 horas

para poder hacer el análisis de hipersensibilidad tardía (Stadecker et al., 1977).

Determinación de parámetros sanguíneos e inducción de respuesta inmune: A los 43 días de edad también se les administró a las aves una inyección intraperitoneal de una suspensión al 10% de glóbulos rojos de oveja en buffer fosfato salino para estimular la producción de inmunoglobulinas contra el antígeno. Se extrajo sangre por punción de la vena braquial del ala izquierda antes y una semana después de la inyección (día 49 de edad), para realizar frotis de sangre pre y post estímulo con el antígeno ya mencionado y analizar en los mismos porcentaje de linfocitos y relación heterófilo/linfocito (H/L), parámetro indicativo de estrés en aves (Gross y Siegel, 1993).

Análisis estadísticos.

Las valores obtenidos de los parámetros sanguíneos y de las zonas con hipersensibilidad dentro de cada réplica fueron promediados entre si y considerados como una unidad experimental a los efectos del análisis estadístico. Los valores de cada una de las variables obtenidas de cada una de las replicas fueron evaluados mediante ANOVAs de dos vías que consideraron los efectos de los factores enriquecimiento ambiental (con enriquecimiento vs sin enriquecimiento), estrés (con estrés vs sin estrés) y su interacción. La prueba de FisherLSD fue empleada para la comparación de medias individuales *a posteriori*. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado como representante de diferencias significativas.

Resultados y Discusión

En el presente trabajo se evalúan los efectos del AE en conjunción con los efectos de la exposición a un estrés crónico sobre parámetros de inmunidad celular en codornices japonesas. En el AHD (ver Cuadro 1, % de inflamación) se observa que los mecanismos de respuesta inflamatoria se muestran afectados significativamente tanto por situaciones de estrés crónico como por el desarrollo de las aves en un AE. Si bien no se detectó

una interacción significativa entre los efectos del estrés y el enriquecimiento, interesante-mente, los animales que se desarrollaron sin enriquecimiento y fueron estresados presentaron la menor de las respuestas a la inyección PHA-P. Esto confirma que un estrés crónico afecta negativamente el componente celular de la inmunidad como ha sido afirmado por otros investigadores (Dhabhar et al. 1995; 1996). Es probable que este efecto se deba a que en estas aves se liberan mayores cantidades de glucocorticoides al torrente sanguíneo, producto del estrés mismo, tal como en bibliografía se informa que ocurre en respuesta a este mismo estresor (Satterlee y Johnson, 1988). Por su parte y de manera coherente con los resultados, los GCs presentan acción anti-inflamatoria y retrasan los mecanismos de migración y reclutamiento de células del SI (Dhabhar et al., 1997). Según la interpretación de estos resultados, el enriquecimiento ambiental habría permitido mejorar la respuesta inflamatoria de las aves.

Al analizar el porcentaje de linfocitos (Cuadro 1, % de linfocitos) se puede notar que los animales no estresados y enriquecidos mantienen el 100% de linfocitos post estrés. El grupo con mayor caída en el porcentaje analizado es el correspondiente a los animales sin enriquecimiento ambiental y a los cuales se les desarrolló el protocolo de estrés. Nuevamente, a pesar de la ausencia de interacción significativa entre los tratamientos, las aves correspondientes a los tratamientos "Ambiente enriquecido y estrés" y "Ambiente no enriquecido y sin estrés" conforman un grupo con respuesta intermedia a los otros grupos ya mencionados. Nuestros resultados sugieren que hay una caída en el porcentaje de linfocitos en los animales que se constituyen en el control, es decir aquellos no enriquecidos y no estresados. Éste valor de caída del porcentaje de linfocitos de aproximadamente 26% es similar al del grupo de animales estresados y criados con enriquecimiento ambiental, lo cual implicaría que el AE llevaría a los animales estresados a condiciones similares (respecto a sus poblaciones linfocitarias) a las de los animales controles, compensando así los efectos del estrés.

Cuadro 1: Efecto del ambiente enriquecido temprano y de un estrés por inmovilización sobre parámetros de inmunidad celular de codornices japonesas juveniles.

Table 1: Effect of an early environmental enrichment and a stress exposure on cellular immune parameter of juvenile Japanese quail.

Parámetro	Tratamiento				P		
	Estresado y enriquecido	Estresado y no enriquecido	No estrés enriquecido	No estrés y no enriquecido	Estrés	Enriquecido	Estrés x Enriquecido
% Inflamación	115,49±3,54 ^a	100,59±2,61 ^b	124,53±4,58 ^a	113,14±4,98 ^a	0,028*	0,011*	0,67
% Linfocitos	77,19±7,04 ^a	48,57±1,79 ^b	100,26±10,58 ^c	73,59±5,28 ^a	0,008*	0,004*	0,89
Relación H/L	0,99±0,10 ^a	2,10±0,28 ^b	0,62±0,04 ^a	0,94±0,11 ^a	0,001*	0,002*	0,04*

Las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos con $p < 0,05$ (*). Los valores se expresan como media \pm error estándar. Enriquecido: animales que vivieron en ambiente enriquecido desde la eclosión. Estresado: animales que fueron sometidos a un estrés por inmovilización durante 10 días consecutivos a los 32 días de edad. No enriquecido: animales que vivieron en ambiente no enriquecido desde la eclosión. No estrés: animales no sometidos a estrés.

La relación H/L muestra también un patrón de respuesta con dos grupos extremos que se diferencian significativamente entre ellos y un tercer grupo con valores intermedios (Cuadro 1). El grupo extremo con mayor respuesta en la variable analizada es el de los animales "no enriquecidos y estresados", la menor respuesta la manifestaron los animales "enriquecidos y no estresados", y el tercer grupo se conforma por los animales pertenecientes a los 2 tratamientos restantes. Si bien podría llamar la atención que los valores sean invertidos respecto a los que ya se analizaron previamente, esta inversión se condice con la información que brinda el análisis de este parámetro. Es decir, los animales que manifiestan mayores valores de la variable son aquellos cuya fisiología se vio más afectada por el estrés, alterando las poblaciones leucocitarias (aumentando heterófilos y disminuyendo linfocitos) muy probablemente por efecto de cantidades elevadas de GCs en sangre (Dhabhar, et al. 1995; 1996). Esta información es, además, consistente con los resultados que revelan que los animales que manifiestan mayores indicadores de estrés presentarían los parámetros inmunes analizados disminuidos en comparación con animales no sometidos a estrés crónico.

Podríamos mencionar entonces que los efectos del AE, independientemente de su mecanismo de acción, parecerían orientarse principalmente a compensar el detrimento inmunológico que manifiestan los animales que son expuestos a lo largo de su desarrollo a un estrés crónico. El mecanismo de acción podría basarse en el aprendizaje y experiencia para hacer frente a situaciones estresantes (como la presencia de objetos novedosos) desde los primeros momentos del desarrollo. De este modo, cuando los animales criados en AE son expuestos a una nueva situación estresante (como el estrés crónico por inmovilización que incluye no solo la manipulación sino el alojamiento temporal en un ambiente nuevo), esta no es percibida de la misma forma que en las aves que no cuentan con dichas experiencias de vida. A su vez, se sabe que la activación del sistema inmune es en sí un evento demandante en términos energéticos para un organismo que tiene que destinar recursos finitos al mantenimiento de su homeostasis (Klasing, 2004) por esto, existe la posibilidad de que un aprendizaje relacionado a un manejo optimizado de los recursos ante situaciones estresantes vaya acompañado de una mejor respuesta inmune.

Por último, cabe destacar el hecho de que la exposición a diversos estresores puede inducir respuestas neuroendócrinas y comportamentales comunes, efecto referido como "Carácter Inespecífico" de la respuesta. Así, si bien en este trabajo solo se evaluó un tipo de estresor, las conclusiones que se desprenden de este estudio podrían probablemente generalizarse a los efectos de otros estresores crónicos, si bien serían necesarios estudios con otros estresores para confirmar experimentalmente esta enunciación.

Conclusiones

Se puede concluir que los resultados: 1) Confirman el efecto inmuno-depresor del estrés crónico. 2) Demuestran un efecto inmuno-activador del AE en la inmunidad mediada por células. 3) Evidencian efectos compensadores del AE sobre la respuesta inmuno-depresora del estrés ya que el AE permite: reducir el incremento en la relación H/L que induce el estrés y mantener las poblaciones linfocitarias más estables en el tiempo.

Considerando que la exposición a situaciones de estrés forma parte del desarrollo mismo de los animales y es un proceso muchas veces inevitable, el enriquecimiento ambiental parecería ser una forma útil y de bajo costo para mejorar el estado inmunológico de las aves en general, ya que sus efectos parecen ocurrir de manera independiente del estado de estrés que las aves manifiestan. Esto puede tener implicancias estratégicas para el diseño de programas de manejo de animales principalmente en cautiverio ya que permitiría mejorar su calidad de vida (bienestar) y muy probablemente se vea también reflejado en mejoras a nivel productivo.

Agradecimientos

Este trabajo fue parcialmente financiado por fondos provenientes de FONCYT (PICT 34157), SECyT (UNC) y CONICET Argentina. Nazar, F.N. posee una beca de posgrado tipo I del CONICET y Marín, R.H. es miembro de

carrera de la misma institución. Los autores agradecen a Dario C. Arbelo por su asistencia técnica.

Bibliografía

- Baumgartner, J. 1994. Japanese quail production, breeding and genetics. *World's Poult. Sci. J.* 50: 227-235.
- Eraud, C., Trouvé, C., Dano, S., Chastel, O. and Faivre, B. 2008. Competition for resources modulates cell-mediated immunity and stress hormone level in nestling collared doves (*Streptopelia decaocto*). *Gen. Comp. End.* 155: 542-551.
- de Kloet, E.R. 2003. Hormones, brain and stress. *Endocr. Regul.* 37: 51-68.
- Dhabhar, F.S. and McEwen, B.S. 1997. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. *Brain Behav. Immun.* 11: 286-306.
- Dhabhar, F.S., Miller, A.H., McEwen, B.S. and Spencer, R.L. 1995. Effects of stress on immune cell distribution. Dynamics and hormonal mechanisms. *J. Immunol.* 154: 5511-5527.
- Dhabhar, F.S., Miller, A.H., McEwen, B.S. and Spencer, R.L. 1996. Stress-induced changes in blood leukocyte distribution. Role of adrenal steroid hormones. *J. Immunol.* 157: 1638-1644.
- Dohms, J.E. and Metz, A. 1991. Stress mechanisms of immuno-suppression. *Vet. Immunol. Immunopath.* 30: 89-109.
- Fox, C., Merali, Z. and Harrison C. 2006. Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. *Avian Dis.* 27: 972-979.
- Gross, W.B. and Siegel P.B. 1993. General principles of stress and welfare. *Livestock handling and Transport.* 21-34. Ed: Grandin, T. Willingford, UK, CAB International.
- Huber-Eicher, B. and Wechsler, B. 1998. The effect of quality and availability of foraging materials on feather pecking in laying hen chicks. *Anim. Behav.* 55: 861-873.
- Huff, G.R., Huff, W.E., Balog, J.M. and Rath N.C. 2003. The effects of behavior and environmental enrichment on disease resistance of turkeys. *Brain Behav. Immunol.* 17: 339-349.
- Huss, D., Poynter, G. and Lansford, R. 2008. Japanese quail (*Coturnix japonica*) as a laboratory animal model. *Lab. Animal.* 37: 513-519.

- Jones, R.B. 1996. Fear and adaptability in poultry: insights. *World's Poultry Sci. J.* 52: 131-170.
- Jones, R.B. and Hocking, P.M. 1999. Genetic selection for poultry behaviour: Big bad wolf or friend in need? *Anim. Welfare* 8: 343-359.
- Jones, R.B., Satterlee, D.G., Waddington, D. and Cadd, G.G. 2000. Effects of repeated restraint in Japanese quail genetically selected for contrasting adrenocortical responses. *Physiol. Behav.* 69: 317-24.
- Klasing, K.C. 2004. The costs of immunity. *Acta Zool. Sinica* 50: 961-969.
- Marin, R.H. and Arce, A. 1996. Benzodiazepine receptors increase induced by stress and Maze learning performance, in chicks forebrain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 3: 581-584.
- Marin, R.H., Jones, R.B., García, D.A. and Arce, A. 1999. T-maze performance and body weight relationship in broiler chicks reared in a commercial farm. *Brit. Poultry Sci.* 40: 434-438.
- Marashi, V., Barnekow, A., Ossendorf, E. and Sachser, N. 2002. Effects of different forms of environmental enrichment on behavioral, endocrinological, and immunological parameters in male mice. *Horm. Behav.* 43: 281-292.
- Miller, K.A. and Mench, J.A. 2005. The differential effects of four types of environmental enrichment on the activity budgets, fearfulness, and social proximity preference of Japanese quail. *App. An. Behav. Sci.* 95: 169-187.
- Mormede, P., Andanson, S., Auperin, B., Beerda, B., Guemene, D., Malmkvist, J., Manteca, X. and Van Reenen, C.G. 2007. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Phys. Behav.* 92: 317-339.
- Mumma, J.O., Thaxton, J.P., Vizzier-Thaxton, Y. and Dodson, W.L. 2006. Physiological stress in laying hens. *Poultry Sci.* 85: 761-769.
- Odihambo, M.J., Thaxton, J.P., Vizzier-Thaxton, Y. and Dodson, W.L. 2006. Physiological stress in laying hens. *Poultry Sci.* 85: 761-769.
- Rybakina, E.G., Shanin, S.N., Kozinets, I.A., Fomicheva, E.E. and Korneva, E.A. 1997. Cellular mechanisms of cold stress-related immunosuppression and the action of interleukin 1. *Int. J. Tissue React.* 19: 135-40.
- Satterlee, D.G. and Johnson W.A. 1988. Selection of Japanese quail for contrasting blood corticosterone response to immobilization. *Poultry Sci.* 67: 25-32.
- Sever, J.L. 1961. Application of a microtechnique to viral serological investigations. *J. Immunology.* 88: 320-329.
- Shanaway, M.M. 1994. Quail production systems. A review. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy.
- Siegel, H.S. 1995. Stress, strains and resistance. *Br. Poultry Sci.* 36: 3-22.
- Stadecker, M. Lukic, M., Dvorak, A. and Leskowitz, S. 1977. The cutaneous basophil response to phytohemagglutinin in chickens. *J. Immunology.* 118: 1564-1568.
- Tome, M.E. 1984. Adrenal response to chronic and acute water stress in Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*. *J. Steroid Biochem.* 20: 1577-1577.
- Wilson, W.O., Abbott, U.K. and Abplanalp, H. 1961. Evaluation of *Coturnix (Japanese quail)* as pilot animal for poultry. *Poultry Sci.* 40: 651-657.