

Creciendo en un ambiente ruidoso: efectos del ruido urbano sobre aspectos fisiológicos y el aprendizaje en un ave de desarrollo precoz

Tesis

**Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De**

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

**Por
Romina Flores Martínez
Octubre, 2018**

Director de Tesis: Dr. Rodrigo A. Vásquez Salfate

Co-director de Tesis: Dra. Verónica Quirici

FACULTAD DE CIENCIAS

*“..Sin estar ya
envenenado por la civilización,
huye y camina sólo por la tierra, para perderse en lo salvaje..”*



Médico Veterinario titulada el año 2014, con gran interés en la comprensión de la ecología y evolución de la conducta animal en vida silvestre. El año 2016 ingresó al Laboratorio de Ecología Evolutiva del Comportamiento, a cargo del Dr. Rodrigo Vásquez, quien fue su profesor tutor en el programa Magíster en Ciencias Biológicas. Líneas de interés de investigación relacionadas a conservación de los espacios naturales y los efectos del impacto humano.

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a mi profesor tutor, Dr. Rodrigo Vásquez, por recibirme en su equipo de trabajo y siempre tener una buena disposición ante mis dudas, transmitiéndome sus conocimientos, apoyo y confianza. También a mi co-tutora, Dra. Veronica Quirici, por darme la oportunidad de participar de este proyecto y ser mi mentora, por su continuo apoyo y enseñanzas y siempre recibirme en su laboratorio con una sonrisa. Quisiera agradecer también a los académicos integrantes de mi comisión: Dr. Michel Salaberry y Dra. Karin Maldonado por su buena disposición y críticas constructivas, las cuales permitieron enriquecer este trabajo.

Gracias a mis compañeros de laboratorio, en quienes he encontrado apoyo y camaradería desde el primer día: Bárbara Toro, Lucas Hussing, Sebastián Maya, Pablo Lamilla, Karina Romero, Javier Bustos, Yanina Ibaceta, Gabriela Sudel, Camila Bravo, Juan Rivero, Barbara Bachmann, Carlos Valeris, Jorge Mella, Daniel Benítez, Pablo Cornejo, Juan David Arévalo y Yanina Poblete. Tengo bellos recuerdos con cada uno de ellos, y han sido parte fundamental de mi formación académica.

Agradecer también a mi equipo de trabajo de Ecología; Frederic Toro, Leslie Ramírez, Jaime Flores, Nelson Follador, Gabriela Mallea. De todos ellos, amigos, ellos he aprendido la perseverancia en el trabajo por la conservación de la naturaleza. Mención especial a Yerko A. Vilina, por creer en mis capacidades desde el pregrado y ser un

apoyo fundamental durante todo este proceso, pero principalmente por abrir una ventana de conocimientos que me cautivó y le dio sentido a todo mi trabajo.

A mis padres, Myriam y Roberto, por incentivar me desde pequeña a dedicarme a aquello que más feliz me hace y apoyarme siempre en mis decisiones.

A el resto de mi familia, mis amigos: Cony, Fidel, Jason, Marcos, Francisca. Por estar en las buenas y en las malas, por sacarme siempre una sonrisa. A Ivan, por ser mi compañero incondicional.

Finalmente, a las aves; su enigmática belleza y comportamientos me obligan a seguir este camino de estudios, con la finalidad de aportar un poco a la conservación de lo salvaje, la naturaleza.

Para la realización de esta tesis se recibió el financiamiento del siguiente fondo de la Universidad Andrés Bello: Proyecto regular_UNAB: DI-12-17/RG.

ÍNDICE DE MATERIAS

Lista de figuras	ix
Resumen.....	10-11
Summary	12
1. Introducción	13-18
2. Objetivos	19
3. Hipótesis y predicción.....	20
4. Materiales y métodos	21
5. Resultados	27
6. Discusión.....	34
7. Conclusiones	41
8. Bibliografía	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Arena de entrenamiento, dividida en dos sectores: sector casa y sector laberinto.

Figura 2. Relación entre niveles de glutathione (uM) e inmovilidad tónica (segundos)(t_{10} = 2.85, $p = 0.02$).

Figura 3. Box-plot de los niveles de glutathione (uM) en grupo ruido ciudad y ruido rural. ($t_{11} = - 2.77$, $p = 0.02$). La caja representa el 50% de los datos, mientras que la barra de en medio representa la mediana. Los puntos corresponden a los valores aislados o outliers.

Figura 4. Tiempo (segundos) que tarda cada individuo ($n = 6$) del grupo (A) y el grupo ciudad (B) en encontrar la recompensa, durante los tres días de entrenamiento (cada color representa un individuo).

Figura 5. Box-plot del tiempo en que las codornices del grupo rural y el grupo ciudad tardan en encontrar la recompensa a lo largo de los tres días que duró el experimento. Los cuadros azules representan al grupo rural y los rojos al grupo ruido. La caja representa el 50% de los datos, mientras que la barra de en medio representa la mediana. Los puntos corresponden a los valores aislados o outliers.

Figura 6. Box-plot del número de veces en que las codornices del grupo rural y el grupo ciudad fallaron en encontrar la recompensa a lo largo de los tres días que duró el experimento. La caja representa el 50% de los datos, mientras que la barra de en medio representa la mediana. Los puntos corresponden a los valores aislados o outliers.

RESUMEN

Entender de qué manera afecta el sonido generado por las grandes ciudades a las poblaciones subyacentes de animales es uno de los ítems de interés en la ecología de ambientes urbanos. Sin embargo, los impactos del ruido antropogénico sobre las aves son aun poco conocidos. Por ello, el objetivo principal del presente trabajo fue determinar si el ruido de ciudad percibido durante el desarrollo de un individuo representa un factor de estrés, inferido a través de los niveles de glutatión, y si dicho estrés afecta el comportamiento de aprendizaje y memoria. Para ello se realizó un estudio experimental en el cual un grupo de codornices (*Coturnix japonica*) fue sometido, durante una semana a ruido de ciudad, mientras otro grupo se mantuvo durante el mismo período de tiempo sometida a ruido rural. Posterior a este periodo, se tomaron muestras de sangre para analizar los niveles plasmáticos de uno de los principales antioxidantes y marcador de estrés ambiental, el glutatión (GSH) para luego evaluar la capacidad de memoria y aprendizaje. Para esto, un subgrupo de las codornices fue separado y sometido a un proceso de acondicionamiento, mediante la utilización de un laberinto con recompensa. Se midió el tiempo que cada codorniz demoró en encontrar la recompensa, y el número de veces que falló. Encontramos que los niveles de GSH fueron significativamente mayores en el grupo con el ruido de ciudad, y además los individuos que permanecieron más tiempo en la posición estática (inmovilidad tónica) fueron a la vez, los que presentaron los mayores niveles de este antioxidante. En cuanto al aprendizaje, en el tercer día de acondicionamiento las aves del grupo con ruido urbano, demoraron significativamente más tiempo en encontrar la recompensa. Se sugiere que el ruido de ciudad representa una importante variable de

estrés para las aves, generando una mayor movilización del sistema antioxidante GSH y disminuyendo las capacidades cognitivas y de aprendizaje en aves precociales.



SUMMARY

Understanding how the sound generated by large cities affects the underlying populations of animals is one of the items of interest in the ecology of urban environments. However, the impacts of anthropogenic noise on birds are still poorly understood. Therefore, the main objective of the present work was to determine if the city noise perceived during the development of an individual represents a stress factor, inferred through glutathione levels, and if said stress affects the learning and memory behavior. To this end, this experimental study was carried out in which a group of quail (*Coturnix japonica*) was subjected, for a week, to city noise, while another group was subjected to rural noise during the same period of time. Later in this period, blood samples were taken to analyze the plasma levels of one of the main antioxidants and marker of environmental stress, glutathione (GSH), to later evaluate the memory and learning capacity. For this, a subgroup of quail was separated and subjected to a conditioning process, using a labyrinth with reward. The time each quail took to find the reward was measured, and the number of times it failed. We found that the levels of GSH were significantly higher in the group with the noise of the city, and also the individuals who remained more time in the static position (tonic immobility) were at the same time, those who presented the highest levels of this antioxidant. Regarding learning, on the third day of conditioning the birds of the group with urban noise, took significantly longer to find the reward. It is suggested that the noise of the city represents an important variable of stress for the birds, generating a greater mobilization of the GSH antioxidant system and diminishing the cognitive and learning abilities in precocial birds.

1. INTRODUCCIÓN

El aumento de la población humana a provocado un aumento en urbanización y ha generado cambios en el ambiente, tales como fragmentación de hábitat, aumento de enfermedades emergentes, aumento de contaminantes (e.g., contaminantes orgánicos persistentes, metales pesados) y aumento de contaminación acústica (Hansell et al. 2013, Shannon et al. 2016). De todos ellos, la contaminación acústica y sus consecuencias han sido menos estudiados (Isaksson 2015, Babisch et al. 2006, Hansell et al. 2013, Szalma y Hancock 2011). Sin embargo, en los últimos años tanto las causas que genera la contaminación acústica como sus consecuencias están comenzando a ser un tema de interés en la ecología de ambientes urbanos (Babisch et al. 2006, Hansell et al. 2013, Szalma y Hancock 2011).

En la literatura generalmente se considera cualquier fuente de sonido antropogénico como ruido, sin importar si este es provocado de manera intencional o si es consecuencia de actividades diarias como transporte o actividades de construcción, entre otras. El ruido producido en las ciudades tiende a ser de intensidad variable, con sonidos de alta y baja frecuencia y a la vez, sostenido o intermitente a lo largo del tiempo (Barber et al. 2010). La evidencia sugiere que la intensidad de la señal acústica y la biología de la especie son fundamentales para poder predecir el efecto que tiene el ruido sobre animales silvestres, de este modo, la intensidad del ruido, la capacidad auditiva de la especie y la experiencia previa al ruido pueden inducir diferentes respuestas (Tyack et al. 2011, Goldbogen et al. 2013, Doksæter et al. 2009).

El ruido a causa de la urbanización ha ido en aumento (Babisch et al. 2006), solamente en E.E.U.U. se ha observado que el ruido del tráfico vehicular en los últimos

40 años ha superado en un factor de 10 al crecimiento poblacional de la población humana (Barber et al. 2010). En humanos, varios estudios han relacionado el ruido ambiente con el aumento de ciertas patologías asociadas al estrés, tales como trastornos del sueño (Fyhri y Aasvang 2010), enfermedades cardiovasculares (Babisch et al. 2006) y trastornos cognitivos y de aprendizaje (Szalma y Hancock 2011). Por lo tanto, el estar constantemente expuesto al ruido urbano ha sido propuesto como un factor de estrés que puede afectar a todas las especies (Shannon et al. 2016).

1.1 Respuestas fisiológicas al estrés: glucocorticoides

Frente a una perturbación del ambiente se activa el eje hipotálamo-hipófisis, el cual envía la señal a las glándulas adrenales quienes, a su vez responden incrementando la producción de glucocorticoides (Sapolsky et al. 2000). En el caso de las aves, el principal glucocorticoide es la corticoesterona (CORT) (Sapolsky et al. 2000). Esta respuesta fisiológica es considerada un mecanismo de defensa frente al estrés ya que el aumento de glucocorticoides genera una re-distribución de energía hacia aquellos órganos de mayor demanda y un mejor desempeño en la actividad locomotora, aumentando así las posibilidades de sobrevivencia del individuo (Romero 2004). Sin embargo, una exposición prolongada a una perturbación y un incremento sostenido en las concentraciones de glucocorticoides genera efectos potencialmente negativos para el organismo, como por ejemplo, depresión del sistema inmune (Babisch et al. 2006) y aumento de estrés oxidativo mediante la producción de radicales libre (Constantini et al. 2008) con el consecuente daño a nivel celular y genético (Meillère et al. 2015). Diversos trabajos han investigado la respuesta a estrés mediada por la liberación de glucocorticoides, sin embargo, son escasos los estudios que han relacionado los

factores estresantes con los niveles de estrés oxidativo y la capacidad antioxidante (Isaksson 2015).

1.2 Estrés oxidativo y capacidad antioxidante

El daño oxidativo ocurre cuando los niveles de pro-oxidantes, tales como como las especies reactivas de oxígeno/nitrógeno (ROS/RNS) superan la capacidad defensiva del organismo (capacidad antioxidante) para remover estos niveles excesivos (Halliwell y Gutteridge 2015). También puede ocurrir debido a una disminución en los niveles de antioxidantes o por la depleción de cofactores dietarios, tales como selenio, magnesio o zinc, los cuales potencian la actividad de las enzimas antioxidantes (Constantini 2008). Independientemente de la forma en que se generan, el resultado final de este desequilibrio genera un exceso de ROS/RNS. El daño oxidativo ha sido relacionado a: (i) patologías de diversa índole tales como neoplasias, enfermedades cardiovasculares y pulmonares (Halliwell y Gutteridge 2015), (ii) trastornos durante el desarrollo, ya que ejerce regulación sobre la activación de factores de crecimiento (Sheldon y Verhulst 1996) y (iii) acelerar el proceso de envejecimiento mediante el acortamiento de los telómeros (Von Zglinicki 2002). Por ello, existen diversas estrategias para defenderse del daño oxidativo, de ellas, el tripéptido glutatión (GSH) es uno de los antioxidantes más importantes (Galvani et al. 2000). Éste reduce a las especies reactivas de oxígeno/nitrógeno mediante la donación de electrones, de manera similar a como lo hace el α -tocoferol y el ácido ascórbico (Vitamina E y C respectivamente) (Limon-Pacheco y Gonsebatt 2009). Se ha observado que niveles elevados de radicales libres pueden llevar a una disminución de GSH (Jaeschke 1990, Galvani et al. 2000). Por otro lado, niveles elevados de glucocorticoides pueden

disminuir la actividad de la enzima glutatión-peroxidasa, disminuyendo así los niveles de GSH (Patel et al. 2002). Por lo tanto, en un ambiente estresante, ya sea por altos niveles de CORT o altos niveles de ROS, se espera que los niveles de GSH sean menores en relación a un ambiente menos estresante. Por ejemplo, al comparar niveles de GSH en tejidos del pulmón e hígado de dos poblaciones del Carbonero común (*Parus major*), una silvestre y otra urbana, no se observaron diferencias significativas (Isaksson et al. 2005). Sin embargo, al medir GSH desde plasma en esta misma especie en dichos ambientes, contrario a lo esperado, se observó que los individuos que habitaban en el ambiente urbano tenían niveles mayores de GSH (Isaksson et al. 2005). Además, recientemente se ha sugerido que el GSH, al ser un antioxidante y neurotransmisor, podría ser un conector entre el ambiente estresante y el comportamiento resultante (Isaksson 2015). Por ejemplo, en pichones de gallo (*Gallus gallus domesticus*) se observó que a medida que aumentan los niveles de GSH algunos comportamientos de ansiedad disminuyeron, lo que se vio reflejado en una disminución en las vocalizaciones y un aumento de las horas de sueño (Yamane et al. 2007).

1.3 Efectos del ruido sobre el comportamiento

Algunas investigaciones han observado que el ruido de ciudad puede generar cambios en el comportamiento (Karp y Root 2009, DeRuiter et al. 2013). Por ejemplo, el carbonero común (*Parus major*), aumenta las vocalizaciones y cambia los patrones acústicos en zonas urbanas (Mockford y Marshall 2009). En el pinzón vulgar (*Fringilla coelebs*) cambia los patrones de vigilancia (Quinn et al. 2006) y el gorrión común (*Passer domesticus*) aumenta los tiempos que permanece vigilante (Meillere et

al. 2015). Por otro lado, el estrés crónico (e.g., a sonido sostenido) tiene el potencial de degradar la capacidad auditiva, aumentando así las probabilidades de no oír a un depredador (Siemers y Schaub 2011). También se ha comprobado que interviene de manera negativa en la capacidad comunicativa intraespecífica (Hatch et al. 2012), en la orientación espacial (Ellison et al. 2012, Shannon et al. 2016) y puede aumentar la inmovilidad tónica (Campo et al. 2005).

Los efectos del ruido pueden a su vez variar en relación a la ontogenia del individuo; se ha sugerido que la exposición al ruido en etapas iniciales del desarrollo puede llevar a trastornos cognitivos y dificultades en el aprendizaje en conductas vitales para el desempeño del individuo adulto (Calandreau et al. 2011, Isaksson 2015). Por lo tanto, el ambiente acústico durante el desarrollo podría tener efectos a largo plazo en la capacidad cognitiva de un organismo, aspecto que aún no se ha estudiado en profundidad.

Como se indicó anteriormente, el aumento de la población humana tiene como consecuencia un aumento del ruido urbano. A la fecha existen diversos trabajos que han propuesto que el ruido de ciudad representa un factor de estrés para animales (niveles de CORT: Powell et al. 2006, Cyr et al. 2007, Barber et al. 2010, Crino et al. 2011, Blickley et al. 2012, Shannon et al. 2016, Kleist et al. 2018, niveles de ROS: Isaksson et al. 2005, Constantini 2008, Isaksson et al. 2009, Moller et al. 2010, Herrera-Dueñas 2014, y acortamiento de telómeros: von Zglinicki 2002, Nanda et al. 2002, Spencer et al. 2008, Salmon et al. 2016, Young et al. 2017). Sin embargo, hasta la fecha ningún estudio ha evaluado el efecto que el ruido de ciudad, percibido durante el desarrollo, tiene sobre el posterior a la perturbación. Por otro lado, la mayoría de los estudios relacionados al ruido de ciudad como factor estresante se han enfocado en

cuantificar CORT y ROS, y hasta donde tengo conocimiento, ninguno estudio ha cuantificado los niveles de GSH. Como se mencionó anteriormente, este tripéptido es el principal antioxidante y se ve afectado tanto por CORT como por ROS, lo que lo convierte en un marcador que incorpora ambas fuentes estresantes. Finalmente, este tripéptido es a su vez un neurotransmisor, por lo que recientemente ha sido propuesto como un agente adecuado para evaluar la relación entre estrés y comportamiento. Por lo tanto, en este estudio se evaluó el efecto del ruido de ciudad (Santiago de Chile), percibido durante el desarrollo, sobre los comportamientos de aprendizaje y memoria en una especie con desarrollo precoz, la codorniz (*Coturnix japonica*). A su vez se, cuantificaron los niveles de GSH para determinar si dichos niveles varían en relación a la exposición del ruido de ciudad.

***1.4 Coturnix japonica* como modelo experimental**

La codorniz japonesa *C. japonica* es una galliforme presente en Chile con fines comerciales. La codorniz es un buen modelo para este estudio debido a (i) que un trabajo previo en esta especie (Calandreau et al. 2011) mostró que la exposición de un ruido monotónico de 1s de duración es percibido como estrés (aumentaron niveles de CORT) y afecta algunas habilidades cognitivas, y (ii) por ser una especie de desarrollo precoz, permitiendo descartar efectos maternos, que en aves altriciales serían la tasa de aprovisionamiento (Rensen et al. 2010) y los posibles efectos de competencia entre hermanos (Quirici et al. 2016).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar si el ruido de ciudad durante el desarrollo de un individuo representa un factor de estrés, inferido a través de los niveles de GSH, y si dicho estrés afecta el comportamiento de aprendizaje y memoria en la codorniz.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar si los niveles de glutatión en las codornices sometidas al ruido de ciudad difieren de los mismos en relación con las codornices sometidas a ruido rural durante el desarrollo.
- Evaluar si el comportamiento de movilidad tónica varía entre el grupo ciudad y rural.
- Evaluar si el aprendizaje y la memoria de las codornices difiere entre el grupo ciudad y rural.

3. HIPÓTESIS Y PREDICCIÓNES

3.1 Hipótesis 1: el ruido de ciudad representa un estímulo estresante para las codornices en desarrollo, generando respuestas fisiológicas diferentes a individuos de zonas rurales, sin exposición a ruidos urbanos.

Predicción: las codornices expuestas a ruido de ciudad presentarán menores niveles de GSH que aquellas expuestas a ruido rural.

3.2 Hipótesis 2: si el ruido de ciudad es un factor estresante (H1), entonces la exposición al ruido durante el desarrollo tendrá efectos a largo plazo sobre el aprendizaje.

Predicción: Se espera encontrar menores capacidades de aprendizaje de las codornices en el grupo expuesto al ruido de ciudad con respecto a aquellas expuestas a sonidos silvestres.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Modelo experimental

Se utilizaron 40 codornices japonesas (*Coturnix japonica*) de dos semanas de edad, provenientes de un criadero autorizado (David Vattuone Calle). Las codornices fueron pesadas, se les colocó un anillo plástico de color para su individualización y a continuación se asignaron a dos tratamientos: i) ruido de ciudad (n = 20) y ii) ruido rural (n = 20), de forma que no difirió el peso de los grupos. Las aves de ambos tratamientos se alojaron en cuartos separados acústicamente, en el campus Colina de la Universidad Andrés Bello. Al terminar el período experimental se midió la inmovilidad tónica y se midieron los niveles de glutatión de las 40 codornices e inmediatamente las codornices fueron separadas y colocadas en jaulas individuales (ya que a esa edad eran capaces de termorregular por sí solas). A un sub-conjunto de estos animales (6 codornices por tratamiento) se le realizaron pruebas de memoria espacial (véase más abajo). Debido a que las codornices comienzan a termorregular a las 4 semanas de edad (Vassallo et al. 2014), fueron colocadas en grupo de a tres individuos por jaula (30 cm ancho x 25 cm alto). El piso de la jaula fue cubierto con papel corrugado y las jaulas fueron de rejilla para que hubiese contacto visual y auditivo entre las codornices. La comida y agua fueron entregadas *ad libitum* según los requerimientos propios de su edad (véase Woodard et al. 1965). La temperatura máxima y mínima de las salas fue monitoreada con un termómetro de máxima y de mínima. La temperatura máxima de la sala ruido ciudad (29.87 ± 2.35 grados Celsius, media \pm DE, n = 8) fue similar a la temperatura máxima de la sala ruido rural (31.00 ± 1.19) (p= 0,023). La temperatura mínima de la sala ruido ciudad (22.06 ± 1.20) fue similar a la temperatura mínima de la sala ruido rural (22.97 ± 2.43)

($p=0,57$). La temperatura promedio de la sala ruido ciudad (25.96 ± 5.52) fue similar a la temperatura promedio de la sala ruido rural (27.06 ± 5.57) ($p=0,13$). Las aves no se manipularon durante el período de la exposición al ruido y solo visualizaron al personal al momento de la alimentación, la cual se realizó de manera calmada, homogénea y precaviendo no alterar a los animales. La investigación se realizó con el permiso de Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA), Universidad de Chile (N°: 18112-FCS-UCH).

4.2. Grabación ruido de ciudad

Las grabaciones de ruidos urbanos se llevaron a cabo en el centro de Santiago en avenidas ($n = 5$), autopistas ($n= 4$) y una estación de metro ($n= 1$) utilizando un sonómetro (Bruel y Kjaer 2250) equipado con un micrófono de rango de frecuencia extendido (Bruel y Kjaer 2250) un cable de extensión de 3 m y un parabrisas. El micrófono se colocó a una distancia mínima de 5 m de la esquina en las avenidas, a unos 6 m sobre el pavimento en las carreteras ya unos 4 m del ferrocarril en la estación de metro. Las amplitudes máximas de los ruidos registrados promedian 94,5 dB (rango: 88,1-100,8 dB). Los segmentos de 2 s de duración, incluidos los intervalos de amplitudes máximas de cada ruido, se seleccionaron y pegaron sucesivamente 3 veces para obtener pistas de 10 min de cada ruido. Las pistas de ruido de 10 min se normalizaron con la misma amplitud máxima y se presentaron en secuencias aleatorias, dejando 3 min de intervalos silenciosos entre presentaciones sucesivas de ruido. Los ruidos se reprodujeron con una computadora mediante un amplificador (NAD 3029i).

4.3 Tratamiento ruido de ciudad y ruido rural

Por un período de 8 días a las codornices del tratamiento ruido de ciudad se les reprodujo el ruido de Santiago centro durante 8 horas (de 10:00 a 18:00 hs) en una habitación aislada acústicamente (goma, plumavit y madera) y forrada con espuma acústica para evitar ecos dentro de la habitación. Los dB promedio del cuarto ruido ciudad fueron 82,12 ($\pm 1,74$). Las codornices del tratamiento ruido rural estuvieron en otra habitación en las mismas condiciones de alimentación y temperatura, pero sin la exposición al ruido de ciudad. Esta habitación que no estaba aislada acústicamente permitía el ingreso del ruido de la localidad de Colina (caballos, gallinas y tráfico esporádico de vehículos). Los dB promedio del cuarto ruido rural fueron 63,23 ($\pm 5,83$). Se designó al comienzo del experimento como día 1, por lo que el experimento abarcó del día 1 al día 8.

4.4 Peso corporal e inmovilidad tónica

Siguiendo a la investigación de Calandreu y colaboradores (2011), el día siguiente de finalizar el tratamiento (día 9), se pesaron todas las codornices y se les realizó la prueba de inmovilidad tónica (TI). Esta es una prueba estándar para medir el miedo en aves (*sensu* Jones 1986, Jones et al. 1994). Para la medición de la duración de la inmovilidad tónica, cada codorniz fue llevada a otra habitación sin codornices, posteriormente se colocó boca arriba en la mano de uno de los experimentadores (VQ) durante 10 s. El experimentador permaneció silencioso y prácticamente inmóvil en la habitación. Un segundo experimentador se colocó alejado de la codorniz y anotó el tiempo que la

codorniz tardó en tratar de incorporarse (TI), luego de 10 s. Si TI no se logró después de 5 intentos sucesivos, se obtuvo una puntuación de 0 s. Por el contrario, si el ave no se enderezó después de 5 min, la prueba se dio por finalizada y se le otorgó una puntuación máxima de 300 s.

4.5 Experimento aprendizaje

El día 10, cada codorniz fue sometida a un proceso de acondicionamiento, mediante habituación y entrenamiento espacial, siguiendo las especificaciones de Calandreau y colaboradores (2011). Para este proceso, se utilizó una arena de PVC blanco, la cual estaba dividida en dos sectores: sector casa y sector laberinto (Fig. 1). Ambos sectores estaban conectados por una puerta corrediza. El sector laberinto estaba dividido en 5 compartimentos de igual tamaño, cada uno con un pocillo de cerámica el cual puede o no contener alimento (el mismo que se dio de alimentación diaria) de recompensa (según corresponda). Cada compartimento tuvo además una nomenclatura dibujada en el muro para ayudar a la asociación en el aprendizaje de cada ave (cruz negra, círculo, cuadrado, rectángulo, triángulo). El laberinto se encontraba en una pieza sin codornices y las pruebas fueron grabadas con cámara de video para posterior análisis en el laboratorio.

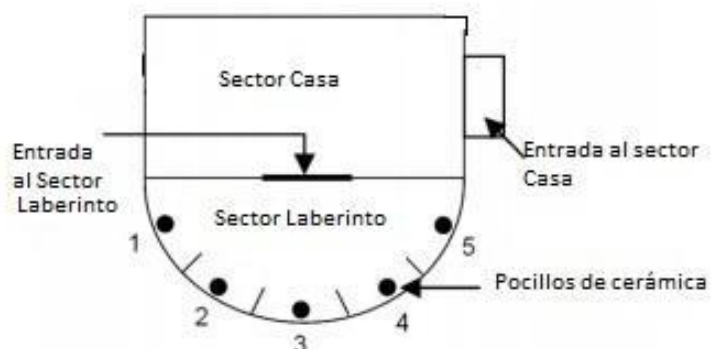


Figura 1. Arena de entrenamiento, dividida en dos sectores: sector casa y sector laberinto.

4.5.1 Habitación

Dos horas antes de la habitación así como del entrenamiento espacial, la comida fue retirada de la jaula de la codorniz. Durante dos días consecutivos (día 10 y 11), cada codorniz fue posicionada en el centro de la arena una vez al día y se le permitió explorar libremente los compartimientos durante 30 min. Todos los pocillos tuvieron recompensa (alimento).

4.5.2 Entrenamiento espacial

Durante 3 días consecutivos (desde el día 12, 13 y 14), las 6 codornices de cada grupo fueron entrenadas cinco veces al día. Cada entrenamiento consistió en colocar a la codorniz dentro del sector casa de la arena, se abrió la compuerta y se permitió al ave explorar el sector laberinto, donde solo un pocillo contenía el alimento de recompensa. Se anotó el tiempo desde que el ave entró al laberinto hasta que encontró el alimento y el número de veces que falló. Las recompensas fueron posicionadas siempre en el

mismo lugar (e.g., pocillo 2), a su vez se cambió la posición del pocillo de recompensa entre las aves, de manera de evitar preferencias hacia la izquierda o derecha. El entrenamiento terminó una vez que el ave encontró la recompensa, o como máximo, pasados los 5 min. Entre cada prueba el ave fue devuelta al sector casa. Como indicativo de rendimiento de aprendizaje y memoria se calculó la media del tiempo en que la codorniz demoró en encontrar la recompensa (s) y el número medio de errores (número) para cada codorniz por día.

4.6 Análisis de datos

Tanto el peso promedio de las codornices (g) luego del tratamiento, la inmovilidad tónica (s) y los niveles de GSH (μM) fueron comparados con modelos lineales mixto. Los efectos fijos fueron el tratamiento y el sexo, se incluyó la jaula como efecto aleatorio.

Para determinar si los comportamientos de encuentro y error variaron a través de los tres días de experimentación, se utilizó un análisis de medidas repetidas (el individuo como unidad de muestreo). Dado el reducido tamaño de muestra, se utilizó una prueba no paramétrica (Friedman). Los análisis fueron realizados con el software SPSS, las pruebas fueron de dos colas y los resultados están reportados en media \pm SD.

5. RESULTADOS

5.1 Peso corporal e inmovilidad tónica

Los resultados del modelo mixto (la caja como efecto aleatorio) mostraron que no hubo diferencias significativas en el peso final de las codornices al finalizar el tratamiento (grupo ruido = 47.76 ± 4.82 g, grupo control = 48.91 ± 4.79 g) ($t_{12} = 1.07$; $p = 0.30$). No hubo efecto del sexo ($t_{19} = 1.16$, $p = 0.26$), ni de la interacción entre grupo y sexo ($t_{19} = 0.77$, $p = 0.45$).

A la vez, los resultados del modelo mixto (caja como efecto aleatorio), mostraron que no hubo diferencias significativas en el comportamiento durante la prueba de inmovilidad tónica (grupo ruido = 29.95 ± 25.95 s, grupo control = 26.06 ± 31.53 s) ($t_{11} = 0.54$; $p = 0.60$), no hubo efecto del sexo ($t_{10} = 1.11$; $p = 0.30$) o interacción entre grupo y sexo ($t_{10} = -0.22$, $p = 0.83$). Sin embargo, los niveles de glutathione, analizado como co-variable, mostraron efectos significativos ($t_{10} = 2.85$, $p = 0.02$). Los individuos con niveles más altos de glutathione demoraron más tiempo en abandonar la posición estática (Figura 2).

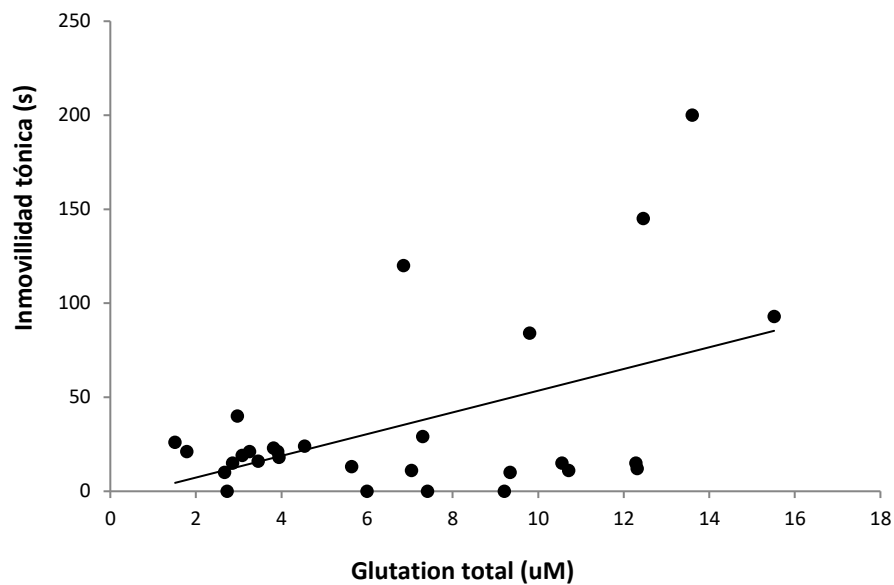


Figura 2. Relación entre niveles de glutathion (uM) e inmovilidad tónica (segundos)($t_{10} = 2.85$, $p = 0.02$).

5.2 Niveles de GSH

Los resultados del modelo mixto (caja como efecto aleatorio) mostraron diferencias significativas en los niveles de glutathion ($t_{11} = -2.77$, $p = 0.02$). El grupo ruido de ciudad presentó niveles mayores (16.86 ± 8.81 uM) al grupo ruido de campo (9.30 ± 5.59 uM) (Figura 3). No hubo efecto del sexo ($t_{15} = -1.16$, $p = 0.27$), ni de la interacción entre grupos y sexo ($t_{19} = 0.77$, $p = 0.45$).

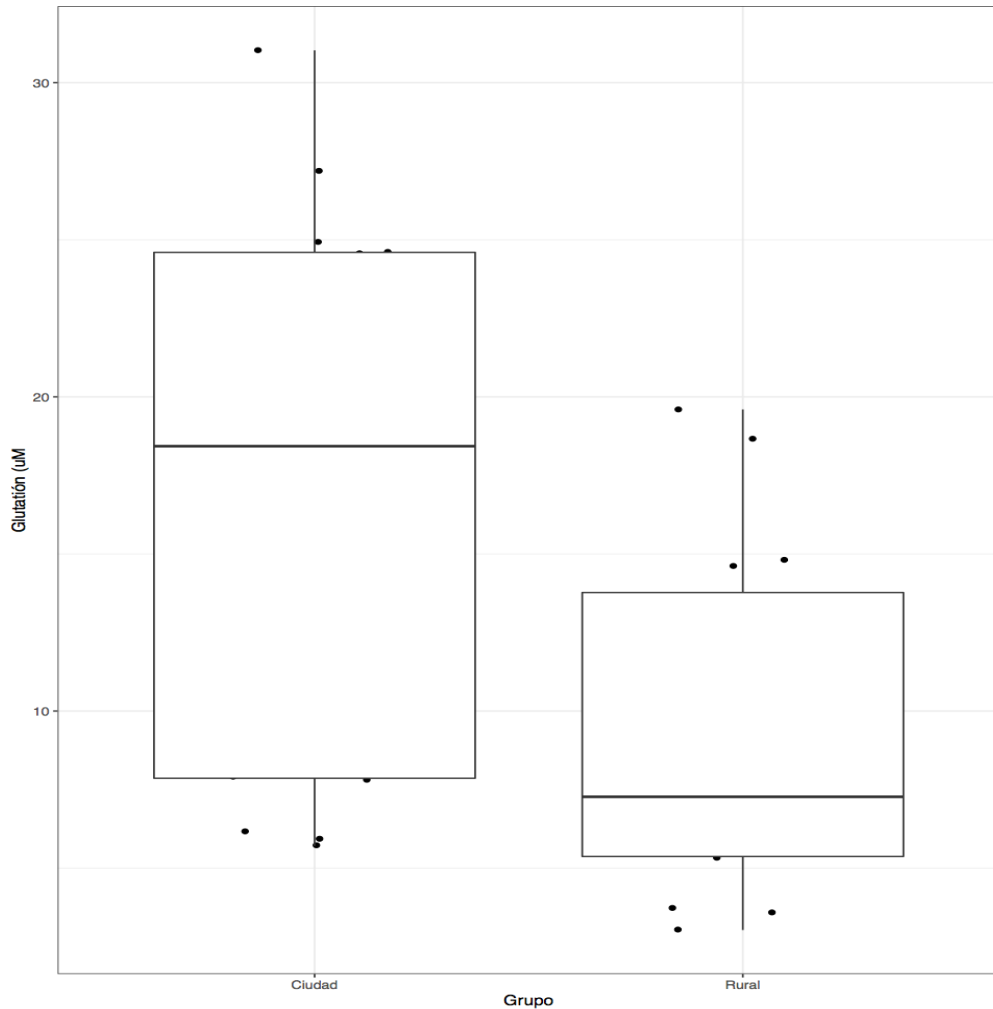


Figura 3. Box-plot de los niveles de glutathione (uM) en grupo ruido ciudad y ruido rural. ($t_{11} = - 2.77$, $p = 0.02$). La caja representa el 50% de los datos, mientras que la barra de en medio representa la mediana. Los puntos corresponden a los valores aislados o outliers.

5.3 Aprendizaje y memoria

Una vez finalizado el periodo experimental con el ruido de ciudad, ambos grupos, el rural y el bajo ruido urbano, fueron sometidos a pruebas de acondicionamiento durante 3 días, con la finalidad de observar posibles diferencias entre ellos. En la Figura 4 se

observa el desempeño de cada individuo en la prueba de aprendizaje y memoria.

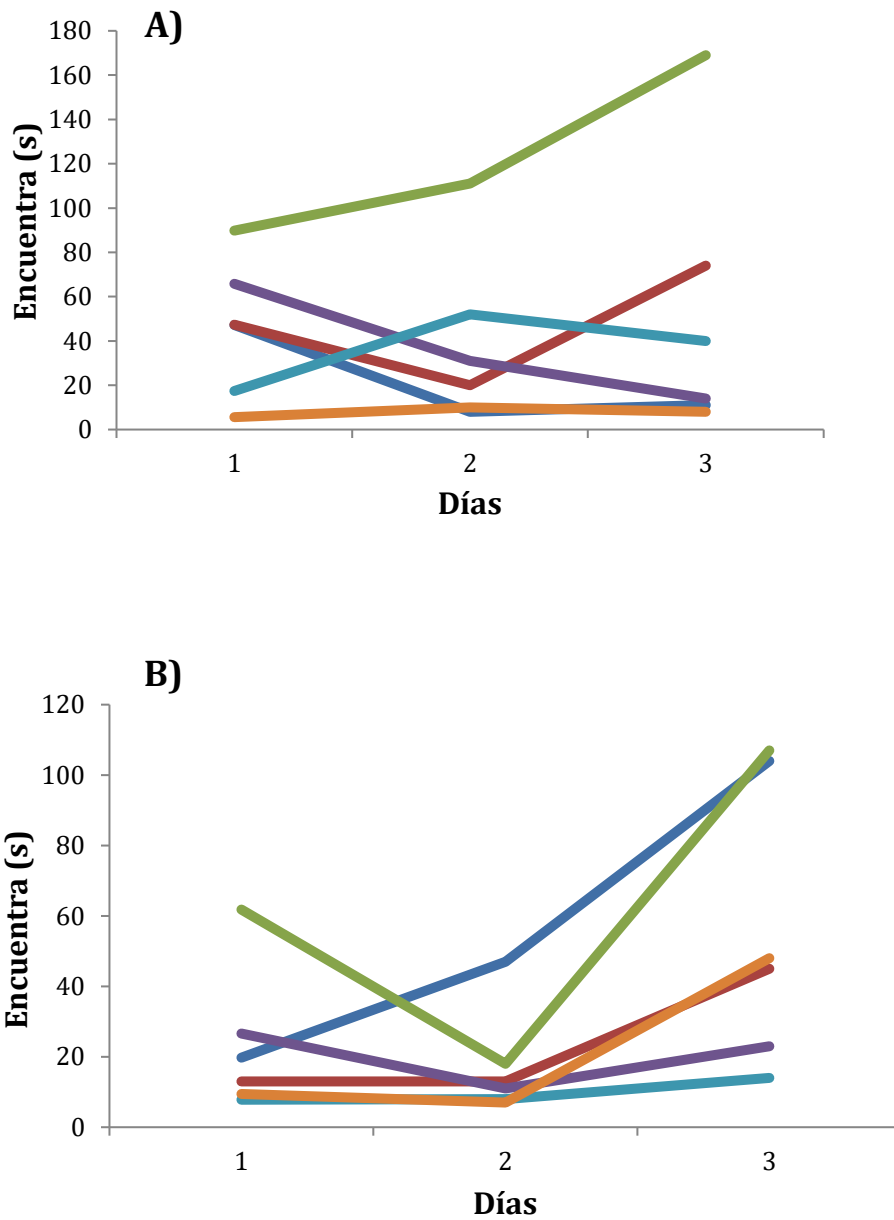


Figura 4. Tiempo (segundos) que tarda cada individuo ($n = 6$) del grupo (A) y el grupo ciudad (B) en encontrar la recompensa, durante los tres días de entrenamiento (cada color representa un individuo).

Los resultados de la prueba de Friedmann indicaron que, en el grupo que había sido expuesto al ruido rural, no hubo diferencias significativas en el tiempo en que las codornices tardaron en encontrar la recompensa a través de los tres días que duró el experimento ($\text{Chi-cuadrado} = 0.33, p = 0.85, df = 2$) (Figura 4). Los resultados de la prueba de Friedmann indicaron que, en el grupo que había sido expuesto al ruido de ciudad, hubo diferencias significativas en el tiempo en que las codornices tardaron en encontrar la recompensa a través de los tres días que duró el experimento ($\text{Chi-cuadrado} = 6.86, p = 0.03, df = 2$), indicando que el tiempo fue mayor en el tercer día (Figura 5).

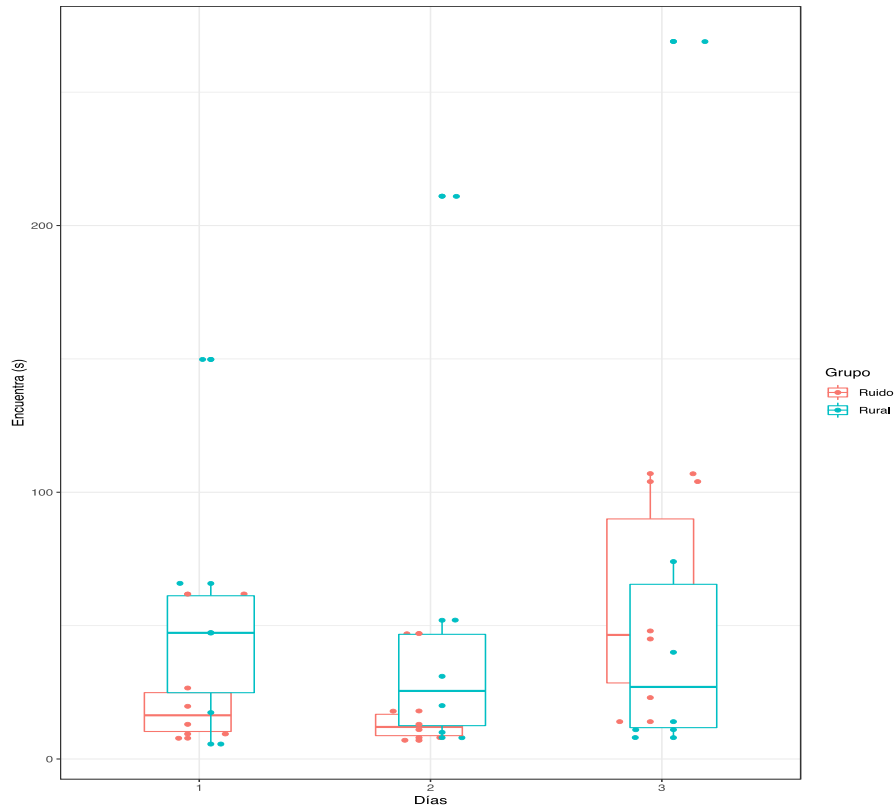


Figura 5. Box-plot del tiempo en que las codornices del grupo rural y el grupo ciudad tardan en encontrar la recompensa a lo largo de los tres días que duró el experimento. Los cuadros azules representan al grupo rural y los rojos al grupo ruido. La caja representa el 50% de los datos, mientras que la barra de en medio representa la mediana. Los puntos corresponden a los valores aislados o outliers.

Los resultados de la prueba de Friedmann indicaron que, en el grupo que había sido expuesto al ruido, no hubo diferencias significativas en el número de veces en que las codornices fallaron en encontrar la recompensa a través de los tres días que duró el experimento ($\text{Chi-cuadrado} = 2.33$, $p = 0.31$, $df = 2$) (Figura 6). En tanto, en el grupo que había sido expuesto al ruido de ciudad, no hubo diferencias significativas en el número de veces en que las codornices fallaron en encontrar la recompensa a través de los tres días que duró el experimento ($\text{Chi-cuadrado} = 0.36$, $p = 0.84$, $df = 2$) (Figura

5).

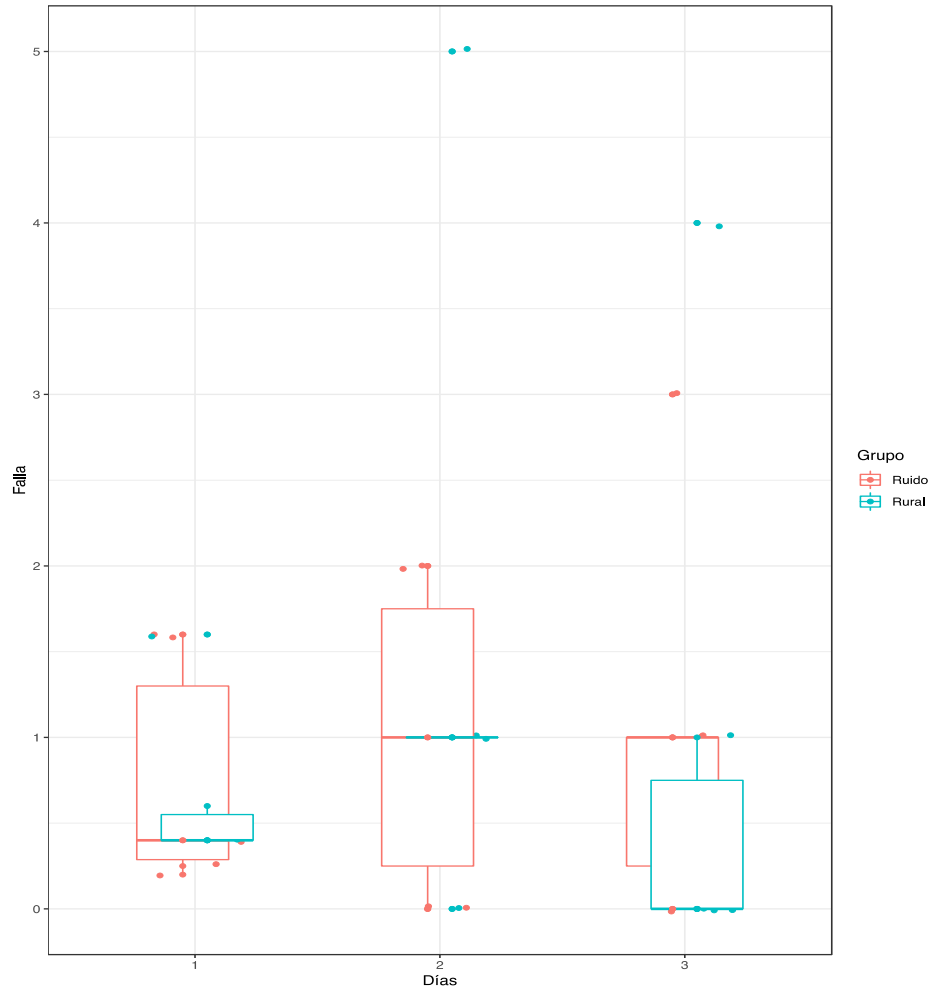


Figura 6. Box-plot del número de veces en que las codornices del grupo rural y el grupo ciudad fallaron en encontrar la recompensa a lo largo de los tres días que duró el experimento. La caja representa el 50% de los datos, mientras que la barra de en medio representa la mediana. Los puntos corresponden a los valores aislados o outliers.

6. DISCUSIÓN

El objetivo principal de este estudio fue determinar si el ruido de ciudad durante el desarrollo de un individuo representa un factor de estrés, inferido a través de los niveles de GSH, y si dicho estrés afecta el comportamiento de aprendizaje y memoria de la codorniz. Contrario a lo esperado, observamos que las codornices que habían sido expuestas durante su desarrollo al ruido de ciudad presentaban niveles mayores de GSH. Observamos también que, para el último día de experimentación, las codornices del grupo que había sido expuesto al ruido de ciudad demoraron más en encontrar la recompensa.

6.1 Niveles de GSH

Contrario a lo esperado, encontramos que los niveles del GSH fueron significativamente más altos en el grupo expuesto al ruido de ciudad en comparación al grupo rural. Algunos estudios han sugerido que la capacidad antioxidante puede ser explicada por factores ambientales relacionados a estrés (Costantini y DellOmo 2006; Rubolini et al. 2006). En el caso de la GSH, existe evidencia de que aves en ambientes más estresantes, tienen niveles mayores de este antioxidante, como por ejemplo, en el trabajo de Isaksson et al. (2005), quienes al comparar dos poblaciones del carbonero común, una de ciudad y otra de ambiente de ambiente rural, encuentran que las aves adultas de ciudad presentan niveles más altos de glutatión reducido (GSSG:GSH), sin embargo el total de glutatión (reducido y oxidado) no varió entre los dos ambientes. Basándonos en dicha evidencia, se podría inferir que los niveles más altos de glutatión

en el grupo ruido fueron debidos a un mayor estrés ambiental, lo cual se reflejó en una mayor producción del antioxidante glutatión, situación que estaría siendo provocada solo por el estrés acústico. Es decir, el ruido de ciudad por si solo es capaz de modificar la capacidad antioxidante de un organismo. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que los niveles de antioxidantes reflejan la producción de radicales libres (Constantini 2008, Herrera-Dueñas et al. 2014, Isaksson et al. 2011, Mollet et al. 2010), y a su vez que el ruido de ciudad representa un factor de estrés para las aves (Shannon et al. 2016, Davies et al. 2017, Isaksson 2015). Además, existe evidencia de que la pérdida de audición está relacionada con los niveles de antioxidante. Un estudio experimental suministró GSH intraperitoneal a coballas (*Cavia porcellus*) que habían sido expuestas a niveles altos de ruido (sobre 118 dB), encontrando que hubo una menor degeneración coclear en aquellas que recibieron este tratamiento (Ohinata et al. 2000).

Sin embargo, el hecho de haber encontrado niveles mayores de GSH en el grupo ruido podrían tener otra explicación.: los niveles de glutatión mayores en el grupo ruido podrían indicar que la capacidad antioxidante de estos individuos es mayor, y que su organismo está respondiendo de manera más eficiente al estrés acústico. Sin embargo, queda demostrado que existe una mayor movilización del sistema antioxidante glutatión causado por el daño oxidativo, inducido por un estresor ambiental, que en este caso fue el ruido de ciudad. Si este entorno de estrés acústico se mantuviese en el tiempo, se podría esperar que la capacidad antioxidante varíe debido a otras demandas fisiológicas, por ejemplo, el costo de reproducción (Alonso-Álvarez et al. 2004). Además, a nivel poblacional el daño oxidativo ha sido relacionado con menores tasas de sobrevivencia y menor tamaño corporal de la nidada (Cohen et

al. 2008), menor éxito reproductivo (Alonso-Álvarez et al. 2004) y procesos de envejecimiento prematuro, mediante el acortamiento de telómeros (von Zglinicki 2002). Sin embargo, utilizar el glutatión como único parámetro para inferir el nivel de daño oxidativo a largo plazo puede ser insuficiente, por lo cual, utilizar otras variables en estudios a largo plazo, podría ser útil para resolver estas interrogantes.

Por otro lado, también se observó una asociación entre los niveles de GSH relacionadas al tiempo de inmovilidad tónica: Las codornices que demoraron más tiempo en abandonar la posición inmóvil presentaron niveles más altos de GSH ($t_{10} = 2.85$, $p = 0.02$). El estado de inmovilidad tónica es una reacción que tal como indica su nombre, involucra la inmovilidad física del sujeto. El patrón en común de inducir este estado es la restricción física durante un periodo breve de tiempo, posterior al cual el ave en lugar de reincorporarse rápidamente permanece estática y en un estado similar al catatónico descrito en medicina humana (Gallup y Maser 1977). Este estado ha sido relacionado con situaciones estresantes, las cuales generan aumento en la frecuencia cardíaca, temores involuntarios, alteración en patrones de electroencefalografía (Babish 2006) y aumento en la tasa respiratoria, generando de esta forma un incremento en la producción de radicales libres (Gallup 1977). Los resultados del presente estudio podrían estar indicando que la inmovilidad tónica, ya catalogada anteriormente como una medida de estrés en aves, genera cambios en el estado antioxidante, lo que su vez provocaría una mayor producción de antioxidante glutatión en respuesta a este aumento.

Pocos estudios han relacionado la inmovilidad tónica y niveles de antioxidantes (Peraí et al. 2014, Egbuniwe et al. 2016). Por ejemplo, el uso de ácido ascórbico en la dieta de pollos broiler disminuyó los tiempos de inmovilidad tónica y mejoró la actividad

de enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa (Egbuniwe et al. 2016). Por otro lado, la administración de GSH por vía intracerebroventricular, induce efectos sedantes e hipnóticos en pollos neonatales (Yamane et al. 2007), lo cual podría estar relacionado con que las codornices con mayores niveles de GSH fueron las que permanecieron más tiempo estáticas.

En relación con el ruido de ciudad, éste no generó variabilidad significativa en la respuesta inmóvil de los individuos. En estudios anteriores, la presencia de ruidos fuertes (120 dB) se relacionó directamente con un mayor tiempo de permanencia en la posición inmóvil (Gallup 1977). Se podría inferir que el ruido al que se sometieron las codornices del presente estudio no fue suficientemente alto como para generar un alza tan notoria en el tiempo de inmovilidad tónica, sin embargo, si afectó la producción de GSH y el aprendizaje y la memoria.

6.2 Aprendizaje y memoria

Comprobamos que el ruido de ciudad genera diferencias en el aprendizaje en aves jóvenes, ya que las codornices expuestas al ruido de ciudad demoraron significativamente más tiempo en encontrar la recompensa al tercer día de acondicionamiento. Existe evidencia de que el estrés puede generar déficits cognitivos y de memoria en diversos taxa (Romero y Wingfield 2015). En las ratas se ha observado que periodos cortos de estrés inducido por manipulación manual son suficientes para generar depleción de la capacidad cognitiva y de la memoria espacial (Sandi et al. 2003), esta última, entendida como la capacidad de un individuo de reconocer su ambiente y la orientación espacial dentro de dicho ambiente (Healy

1998). De manera similar en pollos (*Gallus gallus domesticus*), el estrés provocado por alteración del fotoperiodo mediante la utilización de un foco de luz a tiempos impredecibles generó disrupción de la memoria espacial (Lindqvist et al. 2007, Lindqvist et al. 2009). Por el contrario, una semana de estrés mediante manipulación en codornices, generó un mejor desempeño de éstas en la capacidad de recordar objetos en determinados lugares (Calandreau et al. 2011). Este último trabajo incluye la habituación y el entrenamiento espacial de manera similar a lo realizado en la investigación de esta tesis, sin embargo, el estrés aplicado en este caso no fue suficiente para afectar de manera profunda las habilidades de memoria en las codornices. Nuestros resultados sugieren, que el ruido de ciudad genera un efecto más significativo a nivel cerebral durante etapas iniciales de crecimiento, que el estrés por manipulación. En humanos, niveles altos de ruido han sido relacionados con problemas en la memoria de reconocimiento en niños (Lercher et al. 2003). En ratas (*Rattus norvegicus*), se han obtenido resultados similares (Cui et al. 2009). En esta investigación, las ratas fueron entrenadas en un laberinto que contenía pistas visuales y recompensas en determinadas posiciones. Uno de estos grupos fue sometido a ruido (un bip transmitido por un generador de ruido) y el otro actuó como control. Los individuos que experimentaron el ruido fueron los que demoraron más tiempo en encontrar la posición con la recompensa. Por otro lado, en un estudio sobre las vocalizaciones de una especie de passeriforme (*Taeniopygia guttata*) a edades tempranas, un grupo fue sometido a niveles de ruido extremo (>110 dB) y una vez terminado el periodo de exposición, ninguna de estas aves pudo vocalizar de manera “normal” (Funabiki y Konishi 2003). La explicación dada por los autores ante este fenómeno fue que el ruido interfirió en la capacidad de aprendizaje de canto de dichas aves.

Estas dificultades en el aprendizaje podrían ser el resultado de cambios en el patrón neuronal, en los receptores neuronales o por variación en los neurotransmisores. El papel de los radicales libres de oxígeno (ROS) en la neurodegeneración y en el declive cognitivo han sido documentados previamente (Gallagher et al. 1996, Berr et al. 2000). La pérdida de memoria causada por el envejecimiento está correlacionada con la disminución en los niveles de GSH en el plasma (Rinaldi et al. 2003). La cisteína es el principal precursor de la biosíntesis intracelular de GSH, y en humanos se ha observado una disminución fisiológica de este precursor relacionado con la edad (Hack et al. 1998), lo cual podría explicar los procesos de pérdida de memoria y de capacidades cognitivas en personas de edad avanzada. En otros animales, sin embargo, la correlación entre GSH y la memoria ha sido poco estudiada. Se ha documentado que la disfuncionalidad cognitiva en ratas de edad avanzada está correlacionada con niveles decrecientes de GSH plasmático (Chen et al. 1989), y otros estudios han relacionado la mejora en las habilidades de aprendizaje mediante la suplementación exógena de N-acetylcisteína, la cual de manera indirecta aumenta la síntesis de glutatión (Chen et al. 1989, Banaclocha et al. 1997, Berr et al. 2000). Hasta la fecha, esta relación no ha sido descrita en animales jóvenes. Los resultados obtenidos en esta tesis apuntan a que existe una relación directa entre los niveles de GSH y las aves que demoran más tiempo en encontrar la recompensa, pero en este caso los niveles de GSH fueron mayores. Nuevamente, esto podría estar indicando que existe un mayor trabajo por parte de estos animales en aumentar la producción de antioxidante, probablemente debido a un aumento en la producción de ROS, inducida por un estado de estrés ambiental causado por el ruido de ciudad. En animales jóvenes la capacidad antioxidante no debiese estar en declive, por el contrario, debiese estar en un

funcionamiento óptimo debido a que aún no presentan otras demandas fisiológicas que impliquen una alta producción de ROS (Constantini 2008), como por ejemplo el costo reproductivo. Sin embargo, es preocupante que estos animales con mayores niveles de GSH sean los que más dificultad presentaron para recordar donde estaba la recompensa, es decir, presentaron una menor memoria espacial. Estudios a largo plazo son necesarios para lograr comprender a cabalidad las implicancias del estrés causado por el ruido de ciudad sobre la capacidad antioxidante y cognitivas en las aves.

Finalmente es interesante notar que el peso corporal de las codornices no varió entre los grupos. En este estudio se puso a prueba si el ruido de ciudad representaba un factor de estrés en las aves en etapas de crecimiento, para lo cual el peso corporal ha sido utilizado como un buen indicador de calidad del individuo en aves (Gray et al. 1990; Romero y Wikelski 2001) debido a que forrajean menos en situaciones estresantes. En el presente trabajo no se observaron diferencias significativas en la ganancia de peso entre los dos grupos. Una posible explicación a este fenómeno podría ser que dentro del modelo experimental que se utilizó, las codornices se encontraban agrupadas de a tres por jaula, permitiendo de este modo una “impronta filial” que ya ha sido descrita antes (véase Mills et al. 1997), considerando que se trata de una especie de preferencia gregaria (Dorrance y Zentall 2001), lo cual podría amortiguar los efectos del estrés al momento de la alimentación.

7. CONCLUSIONES

El ruido de ciudad representa un factor de estrés para las codornices, demostrado mediante un mayor desempeño del sistema antioxidante glutatión. A la vez, las codornices que crecen en ambientes con ruido urbano presentan dificultades en las capacidades de aprendizaje y memoria.



8. BIBLIOGRAFÍA

Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Gaillard, M., Prost, J., Faivre, B., & Sorci, G. (2004). An experimental test of the dose-dependent effect of carotenoids and immune activation on sexual signals and antioxidant activity. *The American Naturalist*, 164(5), 651-659.

Babisch, W. (2006). Transportation noise and cardiovascular risk: updated review and synthesis of epidemiological studies indicate that the evidence has increased. *Noise and Health*, 8(30), 1.

Banaclocha, M. M., Hernandez, A. I., Martinez, N., & Ferrandiz, M. L. (1997). N-acetylcysteine protects against age-related increase in oxidized proteins in mouse synaptic mitochondria. *Brain research*, 762(1-2), 256-258.

Barber, J. R., Crooks, K. R., & Fristrup, K. M. (2010). The costs of chronic noise exposure for terrestrial organisms. *Trends in ecology & evolution*, 25(3), 180-189.

Berr, C., Balansard, B., Arnaud, J., Roussel, A. M., Alperovitch, A., & EVA Study Group. (2000). Cognitive decline is associated with systemic oxidative stress: the EVA study. *Journal of the American Geriatrics Society*, 48(10), 1285-1291.

Blickley JL, et al. (2012) Experimental chronic noise is related to elevated fecal corticosteroid metabolites in lekking male greater Sage-Grouse (*Centrocercus urophasianus*). *PLoS One* 7:e50462.

Calandreau, L., Bertin, A., Boissy, A., Arnould, C., Constantin, P., Desmedt, A., ... & Leterrier, C. (2011). Effect of one week of stress on emotional reactivity and learning and memory performances in Japanese quail. *Behavioural brain research*, 217(1), 104-110.

Campo, J. L., Gil, M. G., & Davila, S. G. (2005). Effects of specific noise and music stimuli on stress and fear levels of laying hens of several breeds. *Applied Animal Behaviour Science*, 91(1-2), 75-84.

Chen, T. S., Richie Jr, J. P., & Lang, C. A. (1989). The effect of aging on glutathione and cysteine levels in different regions of the mouse brain. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 190(4), 399-402.

Costantini, D. (2008). Oxidative stress in ecology and evolution: lessons from avian studies. *Ecology letters*, 11(11), 1238-1251.

Costantini, D., & Dell’Omo, G. (2006). Environmental and genetic components of oxidative stress in wild kestrel nestlings (*Falco tinnunculus*). *Journal of Comparative Physiology B*, 176(6), 575-579.

Crino, O. L., Van Oorschot, B. K., Johnson, E. E., Malisch, J. L., & Breuner, C. W. (2011). Proximity to a high traffic road: glucocorticoid and life history consequences for nestling white-crowned sparrows. *General and comparative endocrinology*, 173(2), 323-332.

Cui, B., Wu, M., & She, X. (2009). Effects of chronic noise exposure on spatial learning and memory of rats in relation to neurotransmitters and NMDAR2B alteration in the hippocampus. *Journal of occupational health*, 51(2), 152-158.

Cyr NE, Earle K, Tam C, Romero LM (2007) The effect of chronic psychological stress on corticosterone, plasma metabolites, and immune responsiveness in European starlings. *Gen Comp Endocrinol* 154:59–66.

Cohen, A. A., McGraw, K. J., Wiersma, P., Williams, J. B., Robinson, W. D., Robinson, T. R., & Ricklefs, R. E. (2008). Interspecific associations between circulating antioxidant levels and life-history variation in birds. *The American Naturalist*, 172(2), 178-193.

Davies, S., Haddad, N., & Ouyang, J. Q. (2017). Stressful city sounds: glucocorticoid responses to experimental traffic noise are environmentally dependent. *Biology letters*, *13*(10), 20170276.

DeRuiter, S. L., Southall, B. L., Calambokidis, J., Zimmer, W. M., Sadykova, D., Falcone, E. A., ... & Thomas, L. (2013). First direct measurements of behavioural responses by Cuvier's beaked whales to mid-frequency active sonar. *Biology letters*, *9*(4), 20130223.

Doksæter, L., Rune Godø, O., Olav Handegard, N., Kvadsheim, P. H., Lam, F. P. A., Donovan, C., & Miller, P. J. (2009). Behavioral responses of herring (*Clupea harengus*) to 1–2 and 6–7 kHz sonar signals and killer whale feeding sounds. *The Journal of the Acoustical Society of America*, *125*(1), 554-564.

Dorrance, B. R., & Zentall, T. R. (2001). Imitative learning in Japanese quail (*Coturnix japonica*) depends on the motivational state of the observer quail at the time of observation. *Journal of Comparative Psychology*, *115*(1), 62.

Egbuniwe, I. C., Ayo, J. O., Kawu, M. U., & Mohammed, A. (2016). Effects of betaine and ascorbic acid on tonic immobility, superoxide dismutase and glutathione peroxidase in broiler chickens during the hot-dry season. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research*, *12*, 60-65.

Ellison, W. T., Southall, B. L., Clark, C. W., & Frankel, A. S. (2012). A new context-based approach to assess marine mammal behavioral responses to anthropogenic sounds. *Conservation Biology*, 26(1), 21-28.

Funabiki, Y., & Konishi, M. (2003). Long memory in song learning by zebra finches. *Journal of Neuroscience*, 23(17), 6928-6935.

Fyhri, A., & Aasvang, G. M. (2010). Noise, sleep and poor health: Modeling the relationship between road traffic noise and cardiovascular problems. *Science of the Total Environment*, 408(21), 4935-4942.

Gallup, G. G. (1977). Tonic immobility: the role of fear and predation. *The Psychological Record*, 27(1), 41-61.

Gallagher, M., Landfield, P. W., McEwen, B., Meaney, M. J., Rapp, P. R., Sapolsky, R., & West, M. J. (1996). Hippocampal neurodegeneration in aging. *Science*, 274(5287), 481-485.

Gallup Jr, G. G., & Maser, J. D. (1977). Catatonia: Tonic immobility: Evolutionary underpinnings of human catalepsy and catatonia.

Galvani, P., Cassani, A., Fumagalli, P., & Santagostino, A. (2000). Effect of paraquat on glutathione activity in Japanese quail. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 64(1), 74-80.

Goldbogen, J. A., Southall, B. L., DeRuiter, S. L., Calambokidis, J., Friedlaender, A. S., Hazen, E. L., ... & Kyburg, C. (2013). Blue whales respond to simulated mid-frequency military sonar. *Proc. R. Soc. B*, 280(1765), 20130657.

Gray, J. M., Yarian, D., & Ramenofsky, M. (1990). Corticosterone, foraging behavior, and metabolism in dark-eyed juncos, *Junco hyemalis*. *General and comparative endocrinology*, 79(3), 375-384.

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA.

Hansell, A. L., Blangiardo, M., Fortunato, L., Floud, S., de Hoogh, K., Fecht, D., ... & Beevers, S. (2013). Aircraft noise and cardiovascular disease near Heathrow airport in London: small area study. *Bmj*, 347, f5432.

Hatch, L. T., Clark, C. W., Van Parijs, S. M., Frankel, A. S., & Ponirakis, D. W. (2012). Quantifying loss of acoustic communication space for right whales in and around a US National Marine Sanctuary. *Conservation Biology*, 26(6), 983-994.

Hack, V., Breitzkreutz, R., Kinscherf, R., Röhrer, H., Bärtsch, P., Taut, F., & Dröge, W. (1998). The redox state as a correlate of senescence and wasting and as a target for therapeutic intervention. *Blood*, 92(1), 59-67.

Healy, S. E. (1998). *Spatial representation in animals*. Oxford University Press.

Herrera-Duenas, A., Pineda, J., Antonio, M. T., & Aguirre, J. I. (2014). Oxidative stress of house sparrow as bioindicator of urban pollution. *Ecological indicators*, 42, 6-9.

Isaksson, C. (2015). Urbanization, oxidative stress and inflammation: a question of evolving, acclimatizing or coping with urban environmental stress. *Functional Ecology*, 29(7), 913-923.

Isaksson, C., Örnberg, J., Stephensen, E., & Andersson, S. (2005). Plasma glutathione and carotenoid coloration as potential biomarkers of environmental stress in great tits. *EcoHealth*, 2(2), 138-146.

Isaksson, C., Sturve, J., Almroth, B. C., & Andersson, S. (2009). The impact of urban environment on oxidative damage (TBARS) and antioxidant systems in lungs and liver of great tits, *Parus major*. *Environmental research*, *109*(1), 46-50.

Isaksson, C., Sheldon, B. C., & Uller, T. (2011). The challenges of integrating oxidative stress into life-history biology. *Bioscience*, *61*(3), 194-202.

Jaeschke, H. A. (1990). Glutathione disulfide as index of oxidant stress in rat liver during hypoxia. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *258*(4), G499-G505.

Jones, R. B. (1986). The tonic immobility reaction of the domestic fowl: a review. *World's poultry science journal*, *42*(1), 82-96.

Jones, R. B., Mills, A. D., Faure, J. M., & Williams, J. B. (1994). Restraint, fear, and distress in Japanese quail genetically selected for long or short tonic immobility reactions. *Physiology & behavior*, *56*(3), 529-534.

Karp, D. S., & Root, T. L. (2009). Sound the stressor: how Hoatzins (*Opisthocomus hoazin*) react to ecotourist conversation. *Biodiversity and Conservation*, *18*(14), 3733.

Kleist, N. J., Guralnick, R. P., Cruz, A., Lowry, C. A., & Francis, C. D. (2018). Chronic anthropogenic noise disrupts glucocorticoid signaling and has multiple effects on fitness in an avian community. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(4), E648-E657.

Lercher, P., Evans, G. W., & Meis, M. (2003). Ambient noise and cognitive processes among primary schoolchildren. *Environment and Behavior*, *35*(6), 725-735.

Limón-Pacheco, J., & Gonsebatt, M. E. (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *674*(1), 137-147.

Lindqvist, C., & Jensen, P. (2009). Domestication and stress effects on contrafreeloading and spatial learning performance in red jungle fowl (*Gallus gallus*) and White Leghorn layers. *Behavioural Processes*, *81*(1), 80-84.

Lindqvist, C., Janczak, A. M., Nätt, D., Baranowska, I., Lindqvist, N., Wichman, A. & Jensen, P. (2007). Transmission of stress-induced learning impairment and associated brain gene expression from parents to offspring in chickens. *PloS one*, *2*(4), e364.

Meillere, A., Brischoux, F., Ribout, C., & Angelier, F. (2015). Traffic noise exposure affects telomere length in nestling house sparrows. *Biology letters*, *11*(9), 20150559.

Mills, A. D., Crawford, L. L., Domjan, M., & Faure, J. M. (1997). The behavior of the Japanese or domestic quail *Coturnix japonica*. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *21*(3), 261-281.

Mockford, E. J., & Marshall, R. C. (2009). Effects of urban noise on song and response behaviour in great tits. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, rspb20090586.

Møller, A. P., Erritzøe, J., & Karadas, F. (2010). Levels of antioxidants in rural and urban birds and their consequences. *Oecologia*, *163*(1), 35-45.

Nanda, I., Schrama, D., Feichtinger, W., Haaf, T., Scharl, M., & Schmid, M. (2002). Distribution of telomeric (TTAGGG) n sequences in avian chromosomes. *Chromosoma*, *111*(4), 215-227.

Ohinata, Y., Yamasoba, T., Schacht, J., & Miller, J. M. (2000). Glutathione limits noise-induced hearing loss. *Hearing research*, *146*(1-2), 28-34.

Patel, R., McIntosh, L., McLaughlin, J., Brooke, S., Nimon, V., & Sapolsky, R. (2002). Disruptive effects of glucocorticoids on glutathione peroxidase biochemistry in hippocampal cultures. *Journal of neurochemistry*, 82(1), 118-125.

Perai, A. H., Kermanshahi, H., Moghaddam, H. N., & Zarban, A. (2014). Effects of supplemental vitamin C and chromium on metabolic and hormonal responses, antioxidant status, and tonic immobility reactions of transported broiler chickens. *Biological trace element research*, 157(3), 224-233.

Powell DM, Carlstead K, Tarou LR, Brown JL, Monfort SL (2006) Effects of construction noise on behavior and cortisol levels in a pair of captive giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*). *Zoo Biol* 25:391–408.

Quinn, J., J. Whittingham, M., J. Butler, S., & Cresswell, W. (2006). Noise, predation risk compensation and vigilance in the chaffinch *Fringilla coelebs*. *Journal of Avian biology*, 37(6), 601-608.

Quirici, V., Guerrero, C. J., Krause, J. S., Wingfield, J. C., & Vásquez, R. A. (2016). The relationship of telomere length to baseline corticosterone levels in nestlings of an altricial passerine bird in natural populations. *Frontiers in zoology*, 13(1), 1.

Rinaldi, P., Polidori, M. C., Metastasio, A., Mariani, E., Mattioli, P., Cherubini, A., ... & Mecocci, P. (2003). Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 24(7), 915-919.

Romero, L. M. (2004). Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(5), 249-255.

Romero, L. M., & Wikelski, M. (2001). Corticosterone levels predict survival probabilities of Galapagos marine iguanas during El Nino events. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(13), 7366-7370.

Romero, L. M., & Wingfield, J. C. (2015). *Tempests, poxes, predators, and people: stress in wild animals and how they cope*. Oxford University Press.

Rubolini, D., Romano, M., Bonisoli Alquati, A., & Saino, N. (2006). Early maternal, genetic and environmental components of antioxidant protection, morphology and immunity of yellow-legged gull (*Larus michahellis*) chicks. *Journal of evolutionary biology*, 19(5), 1571-1584.

Salmón, P., Nilsson, J. F., Nord, A., Bensch, S., & Isaksson, C. (2016). Urban environment shortens telomere length in nestling great tits, *Parus major*. *Biology letters*, *12*(6), 20160155.

Sandi, C., Davies, H. A., Cordero, M. I., Rodriguez, J. J., Popov, V. I., & Stewart, M. G. (2003). Rapid reversal of stress induced loss of synapses in CA3 of rat hippocampus following water maze training. *European Journal of Neuroscience*, *17*(11), 2447-2456.

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.

Shannon, G., McKenna, M. F., Angeloni, L. M., Crooks, K. R., Fristrup, K. M., Brown, E. & McFarland, S. (2016). A synthesis of two decades of research documenting the effects of noise on wildlife. *Biological Reviews*, *91*(4), 982-1005.

Sheldon, B. C., & Verhulst, S. (1996). Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends in ecology & evolution*, *11*(8), 317-321.

Siemers, B. M., & Schaub, A. (2011). Hunting at the highway: traffic noise reduces foraging efficiency in acoustic predators. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 278(1712), 1646-1652.

Spencer, K. A., Evans, N. P., & Monaghan, P. (2008). Postnatal stress in birds: a novel model of glucocorticoid programming of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology*, 150(4), 1931-1934.

Szalma, J. L., & Hancock, P. A. (2011). Noise effects on human performance: a meta-analytic synthesis. *Psychological bulletin*, 137(4), 682.

Tyack, P. L., Zimmer, W. M., Moretti, D., Southall, B. L., Claridge, D. E., Durban, J. W., ... & McCarthy, E. (2011). Beaked whales respond to simulated and actual navy sonar. *PloS one*, 6(3), e17009.

Vassallo, B. G., Paitz, R. T., Fasanello, V. J., & Hausmann, M. F. (2014). Glucocorticoid metabolism in the in ovo environment modulates exposure to maternal corticosterone in Japanese quail embryos (*Coturnix japonica*). *Biology letters*, 10(11), 20140502.

von Zglinicki, T. (2002). Oxidative stress shortens telomeres. *Trends in biochemical sciences*, 27(7), 339-344.

Woodard, A. E., Abplanalp, H., & Wilson, W. O. (1965). Japanese quail husbandry in the laboratory (*Coturnix coturnix japonica*). *Japanese quail husbandry in the laboratory (Coturnix coturnix japonica)*.

Yamane, H., Tomonaga, S., Suenaga, R., Denbow, D. M., & Furuse, M. (2007). Intracerebroventricular injection of glutathione and its derivative induces sedative and hypnotic effects under an acute stress in neonatal chicks. *Neuroscience letters*, 418(1), 87-91.

Young, R. C., Welcker, J., Barger, C. P., Hatch, S. A., Merklings, T., Kitaiskaia, E. V & Kitaysky, A. S. (2017). Effects of developmental conditions on growth, stress and telomeres in black-legged kittiwake chicks. *Molecular ecology*, 26(13), 3572-3584.