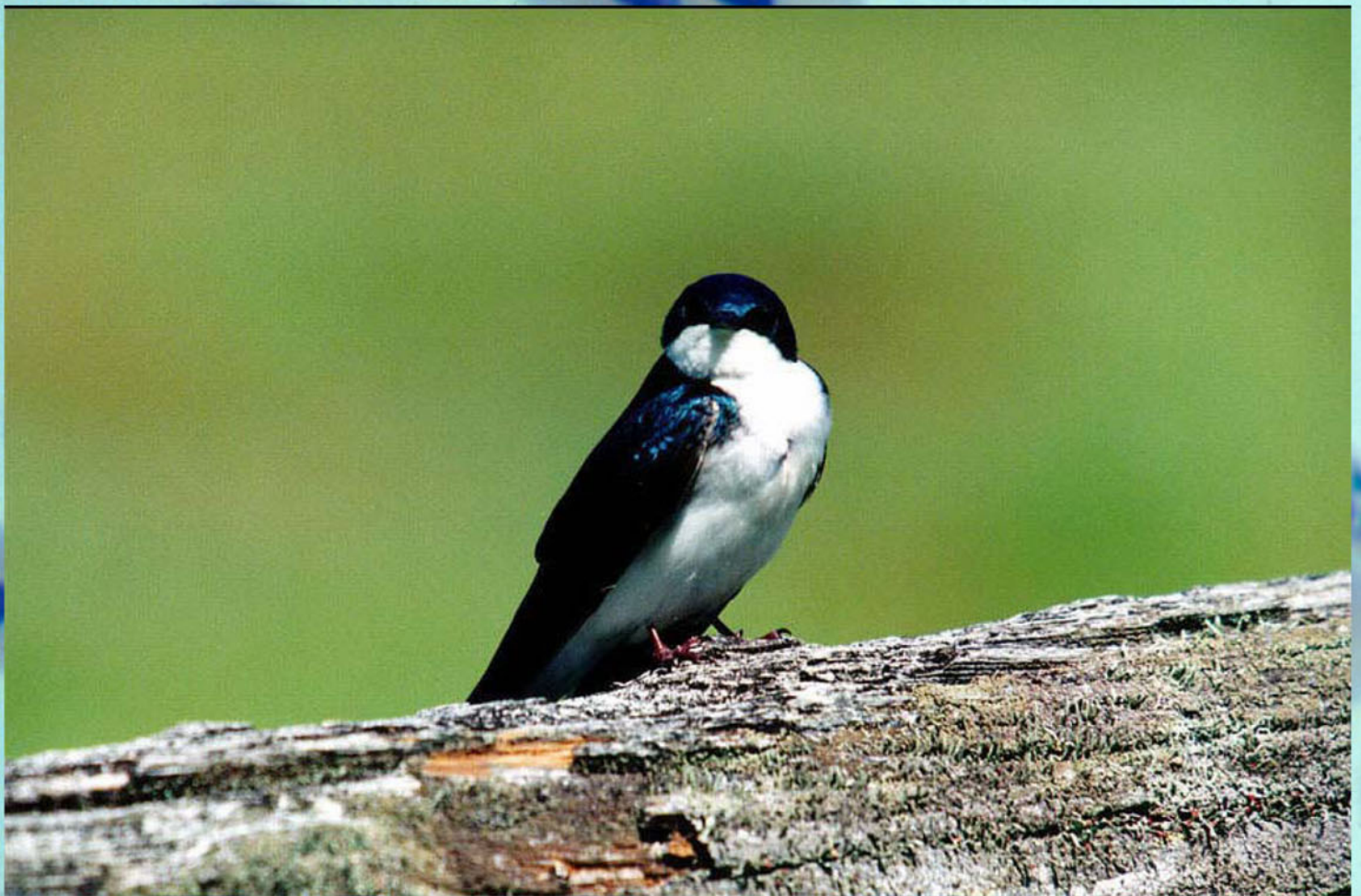


**Senescencia, parasitismo,
inmunidad y éxito reproductor
en el Avión Común
(*Delichon urbica* Linneo 1758)**



Alfonso Marzal Reynolds

TESIS DOCTORAL Noviembre 2005

Departamento de Ciencias Morfológicas,
Biología Celular y Animal

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Ciencias Morfológicas, Biología Celular y Animal



**“Senescencia, Parasitismo, Inmunidad y Éxito
Reproductor en el Avión Común (*Delichon urbica*
Linneo 1758)”**

Memoria presentada por el licenciado D. Alfonso Marzal Reynolds para optar al Grado de Doctor Europeo en Ciencias Biológicas, dentro del programa de doctorado “Uso y Gestión de Recursos Faunísticos”, dirigida por el Dr. Florentino de Lope Rebollo

VºBº Director de la Tesis

El doctorando

Dr. Florentino de Lope Rebollo
Catedrático de Biología Animal

Alfonso Marzal Reynolds

A mis padres y hermanas
A Rocío

Índice.

Agradecimientos.....página 5

Capítulo I *INTRODUCCIÓN GENERAL, MÉTODOS GENERALES Y OBJETIVOS*

Introducción general y antecedentespágina 8
Métodos generales.....página 33
Objetivos.....página 36
Referencias.....página 37

Capítulo II *CÓMO LOS PARÁSITOS MALÁRICOS PUEDEN DISMINUIR EL ÉXITO REPRODUCTOR: UN ESTUDIO EXPERIMENTAL*

Abstract.....página 52
Introducción.....página 53
Materiales y métodos.....página 54
Resultados.....página 56
Discusión.....página 60
Referencias.....página 62

Capítulo III *SOBRE LOS COSTES DE LA RESPUESTA INMUNE EN LAS ESTRATEGIAS VITALES*

Abstract.....página 68
Introducción.....página 69
Materiales y métodos.....página 71
Resultados.....página 73
Discusión.....página 80
Referencias.....página 84

Capítulo IV *COSTES INMUNOLÓGICOS DE LA DEPOSICIÓN DE ANDRÓGENOS EN LA YEMA*

Abstract.....página 89
Introducción.....página 90
Materiales y métodos.....página 91
Resultados.....página 93

Discusión.....	página 95
Referencias.....	página 98
Capítulo V <i>EL PARASITISMO COMO SÍNTOMA DE ENVEJECIMIENTO: UN ESTUDIO COMPARATIVO EN HIRUNDÍNIDOS</i>	
Abstract.....	página 103
Introducción.....	página 104
Materiales y métodos.....	página 107
Resultados.....	página 109
Discusión.....	página 117
Referencias.....	página 124
Capítulo VI <i>CONCLUSIONES</i>	página 134

Agradecimientos

Esta historia comenzó hace ya muchos años, cuando un estudiante de Biológicas se acercó a un despacho soñando con pasar horas en el bosque estudiando el comportamiento de los animales, y acabó mirando por un microscopio y extrayendo ADN de los parásitos. O quizás comenzase antes, cuando despertó el interés por la Naturaleza en un niño. Pero lo realmente importante es que muchas personas han contribuido a que esta historia llegase a buen puerto. Vayan desde aquí de antemano mis agradecimientos y disculpas por si olvidase alguno en la cabeza, que no el corazón.

La primera persona a la que debo agradecer, y mucho, es a la que pertenecía ese despacho, mi director de Tesis, Florentino de Lope, que supo como nadie escuchar mis ideas y encauzarlas. A él le debo Jamás podré agradecerle todo lo que me ha dado. Gracias, Tinín, por la ocasión de trabajar junto a ti, por tus consejos, por tu dedicación y dirección en todos estos años.

Esta tesis se financió con los proyectos del Ministerio de Educación y Ciencia. BOS 2000-0293 y BOS 2003-01713, y una beca FPI de la Junta de Extremadura FIC 01A043. Gracias a estos organismos y a la Universidad de Extremadura por darme la oportunidad y medios para realizar esta tesis. Quisiera también agradecer a Luis Marín y a todo el personal de la RUCAB el cuidar de los avioncitos y permitirme trabajar allí.

Gracias también a Anders Moller, que me abrió las puertas del laboratorio de la Universidad Pierre et Marie Curie de Paris, por su paciencia y ayuda. Todos estos años ha sido para mi “much more than an unofficial Director”

Otro gran culpable de que esto funcionase es Diego Gil, un burgalés “embrutesio”, gran investigador y mejor amigo. Gracias también a Helene, que siempre me escucha y se preocupa por mi vida. Y a Pablo y Oscar, por extensión.

A Maribel, simplemente porque sin tu inestimable ayuda jamás podría haber hecho nada, por tu constancia en el trabajo. Eres la mejor amiga que jamás podría tener. A Santiago Merino, del Museo de Ciencias Naturales de Madrid, por enseñarme a examinar los frotis e identificar parásitos. No sé como lo hace, pero siempre saca tiempo para atenderme.

Quisiera agradecer a los profesores del departamento, los doctores Antonio Muñoz, Eduardo da Silva, Manuel Blasco, Ricardo Morán, Casimiro Corbacho, Carlos de la Cruz, José Luis Pérez y Juan Manuel Sánchez por su ayuda en todos estos años. A Ana, por su ayuda y disposición desde la secretaría. Y, por supuesto, a todos los

becarios José Antonio, Elena, Emilio, los dos Pacos, Pipe, Fátima, Mamen, Elsa, Berna, Chema, Noelia, Mario, Fernando y Nacho. Muy especialmente a Auxi y Bettina, por su enorme simpatía y ayuda. ¡Vosotras sois las siguientes! Y los que pasaron por aquí, Gema, Pedro, Carlos, Willy, Lola, Desi, Jesús, Pepo, Laszlo y Paola.

Muchísimas gracias también a Manolo Ramírez, Matilde Maqueda y Ana Muñoz, del laboratorio de Microbiología del Antiguo Rectorado, por prestarme vuestra ayuda y material para poner en práctica toda la parte de Biología Molecular.

A John Ewen, un simpático neozelandés que me introdujo en el mágico mundo de las PCRs. Él me enseñó a decir “hocus-pocus” cada vez que poníamos alguna a funcionar. Y, por supuesto, a todos los compañeros del Laboratoire de Ecologie Evolutive Parasitaire de Paris, que siempre me trataron como a uno más.

Gracias, Irene, por enseñarme que el azul es el color del atractivo, por abrirme los ojos al mundo e ilusionarme con mi trabajo. Y a Isabel, porque con su ayuda y simpatía las PCRs no nos derrotaron (y por esos míticos “chilaquiles”)

Mención aparte merecen todas las personas que me ayudaron “cogiendo pajaritos”. Yolanda, Carmen, Sara, Leticia, Rocío y Montse: vosotras fuisteis las primeras y juntos aprendimos el trabajo de campo. Y al equipo de ambientólogas que llegó después Ana, Puri, Marisol, María, Vicky, Iris, Antonia, Berta, Bea y Tamara. Muchísimas gracias, mis niñas, por toda vuestra ayuda en todos los días, por los madrugones, por los fines de semana que os robé, por las subidas y bajadas de la escalera.

A mis AMIGOS, así, con mayúsculas, porque son los mejores. Ellos son, junto a mi familia, los que más han sufrido mis ausencias y silencios. Gracias a Jorge, Sonia, Carlos, Inma, Ana, Luis y Gloria. Vuestro interés y ayuda durante todo este tiempo ha sido infinito. Con Javier y Ricardo, dos buenos amigos, pasé muy buenos ratos en el campo. Gracias a ti también, Ana, que durante mucho tiempo me animaste a seguir. No quiero olvidar a un gran amigo, catalán de nacimiento y extremeño de adopción y de corazón; gracias, José Luis, por tu interés y escucha.

Tampoco olvido a todos mis amigos y compañeros del colegio por su interés todos estos años. Gracias a Manolo y Clemen, Ángel y Santa, María, Pedro, Julio, Luis, Ángel, Inmaculada, Benedicto, José Antonio, Javi Rosa, Wenceslao, Jerónimo y muchos más. Dos personas merecen un apartado aparte en este capítulo. Juan, siempre dispuesto a escucharme. Y Guillermo, que me anima a seguir y me entiende como nadie; él no lo sabe, pero tuvo gran parte de culpa en mi elección por Biología. Y, por

supuesto, a todos mis alumnos de esos años, muy especialmente al curso de 1º y 2º A de esos años, que nunca los olvidaré. Gracias, Bea, por tu amistad e ilusión.

Estoy seguro que ningún trabajo se puede realizar si no hay amigos que se preocupen porque desconectes. Gracias Olmo, Sosa, José Ángel, Lolo y Gonzalo. Las almejititas son míticas en el patio de vecinos.

A Carlota, Mario, Carlos, Diego, Mónica y Fátima, por las cenas y las conversaciones que tuvimos. Aprendí mucho de vosotros.

Gracias también a todos los Paquetes de la Uex, por dejarme divertirme con vosotros los miércoles. Gracias Javi, Antonio, Viti, Oyola, José, Juanfran, Agustín, Jesús, Javi Rivas, Julián.

A Lourdes, Gema, Maribel y Victoria, mi equipo de huroncitos, con las que viví las mejores aventuras. Juntos llegamos al fin del mundo, sufrimos los mosquitos de los bosques boreales y pasamos una noche viendo osos. Fueron mágicas esas vacaciones.

Mis padres y hermanas han sido mi apoyo fundamental todo este tiempo, siempre han estado empujándome a seguir. Gracias también a Coque, ¡uno más en la familia! Y a dos personas muy especiales, Pachuca y mi tía Lola, por su cariño incondicional.

Y, como no, gracias a ti, Rocío. Porque siempre me has querido, me escuchas y entiendes. Me has devuelto la ilusión y enseñado que los sueños se pueden cumplir.

Por último, quiero agradecer a tres buenas personas que tuvieron mucho que ver al principio. A Alfonso no le conocí pero me contaron mucho de él, al que me quise parecer desde que era niño. El segundo, Modesto, me cuidó en el campo como a un nieto. Y el tercero, Carlos. Fueron muchos días los que estuve junto a él, y mayores sus enseñanzas; todo el mundo conoce la admiración de un nieto por su abuelo.

Capítulo I

Introducción general, métodos generales y objetivos

INTRODUCCIÓN GENERAL Y ANTECEDENTES

EFFECTOS PERJUDICIALES DE LOS PARÁSITOS MALÁRICOS EN EL ÉXITO REPRODUCTOR DE SUS HOSPEDADORES

¿Qué son parásitos?

Cuando hablamos de parásitos generalmente pensamos en visitas al veterinario con nuestras mascotas, vacunas para el viajero de países exóticos o de algunas enfermedades que afectan al hombre y al ganado, con las graves perjuicios económicos que pueden ocasionar. Rápidamente la imagen de un gusano repulsivo se nos viene a la mente. Podríamos decir, de una manera coloquial, que los parásitos tienen “mala prensa”. Sin embargo, los depredadores matan a sus presas y les atribuimos cualidades humanas como el valor o la nobleza, mientras que en muchos casos los parásitos no matan a los individuos que parasitan e, incluso, muchos estudios no han podido demostrar sus efectos nocivos. Parece, por tanto, que la relación es mucho más compleja de lo que a primera vista parece.

Si atendiésemos al origen etimológico de la palabra, parásito es un “individuo que se alimenta junto a otro” (del griego *para* = al lado; *sito* = alimentarse). Esta definición etimológica es simplista, ya que las relaciones interespecíficas que se establecen entre los organismos van mucho más allá de la alimentación. Desde el punto de vista de la ecología, el parasitismo es una relación entre dos especies, una de las cuales, el parásito, depende del otro para vivir y explota a su hospedador limitando sus recursos durante toda o alguna parte de su vida. Es decir, los parásitos utilizan los recursos de sus hospedadores para asegurar su propia supervivencia y reproducción, de forma que reducen la eficacia biológica del hospedador, llegando a ejercer presiones selectivas sobre una gran variedad de caracteres del ciclo vital de los individuos parasitados (Price 1980).

Historia del estudio de los parásitos

Desde tiempos remotos los parásitos han intrigado a médicos y naturalistas, que observaban cómo animales vivos se encontraban en el interior del intestino o en la superficie del cuerpo de animales domésticos y del hombre. Si quisiéramos realizar una búsqueda histórica de los primeros estudios de parásitos deberíamos remontarnos al año 1500 antes de Cristo, a un conjunto de jeroglíficos denominado “Papiro de Eber”, donde varios físicos egipcios describieron dos tipos de parásitos helmínticos que infectaban a sus pacientes (Bush *et al.* 2001). Grandes naturalistas como Aristóteles, Plinio el Viejo, Galeno, Vitruvio y Colmuela hablaban de diversos tipos de parásitos, sobre todo de los gusanos intestinales que afectaban al hombre y a animales domésticos. Pero no fue hasta el desarrollo de la biología moderna, y con el invento del microscopio, cuando comienza la historia de la verdadera Parasitología. Posteriormente, con el descubrimiento del haemosporidio *Plasmodium*, causante del paludismo, por Laveran en 1880, y de su mecanismo de transmisión a través del insecto vector *Anopheles* por Ronald Ross en 1897, la entomología médica y la parasitología tomaron una mayor relevancia en la medicina humana y veterinaria (Pérez-Iñigo 1976)

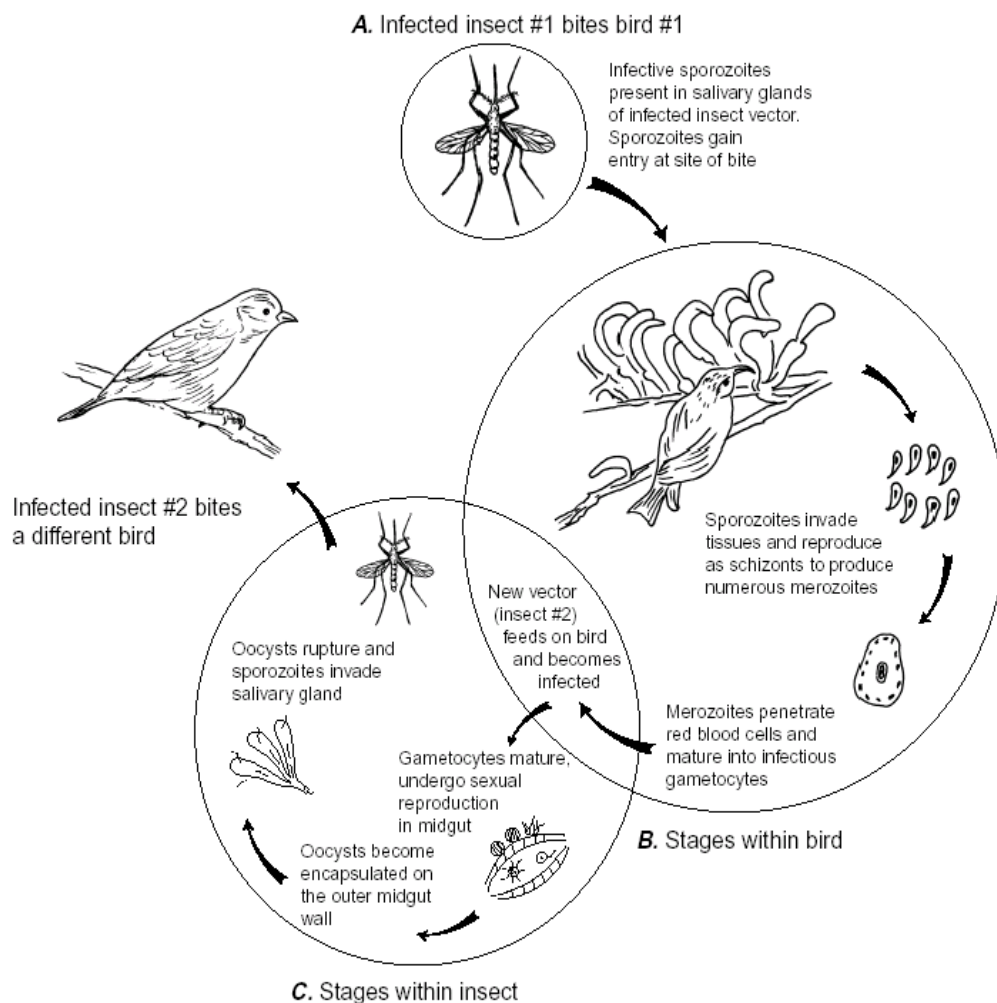
Phyllum Apicomplexa: representantes y características

Los representantes del phylum Apicomplexa son parásitos intracelulares de reptiles, aves y mamíferos que presentan unas características morfológicas y de desarrollo similares (Levine 1985). Destaca dentro del phylum el suborden Haemosporina, al que pertenecen los géneros *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* y *Plasmodium*. Su ciclo vital es bastante complejo (figura 1), desarrollando varias etapas en tejidos y en células sanguíneas de sus hospedadores (Garnham 1966). La forma de transmisión de un hospedador a otro es mediante insectos del orden Díptera. Ectoparásitos como chinches (*Oeciacus*), piojos (*Bruelia*), pulgas (*Ceratophyllus*), moscas (*Siphonaptera*) y ácaros (*Dermanyssus*) también han sido descritos como potenciales vectores de parásitos sanguíneos (Hill & Clark 1993; Clark *et al.* 1993).

El descubrimiento de los *Haemoproteus* parásitos de aves, primeros hospedadores vertebrados en que fue constatada su presencia, fue realizado por Danilewsky en 1889. Estas observaciones iniciales se refieren sólo a las formas de los

gametocitos observadas en los glóbulos rojos, para las que Labbé (1894) introdujo el nombre de *Halteridium*, con el que durante bastante tiempo han sido designados los parásitos de este género, a causa de ser ésta la forma que más frecuentemente adoptan los gametocitos en los eritrocitos parasitados (Covaleda y Gállego 1950). En los últimos años se ha realizado un gran avance en los estudios de identificación y filogenia de los parásitos haemosporidios gracias a la aplicación de técnicas moleculares basadas en la amplificación de ADN (i.e. Bensch *et al.* 2004; Pérez-Tris *et al.* 2005)

Fig. 1 El ciclo de vida complejo de un parásito hemosporidio comienza con (A) la picadura de un insecto vector infectado a un ave. Las etapas de desarrollo de la infección ocurren de forma separada en (B) el ave hospedadora y (C) el insecto vector. (Tomada de Atkinson 1999)



Los hemosporidios aviares tienen una distribución cosmopolita y una gran prevalencia, habiendo sido registrados en el 68 por ciento de las especies de aves examinadas (Atkinson y van Ripper 1991). Esta amplia distribución les convierte en un modelo inmejorable para el estudio de las interacciones hospedador-parásito. Se han descrito unas 450 especies de parásitos sanguíneos en las cerca de 4.000 especies de aves de todo el mundo (Bishop & Bennett 1992). *Haemoproteus* (figura 2) es el género más encontrado, siendo registrado en el 67 por ciento de las especies de aves infectadas (Atkinson y van Ripper 1991).

Figura 2. Microgametocito de *Haemoproteus* dentro de un glóbulo rojo de Avión Común (Foto A. Marzal)



De cualquier forma, ciertas familias de aves parecen ser más susceptibles a ser infectadas que otras. Las razones de estas diferencias no están completamente estudiadas, aunque podrían ser debidas a la climatología y otros factores ambientales, diferencias en el hábitat o etológicas, ausencia de vectores e incluso a una especificidad de hospedador como resultado de una coevolución hospedador-parásito a lo largo del tiempo. De hecho, muchas especies de *Haemoproteus* tienen una relativa especificidad de hospedador, estando restringidas a especies hospedadoras muy próximas, incluso dentro de la misma familia (Atkinson 1986).

Otro parásito común en el reino animal son protozoos zooflagelados de la clase Zoomastigophora, como el género *Trypanosoma* (figura 3), cuyos representantes están presentes en la sangre de todos los vertebrados, y son responsables de enfermedades tan perniciosas como la del sueño (*T. brucei*) y la de Chagas (*T. cruzi*). Su forma de transmisión principal es por picaduras de insectos (Hickman *et al.* 1998).

Las infecciones por especies de haemosporidios pueden persistir durante años, e incluso durante toda la vida del hospedador (Bishop *et al.* 1938; Sergent & Sergent 1952; Ahmed y Mohammed 1978). Los individuos infectados pueden desarrollar algún grado de resistencia a la infección por una cepa homóloga del parásito y, a menudo, muestran infecciones crónicas o latentes no detectables hasta que son reactivadas por hormonas (activación primaveral), o por estrés ambiental o fisiológico (Atkinson y van Ripper III 1991).

Los efectos patológicos de la infección por parásitos sanguíneos pueden ser correlacionados con su desarrollo y ciclo de vida en los tejidos y células del torrente sanguíneo del hospedador, siguiendo un patrón de fases clínicas muy similar entre los distintos géneros: inicial, aguda, crítica y latente o crónica (Atkinson y van Ripper III 1991).

Figura 3. *Trypanosoma* en el torrente circulatorio de Avión Común (Foto A. Marzal)



Diversidad y abundancia de los parásitos

El parasitismo es uno de los tipos de interacción más extendido en la naturaleza, pues parásitos pueden ser desde virus, bacterias y hongos hasta metazoos, y las apreciaciones más antiguas apuntaban a que de los casi dos millones de especies conocidas, más del diez por ciento tienen vida parásita. En cambio, Peter Price (1980) afirmaba que el parasitismo es la forma más comúnmente utilizada entre los seres vivos para utilizar un recurso, estimando que más de la mitad de los mismos son parásitos. Así pues, ¿cuántas especies de parásitos hay realmente? No cabe duda de que la diversidad y abundancia de los parásitos es extraordinaria. Por ejemplo, se calcula que existen entre 10 y 100 veces más de las 2.000 especies de parásitos nemátodos descritas (Poulin 1996). Incluso es una de las formas de vida más comunes en los otros phyla de gusanos como los Platelmintos. Pero para salir de dudas sólo tenemos que fijarnos en el trabajo de Cathy Toft (1986), que contabilizó el número de especies parásitas y no parásitas en todos los phyla conocidos, valorando que más del 50 por ciento de las especies son parásitas.

Ya sabemos, por tanto, que los parásitos son muy abundantes, y están presentes en los cinco reinos conocidos. Pero, ¿cuál es la abundancia real de ellos en un ecosistema? Si representásemos el número de individuos de las comunidades de un ecosistema no nos cabe duda de que los parásitos serían los más numerosos, mostrándonos la clásica representación del número de individuos en las pirámides tróficas inversas. Ahora bien, ¿cuál es la biomasa que aportan al ecosistema? Habitualmente se ha considerado que la biomasa de los parásitos es insignificante (e.g. Polis 1999), pero debemos preguntarnos si esta suposición es correcta. Un estudio muy ilustrativo de Kevin Lafferty y Armand Kuris (ver revisión en Hudson 2005) nos puede dar la respuesta. Contabilizaron la biomasa aportada por los parásitos tremátodos de gasterópodos en el ecosistema de las marinas saladas de Carpinteria, California. De manera muy gráfica, indicaron que la biomasa aportada por los parásitos en esa extensión de 70 hectáreas equivaldría a la contribuida por un rebaño de unos ocho elefantes, con una tasa de reproducción alta. Si tenemos en cuenta que el peso medio de un elefante adulto ronda las 3 toneladas, no podemos dejar de pensar que el impacto sobre el ecosistema ha de ser muy grande.

Todo esto nos da una idea del papel tan importante que los parásitos pueden desempeñar en casi todos los aspectos de la biología evolutiva de los seres vivos y de las aves en particular. Muchos estudios aseguran que los parásitos aviares son importantes en la ecología de sus hospedadores, pero sorprendentemente la mayoría de los estudios de ecología y biología evolutiva los ignoraban hasta hace muy poco, aun cuando pueden ser una de las causas más importantes de muerte en la especie hospedadora (Price 1980). Sólo recientemente los científicos han reconocido los beneficios de usar registros de prevalencia e intensidad de parásitos hematozoos para responder a cuestiones ecológicas, etológicas y evolutivas (Atkinson y van Riper III 1991). ¿Por qué este olvido? Se nos podrían ocurrir múltiples y variadas razones para explicar este hecho. En primer lugar, los parásitos son muy difíciles de observar. Tienen pequeño tamaño (microscópico en muchos casos), viven habitualmente dentro de otros organismos y los ecólogos no se fijan en ellos en los muestreos rutinarios de ecosistemas y comunidades. Segundo, en el caso de encontrarnos con algún parásito, su aspecto generalmente nos parece repugnante. Es inevitable que al tomar muestras y toparnos con un parásito en el interior de un animal la primera impresión que nos produzca no sea agradable. No lo podemos negar, ningún estudiante tiene la idea de dedicarse a contar gusanos planos en lugar de investigar el comportamiento jerárquico del macho alfa en una manada de lobos. Tercero (y en opinión de muchos investigadores, la razón más importante): los efectos de los parásitos pueden ser muy sutiles. Por ejemplo, podemos observar y estudiar el fenómeno de la predación, pero sería poco probable que nos diéramos cuenta de que la razón por la que una presa ha sido devorada en lugar de otra radica en la diferencia de carga parásita que presentaban ambas (Temple 1986; Møller y Erritzoe 2002). O descubriríamos que la competencia interespecífica determina la distribución de especies de plantas a lo largo de un gradiente ambiental, pero no veríamos que realmente fue una infección fúngica la que inclinó la balanza hacia una de las especies (Saikonen *et al.* 1998). Como se ve en estos sencillos ejemplos, los mecanismos son muy sutiles, pero el efecto final es muy grande. No debemos olvidar que son un componente esencial básico de los ecosistemas como factor selectivo de regulación poblacional, pudiendo interactuar con otros factores como la depredación (Møller y Erritzoe 2000). Por ello, resulta imprescindible tener en cuenta los efectos del parasitismo en los estudios de comunidades y ecosistemas.

Coevolución y especificidad

En este escenario se desarrollan interacciones antagónicas entre el hospedador y su capacidad para mitigar la infección parasitaria y el parásito, quien trata de optimizar su beneficio (Festa-Bianchet 1989; Stearns 1992; Forbes 1993). Así, los hospedadores intentan evadir los costos derivados del parasitismo desarrollando defensas antiparásitas eficaces, mientras que los parásitos intentan sobreponerse a estas defensas desarrollando armas cada vez más virulentas (Futuyma & Slatkin 1983). Este antagonismo coevolutivo es lo que se conoce como la “Hipótesis de la Reina Roja” (Van Valen 1973), que ha tomado su nombre de un capítulo del cuento “Alicia a través del espejo”, de Lewis Carroll (1872). Según este relato, Alicia y la Reina Roja han de correr sin parar para seguir en el mismo sitio. De igual forma, el parásito y el hospedador corren “evolutivamente” tan rápido como pueden para mantenerse en la misma situación y evitar la extinción de cualquiera de ellos.

Esta coevolución ha dado lugar a una de las características más importantes del parasitismo: la especificidad. Con este término nos referimos a la adaptación mutua de un parásito a su especie hospedadora, incluyendo también la restricción de un parásito a un hospedador o a un grupo de hospedadores (Cheng 1986). Un alto grado de especificidad significa que las interacciones entre parásito y hospedador son tan delicadas que podrían impedir la supervivencia del parásito en otro hospedador (Noble y Noble 1976) como resultado de una coevolución durante mucho tiempo, con el consiguiente riesgo de desaparecer el parásito si lo hiciese la especie hospedadora. En cambio, una menor especificidad pudiera ser reflejo de una amplia capacidad adaptativa (Clayton y Moore 1997).

Virulencia, patogenicidad y transmisión

Dado que los parásitos viven en el interior de los cuerpos de sus hospedadores, durante años se pensaba que la mayoría de las interacciones parásito-hospedador se mantenían en equilibrio y que el único curso posible de estas relaciones evolutivas era la disminución progresiva de virulencia del parásito hasta llegar a una relación de mutualismo o la extinción del parásito, si bien se ha visto que las condiciones ambientales pueden desplazar el balance entre el mutualismo y el antagonismo (Herre *et*

al. 1999). Así, durante mucho tiempo se ha tenido una visión clásica de un parasitismo relativamente benigno y sólo recientemente se han abierto camino algunas teorías científicas que reflejan los daños severos que pueden ocasionar los parásitos en las especies parasitadas (May y Anderson 1979; Toft 1991; Atkinson y van Riper III 1991).

Generalmente, por definición, cuando pensamos en efectos de los parásitos únicamente tenemos presente la patogenicidad. Otros autores, en cambio, opinan que en esta singular relación existe un gran componente de dualidad, un balance entre el bien y el mal: los parásitos generan diversidad (Janzen 1970), pero también son causa de extinción (Cunningham y Daszk 1998); provocan la castración de un hospedador, pero incrementan la tasa de reproducción en otros (ver revisión en Moore 2002); estimulan una respuesta inmune, pero fomentan una infección crónica secundaria al mismo tiempo (Hudson 2005).

Cuando se habla de los efectos del parasitismo habitualmente se ha centrado la cuestión en las consecuencias de su acción sobre la población hospedadora, sin tener en cuenta que podría haber efectos colaterales que afectasen a comunidades y ecosistemas enteros (Hudson 2005). Por eso, al hablar de la transmisión de los parásitos, de sus efectos y de su patogenicidad, tenemos que referirnos a las consecuencias sobre la población hospedadora, sin olvidar que regulan el funcionamiento de los ecosistemas completos. Veamos, entonces, cómo los parásitos pueden modificar a las poblaciones de sus hospedadores e, indirectamente, a los procesos de los ecosistemas.

Las teorías asumen de forma lógica que la transmisión de muchos parásitos es denso-dependiente. Así, si un patógeno virulento es introducido en una población de hospedadores susceptible de ser infectada, ésta se vería reducida y, una vez que haya disminuido su densidad, la tasa de transmisión del parásito caería evitando la extinción de la población hospedadora. De cualquier modo, los parásitos pueden llevar a la extinción local cuando la transmisión es independiente de la densidad pero dependiente de la tasa de contacto entre semejantes. Por ejemplo, en el caso de enfermedades de transmisión sexual (Ginsber *et al.* 1995). De forma similar, las enfermedades transmitidas por picaduras de insectos vectores son dependientes de la frecuencia ya que la transmisión depende de ser picado por el vector. Por tanto, cuantas más veces sea picado el hospedador, mayor es la probabilidad de ser infectado, independientemente de la densidad de hospedadores (Hudson 2005). Efectivamente, en este tipo de enfermedades se puede dar una dependencia de la densidad a la inversa, debido a la mortalidad inducida por el parásito, ya que los insectos vectores que quedan se van

centrando en una población de hospedadores cada vez más pequeña, aumentando la probabilidad de ser expuesto a la infección y morir, con lo que la población podría llegar a extinguirse.

Parásitos y ecosistemas

Pero, ¿sería realmente importante la extinción de una especie? ¿Y la de un parásito? Las razones por las que se debe cuidar la biodiversidad están a la orden del día. Se podría argumentar que la biodiversidad es fuente de recursos naturales para la elaboración de productos de valor económico como comida, fármacos, fibras, ... (¿aportarían algo los parásitos en este punto?) Otra justificación de conservación de la biodiversidad serían razones éticas, estéticas y culturales (que no es el caso de los parásitos). Tercera, la biodiversidad puede contribuir al suministro de procesos que se desarrollan en un ecosistema que son valiosos para la sociedad, como la producción primaria, la polinización de las plantas o la regulación del clima. Y es, precisamente, en esta tercera razón donde aumenta el interés por la biodiversidad y el funcionamiento del ecosistema: ¿podría la pérdida de la biodiversidad afectar a la regulación del ecosistema? Podría tener efectos denominados “verticales” en los niveles de una cadena trófica, llevando a la extinción a un mayor número de especies (Mork 1996) generando una cascada de efectos poblacionales, físicos, químicos e incluso evolutivos (ver revisión en Loreau *et al.* 2005). Los otros tipos de efectos, menos conocidos, serían los llamados “horizontales” (genéticos, taxonómicos y de diversidad funcional dentro de un mismo nivel trófico). Muchos de ellos se basan en las teorías de coexistencia entre especies competidoras, donde la teoría del nicho ecológico postula que todas las especies difieren hasta cierto punto en los recursos que utilizan. Esto implica una complementariedad funcional entre las especies y, por tanto, un incremento con la diversidad en la productividad y otros procesos del ecosistema (Tilman *et al.* 1997; Loureau 1998).

Numerosos estudios han demostrado que los parásitos, a pesar de su pequeño tamaño, son importantes en la conservación de los ecosistemas. Como resultado, muchos ecólogos y biólogos conservacionistas prestan especial interés en la introducción o eliminación de un parásito en un ecosistema, ya que puede afectar a un gran rango de especies. Así, los parásitos podrían afectar a la biodiversidad de manera

“horizontal” a través de la competencia mediada por parásitos, en la que dos especies son susceptibles a ser infectadas por un parásito y la transmisión del mismo de una especie a otra más vulnerable llevaría a esta última a una mayor mortalidad o a una menor capacidad de competir por los recursos (Park 1948; Bonsall y Hassell 1997), extendiéndose los efectos de forma vertical a la población de sus especies presa y a la de sus depredadores (ver revisión en Thomas *et al.* 2005).

En este sentido, en las conclusiones del informe final de la Evaluación Preliminar de los Impactos en España por Efecto del Cambio Climático se cita a la mayor virulencia de los parásitos como uno de los cinco principales impactos sobre la biodiversidad animal (Moreno 2005), lo que da aún más importancia a su estudio con el fin de conocer sus efectos futuros sobre los ecosistemas.

Todas estos efectos a gran escala en los ecosistemas serían resultado de la suma de las interacciones de los parásitos en las poblaciones de sus hospedadores. Así pues, debemos explicar cuál es el mecanismo por el que los parásitos podrían regularlas.

¿Regulan los parásitos las poblaciones de sus hospedadores?

A lo largo de los últimos dos siglos se han estudiado los factores que determinan los tamaños poblacionales en plantas y animales. Esta regulación es denso-dependiente ya que únicamente una reducción en la fecundidad o en la supervivencia bajo grandes densidades puede regular las poblaciones. A pesar de todo, nuestro conocimiento de las dinámicas poblacionales es aún escaso a pesar de más de un siglo de investigaciones (ver revisiones en Begon *et al.* 1996; Newton 1998), quizás debido a que algunos factores importantes que contribuyen a la regulación poblacional hayan permanecido en el olvido, como pudiera ser el caso de los parásitos (Møller 2005). Para que esto fuera posible sería necesario que los parásitos pudieran regular las poblaciones mediante una reducción de la supervivencia o la fecundidad de sus hospedadores. En este sentido, los modelos teóricos de Anderson y May (Anderson y May 1978; May y Anderson 1978) resultaron fundamentales para la comprensión del modo por el que pudiera llevarse a cabo. En esencia, la regulación ocurriría cuando la tasa de crecimiento del parásito exceda a la del hospedador, asumiendo que el parásito causa perjuicios en la supervivencia y fecundidad de la población hospedadora, de forma que la tasa de crecimiento de esta última se ve reducida por los efectos de los parásitos.

Los macroparásitos suelen generar más morbilidad que mortalidad en el hospedador, reduciendo la condición y la habilidad del hospedador para conseguir recursos, defender un buen territorio o proveer alimento a su descendencia, de manera que los individuos que sufrieran mayores cargas parásitas deberían tener menor éxito reproductor y una mayor vulnerabilidad a causas secundarias de mortalidad como la predación o infecciones secundarias.

Inicialmente los parásitos sanguíneos fueron considerados como organismos de baja patogenicidad en poblaciones naturales (Weatherhead & Bennett 1992; Bennett *et al.* 1993; Davidar y Morton 1993), aunque fueran causantes de enfermedades y muerte en aves en cautividad. Otros estudios demostraron sutiles pero importantes efectos de los hematozoos en las estrategias vitales de sus hospedadores aviares (Rätti *et al.* 1993; Korpimäki *et al.* 1993; Allander & Bennett 1994; Korpimäki *et al.* 1995; Dufva 1996). Algunas investigaciones, sin embargo, no encontraron efectos debilitadores de los parásitos hematozoos en sus hospedadores aviares (Baker 1976; Fallis & Desser 1977; Weatherhead & Bennett 1991, 1992; Kirkpatrick *et al.* 1991; Weatherhead *et al.* 1993; Seutin *et al.* 1994; Dufva & Allander 1995; Korpimäki *et al.* 1995; Wagner *et al.* 1997; Dawson & Bortolotti 2000). Como vemos, no hay conclusiones claras sobre la patogenicidad de los parásitos y, por ende, de su posible regulación de la población hospedadora, seguramente debido a la falta de manipulación experimental en estos estudios. No debemos olvidar que la demostración de los efectos reales causados por los parásitos sobre sus hospedadores necesita de la alteración experimental de los niveles de infección (Keymer y Read 1991; Merino *et al.* 2000).

Por ello, en el primer capítulo de la tesis se presenta un estudio de los efectos nocivos que pueden ejercer los parásitos sanguíneos en las aves silvestres, mediante una reducción experimental de los niveles de infección y comprobando sus efectos sobre el éxito reproductor de su población hospedadora.

COSTES DE LA RESPUESTA INMUNE EN LAS ESTRATEGIAS VITALES

¿Qué son las estrategias vitales?

Imaginemos que un ave al nacer decidiese planificar toda su vida de una manera muy precisa. Si tenemos en cuenta que los recursos disponibles son limitados, debería prestar mucha atención a qué funciones destinar esos recursos para no malgastarlos. Asolarían su mente preguntas como “¿a qué edad y tamaño debo empezar la reproducción?”, “cuando me reproduzca, ¿cuánto tiempo y energía debo dedicar a la reproducción, al crecimiento o al mantenimiento del organismo?”, “¿debo tener pocos hijos pero de mayor tamaño y calidad, o más hijos pero con pequeño tamaño y menores posibilidades de sobrevivir?”, “¿me convendría concentrar la reproducción en mis primeros años de vida y, por tanto, vivir menos, o vivir más tiempo e invertir menos en reproducción al principio?”, “¿cuántos de mis hijos han de ser macho y cuántos hembra?”, y, sobre todo, “¿debo decidir ahora o dependerá de las circunstancias sociales y ecológicas del momento?” Muchas cuestiones en las que no se le permite error alguno en la respuesta. En todas estas preguntas podemos ver claramente que lo realmente importante para cada individuo es su contribución genética a las futuras generaciones, es decir, su eficacia biológica (o *fitness* en inglés). Los factores que influirán en la misma son muy variados, como la duración de las etapas juvenil y adulta, la extensión e intensidad del período de crecimiento, el envejecimiento, la reproducción y la dispersión y colonización. Todos estos factores tienen implicaciones evolutivas y forman las denominadas estrategias vitales (del inglés *life history*) que, al fin y al cabo, son las que pueden dar respuesta a la preguntas antes planteadas.

Compromisos y costes de las estrategias vitales

Las estrategias vitales han sido seleccionadas evolutivamente para maximizar la eficacia biológica de los organismos, si bien ya podemos intuir que la estrategia vital óptima a seguir en cada momento depende de las circunstancias, pues hay que tener en cuenta la variable de decisión, la propiedad a maximizar y las restricciones debidas al carácter finito de los recursos disponibles. No existe un organismo ideal que madure al

poco de nacer, tenga rápidamente multitud de descendientes con las mismas características de su progenitor y viva eternamente. ¿Por qué no existe este “demonio darwiniano”? Porque prevalecen una serie de compromisos y restricciones que atañen a las distintas funciones vitales, como reproducción presente y futura, crecimiento, supervivencia y edad de maduración. Estos compromisos se sustentan por la presencia de unos costos (cambios en los rasgos que disminuyen la eficacia biológica) y beneficios (variaciones en los rasgos que aumentan la eficacia biológica). Se espera que los organismos se desarrollen en el punto donde el beneficio neto, la diferencia positiva entre beneficios y costes, sea mayor. Dicho punto, que no siempre es alcanzable, se ve afectado por los compromisos de los diferentes componentes de las estrategias vitales y por la influencia de las condiciones ambientales en la mortalidad y fecundidad (ver Stearns y Hoekstra 2000).

El principal compromiso que afecta a las estrategias vitales es el que se produce entre fecundidad presente y valor reproductivo residual. El valor reproductivo de un individuo a una determinada edad se compone de la probabilidad de sobrevivir hasta futuras ocasiones reproductoras y de su fecundidad en la presente y en ocasiones venideras (Fisher 1930). Este compromiso origina unos costes, cuyo origen puede ser ecológico (derivar recursos a la reproducción que debían ser destinados a evitar riesgos ambientales como huir del depredador o evadir la exposición a los parásitos (Magnhagen 1991) o fisiológico, como sería el emplear recursos limitados (nutrientes, energía, ...) en procesos reproductivos, con lo que no podrían ser utilizados en otros procesos como el mantenimiento del organismo (Moreno 1993).

En diversos estudios se ha comprobado empíricamente que existen costes de la reproducción asociados a la supervivencia de los individuos (ver rev. Moreno 2002), como una menor probabilidad de sobrevivir (Nilsson y Svensson 1996; Daan *et al.* 1996), un descenso en la fecundidad futura (Deerenberg *et al.* 1996; Sanz 1997) o una menor calidad fenotípica de la descendencia (Blondel *et al.* 1998). La pregunta ha de ser cuáles son los mecanismos que determinan dichos costes. Algunos autores apuntan a que uno de los principales es la susceptibilidad a la depredación (Cushing 1985; Shaffer y Formanowicz 1996), mientras que en otras especies se postula que pudieran ser mecanismos fisiológicos posteriores a la reproducción, como la muda postnupcial del plumaje de aves (Nilsson y Svensson 1996). Hoy en día, el componente fisiológico en el que se centran la mayoría de los estudios es el efecto inmunosupresivo de la actividad

reproductora (Sheldon y Verhulst 1996), dada la ubicuidad e impacto de parásitos y enfermedades en la historia natural de los organismos.

El papel de los parásitos en las estrategias vitales de sus hospedadores

Los parásitos pueden jugar un papel ecológico y evolutivo muy importante a través de su influencia en los componentes de las estrategias vitales de sus hospedadores y sus compromisos evolutivos (Thomas *et al.* 2000), debido a su habilidad de alterar dichos componentes (fecundidad, ritmo de reproducción, tamaño corporal, ...). Esos cambios los pueden producir explotando directamente a sus hospedadores y/o induciéndoles a una respuesta adaptativa. La explotación parásita *per se* es una causa importante de cambios, entre los individuos o entre las poblaciones, en los componentes de las estrategias vitales de su hospedador como fecundidad, crecimiento o supervivencia (Thomas *et al.* 2005). Tales variaciones también pueden ser una respuesta adaptativa al parasitismo con el fin de compensar los efectos negativos del mismo sobre la eficacia biológica (Minchella 1985; Michalakis y Hochberg 1994). Por ejemplo, en varios casos se ha comprobado que mediante una reproducción temprana los hospedadores podrían parcialmente compensar los perjuicios de una infección parásita (Minchella y Loverde 1981; Polak y Starmer 1998; Adamo 1999).

Las estrategias vitales y el coste de la inmunidad

Los parásitos también tienen el potencial de imponer presiones selectivas en otros componentes de las estrategias vitales como el crecimiento (Agnew *et al.* 1999), la dispersión (Heeb *et al.* 1999) o el esfuerzo reproductor (Moreno *et al.* 1999).

En esta línea, existe un interés reciente en el estudio de la defensa frente a infecciones como uno de los componentes de las estrategias vitales sujeto a compromisos con otros componentes, como el esfuerzo reproductor. Diversos estudios han comprobado que un mayor esfuerzo reproductor producía una menor respuesta en el sistema inmune (Deerenberg *et al.* 1997; Nordling *et al.* 1998), aunque también se ha podido comprobar empíricamente a la inversa el compromiso entre respuesta inmunitaria y esfuerzo reproductor, induciendo una respuesta inmune y comprobando

sus efectos en el éxito reproductor de los individuos (Ilmonen et al 2000; Råberg *et al.* 2000).

El sistema inmune presenta una serie de características que lo hacen particularmente diferente de los otros componentes de las estrategias vitales. Por ejemplo, debido al riesgo de la autoinmunidad, la defensa inmune óptima no es necesariamente la máxima posible. En este contexto, existen dos tipos de costes asociados a la respuesta inmune. Un primer tipo son los pagados en términos de componentes estructurales o funcionales del organismo, como pudiera ser la alteración de un receptor que permitía el reconocimiento de un patógeno, pero que reconoce a partir de ese momento a otro patógeno (ver revisión en Zuk y Stoehr 2002). El otro tipo son los costos relacionados con la distribución de recursos esenciales pero limitados, como energía y nutrientes. Estos costes incluyen el desarrollo del sistema inmune, el mantenimiento de dicho sistema dentro de un orden funcional y el uso del sistema inmune para combatir una invasión por parásitos (Klasing 2004)

A pesar de que muchos de estos estudios sugieren que dichos costes son comunes, hasta el momento no se conocen exactamente cuáles son las causas que determinan su magnitud y si existen diferencias significativas entre especies de hospedadores, o los efectos netos de la diversidad de las presiones ejercidas por los parásitos en las estrategias vitales de sus hospedadores, por lo que es necesario un examen exhaustivo con perspectivas ecológicas y evolutivas (Thomas *et al.* 2005)

Por ejemplo, varias investigaciones han comparado la intensidad de la respuesta inmune en diferentes especies de hospedadores, mostrando diferencias notables en la misma (e. g. Møller & Erritzoe 1996; Møller *et al.* 2001; Van Nouhuys y Hanski 2002). Esta desigualdad pudiera ser resultado de una frecuencia y probabilidad distinta de transmisión de parásitos. Esto implicaría que aquellas especies que sufrieran mayores cargas parasitarias tendrían unos costes de la inmunidad particularmente grandes.

Con objeto de conocer cómo la respuesta inmune puede modelar las estrategias vitales de su hospedador, en el segundo capítulo de la tesis se presenta un estudio experimental de la cuantificación directa de los costes de la respuesta inmune en las estrategias vitales de un ave colonial que sufre un impacto negativo muy fuerte por los parásitos en su éxito reproductor.

COSTES INMUNOLÓGICOS DE LA DEPOSICIÓN DE ANDRÓGENOS EN LA YEMA

Las hormonas depositadas en la yema pueden modificar el fenotipo de la descendencia

La contribución de un individuo a las futuras generaciones se ve inexorablemente condicionada por los procesos de selección natural. Para que dicha selección actúe es imprescindible que exista variabilidad individual en algunos caracteres (variación fenotípica), que estos caracteres sean heredables y que la posesión de los mismos conceda una mayor posibilidad de emparejamiento, reproducción y/o supervivencia al individuo (Endler 1986).

Un carácter es resultado de tres componentes: el componente genético o hereditario, el componente ambiental y el componente materno (Falconer 1989). El componente genético es el ADN heredado de sus padres, y codifica un determinado carácter y su desarrollo. El componente ambiental representa la influencia que ejerce un determinado medio natural en la expresión de un fenotipo a partir del genotipo. Finalmente, el componente materno representa todos los efectos indirectos que el genotipo materno puede tener sobre el fenotipo de sus descendientes, como por ejemplo los cuidados maternos, o la cantidad y calidad de sustancias incluidas en el huevo junto al embrión (ver Soler 2002a). Este embrión se encuentra encerrado dentro de las membranas del huevo y la cáscara junto con todos los nutrientes necesarios para su desarrollo, como proteínas, lípidos, vitaminas y minerales (Romanoff y Romanoff 1949; White III 1991), todos ellos recursos muy costosos de producir y que pueden tener mucha influencia en la supervivencia y la eficacia biológica de los pollos (Williams 1994; Nager *et al.* 2000). Pero hasta los últimos años no se han tenido en cuenta otros componentes de la yema con un mecanismo de acción muy fino durante el desarrollo del embrión y que pueden influir decisivamente en el fenotipo de la descendencia: las hormonas (Schwabl 1993)

Tipos de hormonas en la yema

Los principales tipos de hormonas encontrados en los huevos de las aves son: testosterona (T), 5 α -dihidrotestosterona (DHT), estradiol (Schwabl 1993), androstenodiona (A4) (Schwabl 1997), algunas hormonas tiroideas (McNabb & Wilson, 1997), progesterona (Lipar *et al.* 1999) y corticosterona (Downing & Bryden 2002). Son producidas por la madre y transferidas a la yema del huevo en los últimos días de la ovulación, si bien no se conoce aún si es un mecanismo de transmisión activo o una mera transferencia pasiva (ver revisión Gil 2003), pero el hecho de que sean componentes no inherentes a la yema y la posibilidad de producir efectos sobre la prole parece indicar la existencia de un control preciso en su transferencia (Lipar *et al.* 1999).

Efectos beneficiosos de las hormonas en la yema

Estas hormonas pueden tener efectos beneficiosos en el desarrollo del embrión y del pollo, e incluso moldear el fenotipo del ave adulta (ver revisión Gil 2003). Mediante la manipulación experimental de los niveles de andrógenos en las puestas se han demostrado efectos fisiológicos directos de las hormonas en el crecimiento de los pollos, como periodos de desarrollo embrionario más corto (Eising *et al.* 2001) y tasas de crecimiento mayores (Lipar y Ketterson 2000), efectos sobre el comportamiento de petición de alimento de los pollos (Schwabl 1996a) e incluso pudieran tener consecuencias sobre el status social del individuo en la edad adulta (Schwabl 1993).

En diversos estudios se ha comprobado que la distribución de los andrógenos en los huevos puede ser diferencial y adaptarse a las condiciones ambientales. Así, las hembras de algunas especies de aves produjeron mayores concentraciones de hormonas en sus huevos cuando se emparejaron con machos más atractivos (Gil *et al.* 1999; 2004; 2005b) o cuando estuvieron sometidas a un mayor estrés social (Groothuis and Schwabl 2002; Pilz y Smith 2004; Reed and Vleck 2001).

Distribución diferencial de andrógenos dependiendo del orden de puesta

Otras investigaciones han aportado evidencias de una distribución diferencial de andrógenos en los huevos dependiendo del orden de puesta, aumentando la concentración de andrógenos (Gil *et al.* 2005a; Pilz *et al.* 2003), aunque en algunos casos el sentido es inverso (Gil *et al.* 1999; Schwabl *et al.* 1997), o bien no se encuentra ningún efecto (Whittingham & Schwabl 2002). Se ha propuesto que estas variaciones en la concentración de andrógenos dentro de la misma puesta pudieran ser un mecanismo para contrarrestar los efectos de la eclosión asincrónica, de manera que si los andrógenos de la yema promueven la petición de alimento y el desarrollo, al aumentar la concentración hormonal con el orden de puesta se favorecería a los pollos nacidos de los últimos huevos de una puesta (Schwabl 1996a). En el caso contrario, el descenso de los niveles hormonales con el orden de puesta reforzaría la jerarquía impuesta con la eclosión asincrónica, contribuyendo a una reducción en la agresividad entre los hermanos, pudiendo llegar a una reducción del tamaño de cría en algunas especies (Schwabl *et al.* 1997).

Inversión diferencial de hormonas según el sexo de la descendencia

Teóricamente los padres podrían tener diferentes inversiones en hijos o en hijas si la eficacia biológica de los sexos fuera diferente. Este rendimiento dependería de diversos factores como la sex ratio en la población y el coste de producir machos o hembras, especialmente en especies con dimorfismo sexual en el tamaño (Charnov 1982). Los andrógenos maternos en los huevos podrían estar relacionados con la distribución entre los sexos de dos maneras (Groothuis *et al.* 2005). En primer lugar, pudiera ser que la misma cantidad de andrógenos tuviese cualitativa o cuantitativamente diferentes efectos en ambos sexos, lo que conllevaría diferencias de calidad entre los machos y hembras de la descendencia. En segundo lugar, la condición de la hormona materna, su influencia en los niveles hormonales de la yema, o esta última por sí sola, pudieran determinar el sexo del embrión. Ésto sería posible por dos razones: primero, en aves la hembra es el sexo heterogamético, y, por tanto, tiene la posibilidad de determinar el sexo de sus huevos. Segundo, la meiosis tiene lugar tras la breve fase de

formación de la yema, justo antes de la ovulación, una vez que la deposición de las hormonas en la yema ha ocurrido (ver revisión en Pike & Petrie 2003). Los resultados de diversos estudios no son nada concluyentes, si bien parece ser que los andrógenos podrían tener efectos específicos que deberían tenerse en consideración en los diferentes sexos, e incluso sus concentraciones podrían ser diferentes entre huevos con embriones macho y hembra, aunque con complejas relaciones con otros factores, pudiendo variar la sex ratio bajo determinadas condiciones ambientales y según el orden de puesta (ver revisiones en Gil 2003; Groothuis *et al.* 2005).

La producción de niveles elevados de hormonas puede suponer un coste para las crías o para la progenitora

Pero todos estos beneficios deben tener implícitos algunos costes, tal y como sugieren los hechos de una inversión maternal diferencial y una variación con la calidad de la hembra. Estos costes podrían ser pagados por la descendencia, por la hembra, o por ambos. En primer lugar, podría ser que los pollos no pudieran soportar niveles altos de testosterona, ya que estos valores elevados de andrógenos podrían inhibir el crecimiento y la supervivencia de los pollos (Sockman y Schwabl 2000), provocar un aumento del estrés oxidativo (von Schantz *et al.* 1999), suprimir el sistema inmune (Da Silva 1999; Folstad y Karter 1992), aumentar las agresiones entre los pollos de una puesta que ocasionase una reducción no adaptativa de la misma (Mock y Parker 1997) o sufrir una mayor posibilidad de ser depredados al ser descubiertos por el depredador debido a una mayor insistencia en la petición de alimento (Haskell 1994).

Estos costes hipotéticamente también podrían repercutir en la hembra en el caso de que el incremento de la síntesis de los andrógenos de los huevos estuviese relacionado con un aumento de los niveles de los mismos en el torrente circulatorio de la hembra (Schwabl 1996b), que podrían tener graves consecuencias para ella, como la inmunosupresión antes citada o una reducción o parada de algunas actividades reproductoras como la construcción del nido, la puesta o la incubación (Searcy 1988; Nelson 2000), si bien estudios recientes han revelado que la regulación es más compleja, ya que en algunas especies no hay inmunosupresión por andrógenos o los efectos son dependientes de la condición (Hasselquist *et al.* 1999; Greenman *et al.* 2005).

Hasta el momento no tenemos constancia de ninguna investigación que demuestre experimentalmente la posibilidad de que los costes sean pagados directamente por la hembra. Con tal fin, en el tercer capítulo de la tesis se muestra un estudio de los costes inmunológicos que suponen para la hembra la deposición de andrógenos en la yema, mediante la producción experimental de una respuesta inmune y el análisis de las consecuencias que puede tener el cambio inmunitario en la producción de las hormonas.

EL PAPEL DE LOS PARÁSITOS EN LA EXPRESIÓN DE LA SENESCENCIA

¿Qué es la senescencia?

El envejecimiento es un proceso lento, progresivo y, aunque nos pese, irremediable. Desgraciadamente aún no concemos un “elixir de la eterna juventud”, ni disponemos de un retrato como el del señor Gray que envejezca por nosotros. La búsqueda de pócimas milagrosas o remedios a la vejez ha sido muy fructífera, aunque sólo desde el punto de vista literario o publicitario, no del científico. El transcurso del tiempo trae consigo un deterioro continuo de las funciones vitales que conduce irreversiblemente a la muerte. En los humanos, las mejoras en los hábitos de higiene y de nutrición, junto con los adelantos en el campo de la medicina, han producido un descenso dramático en la mortalidad causada por enfermedades infecciosas. Lo demuestra el ejemplo de la esperanza de vida en los Estados Unidos, que pasó de ser de 47 años en 1900 a 78 años en 1995 (Bloom 1999). Pero, desgraciadamente, no parece posible alargar la edad máxima de vida (Kirkwood 1996): la mayor edad alcanzada por el hombre hoy en día es de 115 años, la misma que hace siglos (Nesse y Williams 1995).

La senescencia o envejecimiento se entiende como el deterioro corporal que ocurre conforme avanza la edad, incrementando la susceptibilidad a sufrir enfermedades y disminuyendo la capacidad de reparar los daños. Por ejemplo, el envejecimiento produce la senescencia del tejido linfóide del sistema digestivo y un descenso en la secreción de ácido gástrico (Feldman *et al.* 1996). El pH ácido del estómago representa

una barrera importante para la entrada de patógenos entéricos, por lo que la reducción de ácido gástrico podría incrementar la susceptibilidad a la infección por esos patógenos (Morris y Potter 1997).

Se ha señalado que es un proceso epistático en el que están implicados hasta 100 genes distintos, además de las mutaciones múltiples que afectan a todos los procesos del envejecimiento. Todos estos genes regulan el proceso que afecta a tres niveles diferentes: molecular, celular y orgánico (Pardo 2003).

¿Sobre quién actúa la senescencia?

¿Todos los seres vivo envejecen? ¿Es la senescencia un proceso común a todos? Una condición necesaria para la evolución del envejecimiento es la separación de la línea germinal (la que produce las células sexuales) de la línea somática (el resto de las células) (Buss 1987). Esta es la razón por la que los seres que se reproducen por gemación o vegetativamente o en los que cualquier parte del organismo puede convertirse en línea germinal (bacterias, hongos, plantas, esponjas, corales) no envejecen, sólo sufren mortalidad y deterioro por causas extrínsecas, como depredación, enfermedad o accidentes. De esta forma se van reduciendo progresivamente las clases de edad más avanzadas por un simple efecto acumulativo. La probabilidad de que un animal esté vivo y pueda reproducirse a edades avanzadas llega a ser insignificante y dicha reproducción sería invisible a la selección natural (ver revisión Moreno 2002). Así, las primeras explicaciones evolutivas de la senescencia sugerían que ésta era beneficiosa a nivel poblacional porque era una forma de controlar el número de individuos y evitar la superpoblación, donde los individuos de mayor edad dejaban paso a los más jóvenes. Sin embargo, no hay ejemplos claros en la naturaleza que apoyen que la senescencia pueda regular el número de individuos (la mayoría de las muertes se producen a edades juveniles por causas extrínsecas) (Lewis *et al.* 2001) y, además, se considera a la selección de grupo como una fuerza evolutiva muy débil en comparación con la selección a nivel de individuo (Williams 1966).

Las hipótesis evolutivas no adaptativas se basan en que la selección natural actúa sobre el ciclo vital completo de un individuo, desde la fecundación hasta la muerte. Las presiones selectivas van a actuar con mayor profusión en edades reproductoras tempranas, mientras que son inoperantes a edades en las que la probabilidad de estar

vivo es casi nula en la naturaleza (Medawar 1952; Hamilton 1966), ya que la evolución opera sobre el éxito reproductor y es de esperar que las presiones selectivas disminuyan con la edad y desaparezcan en aquellos individuos de edad post-reproductora. Incluso si no existiese el fenómeno de la senescencia, la tasa de mortalidad aumentaría con la edad por simple acumulación de procesos de muerte extrínseca y, por tanto, la selección natural favorecería fenotipos con máximos rendimientos reproductivos a edades reproductoras tempranas con mínimas posibilidades de morir (Soler 2002b).

Teorías evolutivas del envejecimiento

Las teorías de la senescencia son casi tan antiguas como las civilizaciones. Los primeros científicos, que realmente eran filósofos, argumentaban que todos nacíamos con una cantidad predeterminada de algún tipo de sustancia vital. Una vez que dicha sustancia vital se consumía con el transcurso de la vida, moríamos. Muchas de las teorías modernas sobre el envejecimiento surgen de las ideas de ésta y otras teorías antiguas (Knight 2000). Aunque no se conocen cuáles son los mecanismos moleculares exactos que condicionan el mecanismo del envejecimiento, se han formulado varias hipótesis al respecto, algunas de las cuales no son mutuamente exclusivas. Veamos cuáles son las principales.

Posiblemente una de las primeras ideas contemporáneas sea la *hipótesis del envejecimiento por acumulación de mutaciones*, propuesta por Medawar (1952). Sostiene que las mutaciones deletéreas se acumulan a lo largo de la vida causando una mortalidad dependiente de la edad, particularmente en especies longevas. La selección natural apenas actúa debido a que estas mutaciones afectan a edades reproductoras tardías, por lo que se debería esperar una mayor frecuencia de estas mutaciones en individuos de edad avanzada ya que se irían acumulando al avanzar la edad.

Otra teoría (2ª) propone la existencia de alelos con efectos positivos a edades tempranas pero perjudiciales a edades avanzadas (*genes pleiotrópicos*). Estos genes serían seleccionados debido a la mayor contribución de la reproducción temprana en la eficacia biológica de los organismos (Williams 1957), como los encontrados en *Drosophila* (Rose 1991) y en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Friedman y Johnson 1988)

La tercera teoría, del *soma desechable* (Kirkwood 1977), relaciona los procesos estudiados en gerontología con la teoría evolutiva general del envejecimiento. Su fundamento básico es que la selección natural debe regular la distribución de los recursos metabólicos entre actividades de crecimiento, mantenimiento del soma y reproducción, debido a la limitación en la disponibilidad de dichos recursos. Afirma que existe un compromiso entre longevidad y éxito reproductor, por lo que un individuo que invierta la mayor parte de los recursos en la preservación del cuerpo va a tener menos descendientes que otros cuya inversión principal sea tener descendientes (Austad 1997; ver revisión Soler 2002b). El llegar a edades avanzadas requiere una inversión en el mantenimiento somático que reduce los recursos disponibles para la reproducción. Así, en diversos estudios se ha demostrado que la reproducción es costosa, pues puede disminuir la eficacia del sistema inmune (Moreno *et al.* 1999; Nordling *et al.* 1998). Predice que el envejecimiento será el resultado de la acumulación de daños no reparados en el soma, y que las especies que tengan mayores niveles de mantenimiento y reparación somática deberían ser más longevas.

La cuarta teoría se refiere al papel que pueden desempeñar los *antioxidantes* como captadores de los radicales libres causantes del estrés oxidativo en las células. El fundamento general de esta teoría radica en que durante el metabolismo aerobio se generan incidental e incontrolablemente radicales derivados del oxígeno que, una vez producidos, promueven reacciones que dañan macromoléculas. Este deterioro que se va acumulando con la edad afecta principalmente al ADN, a las proteínas y a los lípidos (Rodríguez y Céspedes 1999). Los principales agentes encargados de neutralizar a estos radicales libres son enzimas y compuestos antioxidantes como las vitaminas, catalasa y glutatión peroxidasa, cuya concentraciones y actividad disminuyen con la edad (Sohal *et al.* 1990; Benzi y Moretti 1995). Todo esto ocasiona un daño irreversible que se acumula con el tiempo resultando en una pérdida gradual de la capacidad funcional de la célula (Hayflick 1985; Medveded 1990).

En los últimos años ha tomado fuerza la idea del papel que pueden jugar los *telómeros* en la expresión de la senescencia. Los telómeros son las regiones de los extremos de los cromosomas y están compuestos de secuencias repetitivas de ADN que no codifican para ningún gen en particular. Una de sus funciones esenciales es la de proteger al resto del cromosoma de la degradación y de la unión de los extremos del ADN entre sí por enzimas reparadoras. La célula duplica su ADN previamente a la división, pero no es capaz de copiar la totalidad de la secuencia del telómero y, como

resultado, el telómero se hace más corto en cada replicación, perdiéndose alrededor de 50 a 200 nucleótidos en cada ciclo de división celular (Harley *et al.* 1990)

El desgaste del telómero con la sucesión de ciclos celulares impide su función protectora, con lo que el cromosoma se hace inestable, apareciendo errores en la segregación durante la mitosis, anomalías genéticas y diversos tipos de mutaciones. Las células que presentan estos defectos no solo son incapaces de duplicarse, sino que dejan de ser viables, activándose los procesos de muerte celular programada. Por tanto, la pérdida progresiva de partes de los telómeros con cada división celular lleva a la senescencia y muerte de la célula (Harley *et al.* 1990; Reddel 1998).

La última teoría moderna sobre la hipótesis del envejecimiento, similar a la hipótesis del soma desechable, es la propuesta por Charlton *et al.* (1998) sobre la *amplificación diferencial de clones mutantes*. Se basa en la diferencia del material genético presente en todas las células de un organismo pluricelular debido a los errores inevitables que ocurren en el proceso de copia del material genético a partir del cigoto. Muchas de estas mutaciones son inviables, por lo que las células mueren; otras son detectadas y destruidas por los mecanismos de reconocimiento y eliminación de células mutantes; pero otros pueden seguir la división y formar clones de este tipo celular. Esto hace que un organismo pueda verse como un conjunto de clones celulares ligeramente diferentes que cooperan para que el éxito reproductor del conjunto (organismo) sea máximo, ya que es la única manera de que su material genético (o parte de él) pueda pasar a la siguiente generación. Si apareciese una célula mutante que anulase (total o parcialmente) los mecanismos de control celular podría expandirse rápidamente en el tejido, aumentando su población en perjuicio de las otras células del tejido. Si conforme avanzamos en edad aumenta el número de divisiones celulares, llegaría un momento en el que el grado de cooperación entre las células del cuerpo sería tan pequeño que el organismo estaría por debajo de un nivel óptimo, dando lugar a los fenómenos asociados a la senescencia. En este sentido, se ha comprobado en tejidos musculares senescentes la existencia de clones mutantes de mitocondrias, cuya acumulación conduce a un descenso en la producción de ATP (Johns 1996).

En resumen, los organismos mueren debido a la incapacidad de reparar las hebras dañadas de ADN.

¿Juegan los parásitos un papel en la senescencia?

Como vemos, en todas estas teorías la senescencia implica un deterioro fisiológico que conduce a la muerte. Una de las principales maneras de manifestarse este deterioro es la pérdida de funcionalidad del sistema inmune, donde se ha visto un retroceso en los individuos conforme avanzan en edad, particularmente por cambios en las poblaciones de linfocitos T debido al reemplazo de células T vírgenes por células T de memoria, ocasionando una reducción en la habilidad para luchar frente a los parásitos y prevenir la expresión de las enfermedades (ver revisión Miller 1996). Varios estudios han demostrado el descenso de la respuesta inmune humoral relacionado con la senescencia en aves silvestres (Saino *et al.* 2003; Cichon *et al.* 2003). Por tanto, la pregunta que surge es ¿juegan los parásitos un papel importante en la expresión de la senescencia? La respuesta, teóricamente, es muy sencilla. Pero aún no se han podido aportar suficientes evidencias en la naturaleza que lo demuestre, ya que el estudio ideal sería aquel que permitiese seguir la evolución del mismo individuo toda su vida o, al menos, varios años consecutivos.

Con tal propósito, en el cuarto y último capítulo de la tesis se muestra un análisis comparativo de la prevalencia e intensidad de distintas especies de hemoparásitos (*Trypanosoma* y *Haemoproteus*) entre dos especies de hirundínidos (*Delichon urbica* e *Hirundo rustica*) en referencia al envejecimiento, capturando los mismos individuos durante varios años.

MÉTODOS GENERALES

EL AVIÓN COMÚN, NUESTRA ESPECIE DE ESTUDIO

El avión común (*Delichon urbica* Linneo 1758) es un Hirundínido colonial muy ligado a los ambientes humanos. Su peso oscila entre los 16 y 20 gramos. Se alimenta exclusivamente de insectos capturados al vuelo. Su sistema de apareamiento es monógamo, aunque existen frecuentes cópulas fuera de la pareja. El cuidado parental lo realizan ambos sexos. Los lugares habituales de nidificación son los núcleos urbanos,

preferentemente en los aleros de los edificios, aunque ocasionalmente pueden nidificar al abrigo de rocas cercanas al agua, sierras, puentes o presas de embalses. Su distribución mundial es muy amplia, ocupando gran parte del Paleártico, casi toda Eurasia, Siberia y Asia central hasta Formosa y Japón, y el noroeste de África, existiendo registros de reproducción en Namibia, al sur de sus cuarteles invernales transaharianos. En la Península Ibérica cría en casi todas las comarcas, llegando a ser el hirundínido colonial más abundante en el suroeste. La población nidificante en España se estima en 2.150.000 parejas (de Lope 1997).

Las puestas en Extremadura comienzan en marzo y finalizan a mediados de julio (Pajuelo *et al.* 1992), mientras que en localidades más septentrionales suceden desde mayo a octubre (Lind 1960; Balat 1974; Møller 1974; Hund 1976; Kondelka 1978; Bryant 1979). Los tamaños de puesta en las colonias extremeñas varían entre 1 y 7 huevos, decreciendo de la primera a la tercera puesta, siendo la más frecuente de 5 huevos en la primera crianza, las de 4 en la segunda y las de 3 en la tercera (Pajuelo *et al.* 1992). Cabe destacar que Extremadura es el único lugar de Europa donde una misma pareja puede realizar hasta tres puestas en una misma temporada de cría (Pajuelo *et al.* 1992). La estructura de los nidos es una cuenca cerrada de barro con un único orificio de entrada por el que apenas caben los individuos, estando los nidos superpuestos entre ellos. Los individuos del suroeste ibérico parten hacia sus cuarteles de invierno, principalmente africanos, en agosto o septiembre, y los de Europa central y del norte en septiembre y octubre (Bernis 1971; Ulfstrand *et al.* 1974), regresando a partir de febrero, estando su fenología muy ligada a las condiciones ambientales.

Una de las características más notables que presenta la especie es la filopatría (Creutz 1939; Gunten 1963; Rheinwald y Gutscher 1969; Hund y Prizinger 1979; de Lope y da Silva 1988). Esta fidelidad a los lugares de nacimiento y nidificación nos permite abordar estudios y trabajos de investigación a largo plazo. Pero a pesar de esta circunstancia, debe tenerse muy en cuenta la dificultad que entraña la recaptura de un mismo animal en estado silvestre durante varias estaciones consecutivas, ya que las pérdidas de individuos durante la migración son muy elevadas, en torno al 57 por ciento de los adultos (Bryant 1979). En concreto, en un estudio realizado en Badajoz la proporción de retornos natales oscila entre el 6.1 por ciento del segundo año calendario a 0.5 por ciento en el cuarto. Los retornos nidales también disminuyeron a lo largo de los años desde el 27.3 por ciento en el segundo año calendario a 0.5 por ciento en el sexto (de Lope y da Silva 1988).

LOCALIDAD DE ESTUDIO

El estudio se realizó en una colonia ubicada en la Residencia Universitaria Caja de Ahorros de Badajoz (RUCAB) ($38^{\circ}52'N$, $7^{\circ}05'W$) cercana al Campus Universitario. Esta colonia está siendo controlada desde 1985 (Pajuelo *et al.* 1992). Se estima que el número de nidos de avión que actualmente tiene la colonia es de 900, con aproximadamente 600 parejas reproductoras que anidan en los aleros de los edificios y en las columnas de sostén de los mismos. La mayoría de los nidos son de construcción natural, existiendo sólo unos pocos fabricados artificialmente, según el modelo alemán de Hund & Prizinger (1979), utilizados en otros estudios previos. En la ciudad de Badajoz existen más de 5.000 nidos de avión común (de Lope 1983), siendo nuestra colonia de estudio la que mayor densidad de nidos presenta.

Figura 4. Zona de estudio, donde se pueden observar los nidos de *Delichon urbica* en las columnas de sostén del edificio



OBJETIVOS

Los planteados en el presente trabajo de investigación son:

- ✓ Comprobar experimentalmente, y en condiciones naturales, la patogenicidad de los parásitos sanguíneos, analizando su efecto en la eficacia biológica de su hospedador.
- ✓ Averiguar si el éxito reproductor total de un hospedador se ve afectado por los efectos nocivos de los hemoparásitos en los primeros momentos de su ciclo reproductor.
- ✓ Identificar los costes de la producción de la respuesta inmune en los distintos componentes de las estrategias vitales.
- ✓ Verificar la existencia de un compromiso entre la producción de una respuesta inmune y la deposición de andrógenos en la yema
- ✓ Determinar si la inversión en andrógenos de la yema es dependiente de la condición corporal de la hembra.
- ✓ Conocer el porcentaje de individuos infectados por parásitos sanguíneos en la población de Avión Común, observando la prevalencia e intensidad de infección en las distintas clases de edad que la componen.
- ✓ Constatar el papel desempeñado por los hemoparásitos en el desarrollo de la senescencia de sus hospedadores, analizando el sistema inmune y la infección de los individuos de la población con el transcurso del tiempo.
- ✓ Investigar si el papel que juegan los parásitos en el desarrollo de la senescencia es común en distintas especies de aves, comparando cómo varía la infección en dos especies de hirundídeos con el transcurso del tiempo.

REFERENCIAS

- Adamo SA (1999). Evidence for adaptive changes in egg laying in crickets exposed to bacteria and parasites. *Animal Behaviour* 57: 117-124
- Agnew P, Bedhomme S, Haussy C, Michalakis Y (1999). Age and size at maturity of the mosquito *Culex pipiens* infected by the microsporidian parasite *Vavraia culicis*. *Proc. Roy. Soc. London B* 266: 947-952
- Ahmed FE, Mohammed AHH (1978): *Haemoproteus columbae*: course of infection, relapse and immunity to reinfection in the pigeon. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 57: 229-236.
- Allander K, Bennett GF (1994). Prevalence and intensity of hematozoan infections in a population of Great Tits *Parus major* from Gotland, Sweden. *Journal of Avian Biology* 25: 69-74
- Anderson RM, May R (1978). Regulation and stability of host-parasite population interactions. I. Regulatory mechanisms. *Journal of Animal Ecology* 47: 219-247
- Atkinson CT (1986): Host specificity and morphometric variation of *Haemoproteus meleagridis* Levine, 1961 (Protozoa: Haemosporina) in gallinaceous birds. *Canadian Journal of Zoology* 64: 2634-2638
- Atkinson CT (1999): Hemosporidiosis. En *Field Manual of Wildlife Diseases. General Field Procedures and Diseases of Birds* (M. Friend y JC Franson eds.) Supersedes U.S. Fish and Wildlife Service Resources Publication. Madison, USA
- Atkinson CT, Van Riper III C (1991): Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon* and *Haemoproteus*. En *Bird-Parasite interactions* (Loyle & Zuk eds.) Oxford University Press. Oxford pp. 19-48
- Austad SN (1997). Why we age: what science is discovering about the body's journey throughout life? J. Wiley & Sons, New York
- Baker RR (1976): Biology of the trypanosomes of birds. I Lumsden WHR, Evans DA (ed.) *Biology of the Kinetoplastida*, vol. 1 Academic, New York.
- Balat F (1974): Gelegegröse, Höne der Brutverluste und Bruterfolg bei der Mehlschwalbe, *Delichon urbica* (L.). *Zoologické Listy* 2: 343-356.
- Begon M, Harper JL, Townsend CR (1996). *Ecology*. Blackwell, Oxford.

-
- Bensch S, Pérez-Tris J, Waldenström J, Hellgren O (2004): Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences in avian malaria parasites: multiple cases of cryptic speciation?. *Evolution* 58: 1617–1621
 - Bennett GF, Peirce MA, Ashford RW (1993): Avian Haematozoa: mortality and pathogenicity. *J. Nat. Hist. Lond.* 26: 993-1001.
 - Benzi G, Moretti A (1995). Age-and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the Glutathione System. *Free Rad Biol Med* 19: 77-101
 - Bernis F (1971): *Aves Migradoras Ibéricas*. Fasc 7. S.E.O. Madrid
 - Bishop A, Tate P, Thorpe M (1938): The duration of *Plasmodium relictum* infections in canaries. *Parasitology* 30: 388-391
 - Bishop MA, Bennett GF (1992): Host-parasite catalogue of the avian haematozoa. Suppl. 1 and Bibliography of the avian blood-inhabiting haematozoa, Suppl.2 *Occas. Pap. Biol.* 15
 - Blondel J, Maistre M, Perret P, Hurtrezboussets S, Lambrechts MM (1998). Is the small clutch size of a Corsican blue tit population optimal? *Oecologia* 117: 80-89
 - Bloom PB (1999). The future of public health. *Nature* 402: c63-c64
 - Bonsall MB, Hansell MP (1998). Apparent competition structures ecological assemblages. *Nature* 388: 371-373
 - Bryant DM (1979): Reproductive cost in the house martin *Delichon urbica*. *Journal of Animal Ecology* 52: 905-925
 - Bush AO, Fernández JC, Esch GW, Seed JR (2001): Parasitism. The diversity and ecology of animal parasites. Cambridge University Press. Cambridge, UK
 - Buss LW (1987). The evolution of individuality. Princeton University Press, Princeton.
 - Carroll L (2000). Alice's adventures in wonderland & Through the Looking-Glass. Signet Classic, Penguin Books Ltd. New American Library, New York
 - Charlton BG, Brierly ES, Turnbull DM (1998). Preferential amplification of mutant clones as a mechanism of ageing. *QJM*; 91: 865-6
 - Charnov EL (1982). The theory of sex allocation. Princeton, NJ: Princeton University Press.
 - Cheng TC (1986): General parasitology (2nd edition). Academic Press, New York

-
- Cichon M, Sendecka J, Gustafsson L (2003). Age-related decline in humoral immune function in Collared Flycatchers. *Journal of Evolutionary Biology* 16: 1205-1210
 - Clark F, McNeil DAC, Hill LA(1993): Studies of the dispersal of the three congeneric species of flea monoxenous to the house martin (*Delichon urbica* L.). *The Entomologist* 112: 85-94.
 - Clayton DH, Moore J (1997): *Host-Parasite Evolution: General Principles and Avian Models*. Oxford University Press, New York
 - Covalada Ortega J, Gállego Berenguer (1950). Hemoproteus aviares. *Revista Ibérica de Parasitología* 2: 142-185
 - Creutz G (1939): Nachtrag zu "Ratschläge zur Schwalben beringung und Ergebnisse." *Vogelring* 11(2): 77-92.
 - Cunningham AA, Daszak P (1998). Extinction of a species of land snail due to infection with microsporidian parasite. *Conservation Biology* 12: 1139-1144
 - Cushing BS (1985). Estrous mice and vulnerability to weasel predation. *Ecology* 66: 1976-1978
 - Da Silva JAP (1999). Sex hormones and glucocorticoids: interactions with the immune system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 876: 102-118.
 - Daan S, Deerenberg C, Dijkstra C (1996). Increased daily work precipitates natural death in the kestrel. *J. Anim. Ecol.* 65: 539-544
 - Davidar P, Morton ES (1993): Living with parasites: prevalence of a blood parasite and its effect on survivorship in the Purple Martin. *The Auk* 110(1): 109-116
 - Dawson RD, Bortolotti GR (2000). Effects of hematozoan parasites on condition and return rates of American kestrels. *The Auk* 117(2): 373-380.
 - de Lope, F (1983): La reproducción d'*Hirundo rustica* en Extremadura (Espagne). *Alauda* 51(2): 89-91
 - de Lope, F (1997): Avión común. En *Atlas de las Aves de España (1975-1995)* (F.J. Curroy coord.), Ed. Lynx, Barcelona.
 - de Lope, F, da Silva, E (1988): La fidelidad al lugar de nidificación o de nacimiento en el avión común (*Delichon urbica urbica* L.) en Badajoz, España. *Ardeola*, 35 (1): 51-58

-
- Deerenberg C, Dekogel CH, Overkamp GFJ (1996). Cost of reproduction in the Zebra Finch *Taeniopygia guttata*: manipulation of brood size in the laboratory. *J. Avian. Biol.* 27: 321-326
 - Deerenberg C, Apanius V, Daan S, Bos N (1997). Reproductive effort decrease antibody responsiveness. *Proc. Roy. Soc. London B* 264: 1021-1029
 - Downing JA, Bryden WL (2002). A non invasive test of stress in laying hens. RIRDC 01/143 report. RIRDC. Camden
 - Dufva R, Allander K (1995). Intraespecific variation in plumage coloration reflects immune response in Great tit (*Parus major*) males. *Functional Ecology* 9: 785-789
 - Dufva R (1996). Blood parasitism, health, reproductive success, and egg volume in female great tits *Parus major*. *Journal of Avian Biology* 27: 83-87.
 - Eising CM, Eikenaar C, Schwabl H, Groothuis TGG (2001). Maternal androgens in blackheaded gull (*Larus ridibundus*) eggs: consequences for chick development. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 268: 839-846.
 - Endler JA (1986). *Natural selection in the wild*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
 - Falconer DS (1989). *Introduction to quantitative genetics*. Longman Scientific, New York.
 - Fallis AM, Desser SS (1977). On species of *Leucocytozoon*, *Haemoproteus*, and *Hepaticystis*. En *Parasitic protozoa* (ed. J.P. Kreier), pp. 239-266. Academic Press. New York.
 - Feldman M, Cryer B, McArthur Ke, Huet BA, Lee E (1996). Effects on aging gastritis on gastric acid and pepsin secretion in humans: a prospective study. *Gastroenterology* 110: 1043-1052
 - Festa-Bianchet M (1989): Individual differences, parasites, and the cost of reproduction in bighorn ewes (*Ovis canadensis*). *Journal of Animal Ecology* 58: 785-795
 - Finch CE (1990): *Longevity, Senescence and the Genome*. University of Chicago Press, Chicago.
 - Fisher RA (1930): *The Genetical Theory of Natural Selection*. Clarendon Press, Oxford.

-
- Forbes ML (1993): Parasitism and host reproductive effort. *Oikos* 67: 444-450.
 - Folstad I, Karter AJ (1992). Parasites, bright males, and the immunocompetence handicap. *American Naturalist*, 139: 603-622.
 - Friedman DB, Johnson TE (1988). A mutation in the age-1 gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphroditic fertility. *Genetics* 118: 75-86
 - Futuyma DJ, Slatkin M (ed) (1983): *Coevolution*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts
 - Garnham PCC (1966): *Malaria parasites and other haemosporidia*. Blackwell Scientific Publishers, Oxford.
 - Gil D (2003). Golden eggs: maternal manipulation of offspring phenotype by egg androgen in birds. *Ardeola* 50, 281– 294.
 - Gil D, Graves J, Hazon N, Wells A (1999). Male attractiveness and differential testosterone investment in zebra finch eggs. *Science* 286, 126– 128.
 - Gil D, Leboucher G, Lacroix A, Cue R, Kreuzer M (2004). Female canaries produce eggs with greater amounts of testosterone when exposed to preferred male song. *Horm. Behav.* 45, 64– 70.
 - Gil D, Marzal A, de Lope F, Puerta M, Moller AP (2005). Immune costs of yolk androgen deposition in female house martins (*Delichon urbica*). *Ecol. Lett (enviado)*
 - Ginsberg JR, Mace GM, Albon S (1995) Local extinction in a small and declining population: wild dogs in the Serengeti. *Proc Biol Sci.* 262:221-228.
 - Greenman CG, Martin II LB, Hau M (2005): Reproductive state, but not Testosterone, reduces Immune Function in male House sparrows (*Passer domesticus*). *Physiological and Biochemical Zoology* 78(1):60–68. 2005.
 - Groothuis TG, Schwabl H (2002). Determinants of within- and among clutch variation in levels of maternal hormones in black-headed gull eggs. *Funct. Ecol.* 16, 281– 289.
 - Groothuis TG, Müller W, Von Engelhardt N, Carere C, Eising C (2005): Maternal hormones as a tool to adjust offspring phenotype in avian species. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29: 329 – 352
 - Gunten KV (1963): Untersuchungen an einer Dorfmeinschaft von mehlschalbe, *Delichon urbica*. *Ornt. Beobach.* 60(1): 1-11

-
- Hamilton WD (1966). The moulding of senescence by natural selection. *J. Theor. Biol.* 12: 12-45
 - Harley CB, Futcher AB, Greider CW (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345: 458-460.
 - Hasselquist D, Marsh JA, Sherman PW, Wingfield JC (1999) Is avian humoral immunocompetence suppressed by testosterone? *Behav Ecol Sociobiol* 45:167–175.
 - Haskell D (1994). Experimental evidence that nestling begging behaviour incurs a cost due to nest predation. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 257: 161-164.
 - Hayflick L (1985). Theories of biological aging. *Exp Gerontol* 20:145-159
 - Heeb P, Werner I, Mateman AC, Kolliker M, Brinhof MWG, Lessels CM, Richner H (1999). Ectoparasites infestation and sex-biased local recruitment of hosts. *Nature* 400: 63-65
 - Herre EA, Knowlton N, Mueller UG, Rehner SA (1999). Laws governing species interactions? Encouragement and caution from figs and their associates. En *Levels of selection in evolution* (ed. L. Keller) Princeton University Press, Princeton, New Jersey
 - Hickman CP, Roberts LS, Parson A (1998): Principios integrales de Zoología. McGraw-Hill, Madrid.
 - Hill LA, Clark F (1993): Ectoparasites of Portuguese house martin *Delichon urbica*. *Airo* 4: 7-11
 - Hudson P (2005): Parasites, diversity, and the ecosystem. En *Parasitism & Ecosystem* (ed. F Thomas, F Renaud y JF Guégan). Oxford University Press, New York
 - Hund K (1976): Beobachtungen, insbesondere zur Brutbiologie, an oberrschwäbischen Populationen der Mehlschwalbe, *Delichon urbica*. *Ornithologie Mitteilungen* 28: 169-178.
 - Hund K, Prinzinger R (1979): Untersuchungen zur Ortstreue, Paartreue und Überlebensrate nestjünger Vögel bei der Mehlschwalbe (*Delichon urbica*) in Oberschwalben. *Volgelwarte* 30(2): 107-117.
 - Ilmonen P, Taarna T, Hasselquist D (2000). Experimentally activated immune defence in female pied flycatchers results in reduced breeding success. *Proceedings of the Royal Society of London series B*. 267:665-670

-
- Janzen DH (1970): Herbivores and the number of tree species in tropical forests. *American Naturalist* 104: 501-528
 - Johns DR (1996). The other human genome: mitochondrial DNA and disease. *Nat Med* 1065-1058
 - Keymer AE, Read AF (1991). Behavioural ecology: the impact of parasitism. En *Parasite-host associations: coexistence or conflict* (ed. CA Toft, A Aeschlimann y L Boils). Oxford University Press, Oxford
 - Kirkpatrick CE, Robinson S, Kirton UD (1991). Phenotypic correlates of blood parasitism in the common grackle. En *Bird-Parasite interactions* (Loyle & Zuk eds.) Oxford University Press. Oxford pp. 344-358
 - Kirkwood TBL (1977). Evolution of ageing. *Nature* 270: 301-304
 - Kirkwood TBL (1996). Human senescence. *BioEssay* 18: 1009-1016
 - Klasing KC (2004): The cost of immunity. *Acta Zoologica Sinica* 50 (6): 961 – 964
 - Knight JA (2000). The Biochemistry of aging. *Adv. Clin. Chem.* 35: 1-62
 - Kondelka D (1978): Die Brutbiologie der Mehlschwalbe (*Delichon urbica*) im Becken Ostrava. *Folia Zoológica* 27: 37-45
 - Korpimäki E, Hakkarainen H, Bennett GF (1993): Blood parasites and reproductive success of Tengmalm's owl: detrimental effects on females but not on males? *Funct. Ecol.* 7: 420-423.
 - Korpimäki E, Tolonen P, Bennett GF (1995): Blood parasites, sexual selection and reproductive success of European kestrels. *Ecoscience* 2: 335-343.
 - Labbé (1894): Recherches zoologiques et biologiques sur les parasites endoglobulaires du sang des vertébrés. *Arch. de Zool. Exp. et Comparée.* II: 55
 - Levine ND (1985): Phylum Apicomplexa. En *Illustrated guide to the protozoa* (ed. J.J.Lee, S.H. Hunter & E.C. Bovee), pp: 322-374. Society of Protozoology. Lawrence, Kansas.
 - Lewis S, Sherratt Tn, Hamer Kc, Wanless S (2001). Evidence of intra-specific competition for food in a pelagic seabird. *Nature* 412: 816-819
 - Lind EA (1960): Zur Ethologie und Ökologie der Mehlschwalbe, *Delichon urbica*. *Annles Zoologici Societatis Zoologicae-Botanicæ Fennicæ Vannamo* 21: 1-123.

-
- Lipar JL, Ketterson ED, Nolan V, Casto JM (1999). Egg yolk layers vary in the concentration of steroid hormones in two avian species. *General and Comparative Endocrinology*, 115: 220-227.
 - Lipar JL, Ketterson ED (2000). Maternally derived yolk testosterone enhances the development of the hatching muscle in the red-winged blackbird *Agelaius phoeniceus*. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 267: 2005 - 2010.
 - Loureau M (1998). Biodiversity and ecosystem functioning: a mechanistic model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95: 5632-5636
 - Loureau M, Roy J, Tilman D (2005). Linking ecosystem and parasite ecology. En *Parasitism & Ecosystem* (ed. F Thomas, F Renaud y JF Guégan). Oxford University Press, New York
 - Magnhagen C (1991): Predation risk as a cost of reproduction. *Tr. Ecol. Evol.* 6: 183-186.
 - May R, Anderson RM (1978). Regulation and stability of host-parasite population interactions. II. Destabilising processes. *Journal of Animal Ecology* 47: 249-267
 - May R, Anderson RM (1979). Population Biology of Infectious Diseases. Part II. *Nature* 280: 455-461
 - McNabb FMA, Wilson CM (1997). Thyroid hormone deposition in avian eggs and effects on embryonic development. *American Zoologist*, 37: 553-560
 - Medawar PB (1952). An unsolved problem of biology. H. K. Lewis, London
 - Medveded Z (1990). An attempt at a rational classification of theories of aging. *Biol Rev* 65:375-398.
 - Merino S, Moreno J, Sanz JJ, Arriero E (2000): Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). *Proc. R. Soc. Lond. B* 267: 2507-2510
 - Michalakis Y, Hochberg ME (1994). Parasitic effects on host life-history traits: a review. *Parasite* 1: 191-294
 - Miller RA (1996): The aging immune system. Primer and prospectus. *Science* 273: 70-74
 - Minchella DJ (1985). Host life-history variation in response to parasitism. *Parasitology* 90: 205-216

-
- Minchella DJ, Loverde PT (1981). A cost of increased early reproductive effort in the snail *Biomphalaria glabrata*. *American Naturalist* 118: 876-881
 - Mock DW, Parker GA (1997). *The Evolution of Sibling Rivalry*. Oxford University Press. Oxford.
 - Møller AP (1974): Tre ars under sogeser I kolonier af Bysalve *Delichon urbica*. *Flora og Fauna* 80: 74-80.
 - Møller AP, Erritzoe J (1996). Parasite virulence and host immune defense: Host immune response is related to nest re-use in birds. *Evolution* 50: 2066-2072.
 - Møller AP, de Lope F (1999): Senescence in a short-lived migratory bird: age-dependent morphology, migration, reproduction and parasitism. *Journal of Animal Ecology* 68: 163-171
 - Møller AP, Erritzoe J (2000). Predation against birds with low immunocompetence. *Oecologia* 122, 500–504.
 - Møller AP, Merino S, Brown CR, Robertson RJ (2001) Immune defense and host sociality: A comparative study of swallows and martins. *Am. Nat.* 158:136 - 145
 - Møller AP, Erritzoe J (2002): Coevolution of host immune defence and parasite-mediated mortality: relative spleen size and mortality in altricial birds. *Oikos* 99: 95-100
 - Møller AP (2005). Parasitism and the regulation of host populations. En *Parasitism & Ecosystem* (ed. F Thomas, F Renaud y JF Guégan). Oxford University Press, New York
 - Moore J (2002): *Parasites and the behaviour of animals*. Oxford University Press, New York
 - Moreno J (1993). Physiological mechanism underlying reproductive trade-offs. *Etología* 3: 41-56
 - Moreno J, Sanz JJ, Arriero E (1999). Reproductive effort and T-lymphocyte cell-mediated immunocompetence in female pied flycatcher *Ficedula hypoleuca*. *Proc. Roy. Soc. London B* 266: 1105-1109
 - Moreno J (2002). La evolución de las estrategias vitales. En *Evolución: la base de la Biología* (ed. M. Soler). Proyecto Sur de ediciones, S.L. Granada
 - Moreno JM (2005) Evaluación Preliminar de los Impactos en España por Efecto del Cambio Climático. Centro de Publicaciones Ministerio de Medio Ambiente
 - Mork M (1996): The effect of kelp in wave damping. *Sarsia* 80: 323-327

-
- Morris JG, Potter M (1997). Emergence of new pathogens as a function of changes in host susceptibility. *Emerging Infection Diseases* 3: 435-441
 - Nager RG, Monaghan P, Houston DC (2000). Within-clutch trade-offs between the number and quality of eggs: experimental manipulations in gulls. *Ecology*, 81: 1339-1350
 - Nelson RJ (2000). *An Introduction to Behavioral Endocrinology*. Sinauer. Sunderland.
 - Nesse RM, Williams GC (1995). *Why we get sick: the new science of Darwinian medicine*. Times Book, New York.
 - Newton I (1998). *Population limitation in birds*. Academic Press, London
 - Nilsson JA, Svensson E (1996). The cost of reproduction: a new link between current reproductive effort and future reproductive success. *Proc. R. Soc. Lond. B* 263: 711-714
 - Noble ER, Noble GA (1976) *Parasitology*. Philadelphia: Lea and Febiger
 - Nordling D, Andersson M, Zohari S, Gustafsson L (1998). Reproductive effort reduces specific immune response and parasite resistance. *Proc. R. Soc. London B* 263: 711-714
 - Pajuelo L, de Lope F, da Silva E. (1992): Biología de la reproducción del avión común (*Delichon urbica*) en Badajoz, España. *Ardeola* 39: 15-23
 - Pardo G (2003). Consideraciones generales sobre algunas teorías del envejecimiento. *Rev. Cubana Invest. Biomed.* 22: 58-67
 - Park T (1948). Experimental studies of interspecies competition. I. Competition between populations of the flour beetles, *Trifolium confosum* Duval and *Tribolium castaneum* Herbst. *Ecological Monographs* 18: 265-308
 - Pérez-Iñigo C (1976): *Parasitología*. Ed. Blume. Barcelona
 - Perez-Tris J, Hasselquist D, Hellgren O, Krizanauskiene A, Waldenstrom J, Bensch S (2005): What are malarial parasites? *Trends in Parasitology* 21: 209-211
 - Pike TW, Petrie M (2003). Potential mechanisms of avian sex manipulation. *Biol Rev* 78:553-74
 - Pilz KM, Smith HG (2004). Egg yolk androgen levels increase with breeding density in the European starling, *Sturnus vulgaris*. *Functional Ecology* 18:58-66
 - Polak M, Starmer WT (1998). Parasite-induced risk of mortality elevates reproductive effort in male *Drosophila*. *Proc. Roy. Soc. London B* 265: 197-201

-
- Polis GA (1999): Why are parts of the world green? Multiple factors control productivity and the distribution of biomass. *Oikos* 86: 3-15
 - Poulin R (1996): How many parasite species are there: are we close to answers? *International Journal for Parasitology* 26: 1127-1129
 - Price P (1980): *Evolutionary biology of parasites*. Princeton University Press, Princeton.
 - Råberg L, Nilsson Ja, Ilmonen P, Stjernman M, Hasselquist D (2000). The cost of an immune response: vaccination reduces parental effort. *Ecol. Lett.* 3: 382 - 386.
 - Rätti O, Dufva R, Alatalo RV (1993). Blood parasites and male fitness in the pied flycatcher. *Oecologia* 96: 410-414
 - Reddel RR (1998). A reassessment of the telomere hypothesis of senescence. *BioEssays* 20: 977-984
 - Reed WL, Vleck CM (2001). Functional significance of variation in egg yolk androgens in the American coot. *Oecologia* 128, 164– 171.
 - Rheinwald G, Gutscher H (1969): Dispersion und Ortstreue der Mehlschwalbe (*Delichon urbica*). *Vogelwelt* 90(4): 121-140
 - Ricklefs RE (2000): Intrinsic aging-related mortality in birds. *Journal of Avian Biology* 31: 103-111
 - Rodríguez K, Céspedes E (1999). Estrés oxidativo y envejecimiento. *Rev Cubana Invest Biomed* 18:67-76
 - Romanoff AL, Romanoff AJ (1949). *The Avian Egg*. Academic Press. New York.
 - Rose MR (1991). *Evolutionary biology of aging*. Oxford University Press, Oxford.
 - Saikkonen K, Faeth SH, Helander M, Sullivan TJ (1998): Fungal endophytes: A Continuum of Interactions with Host Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 319-343
 - Saino N, Ferrari RP, Romano M, Rubolini D, Møller AP (2003). Humoral immune response in relation to senescence, sex and sexual ornamentation in the barn swallow (*Hirundo rustica*). *J Evol Biol* 16: 1127-1134
 - Sanz JJ (1997). Clutch size manipulation in the Pied Flycatcher: effects on nestling growth, parental care and moult. *J. Avian Biol.* 28: 157-162

-
- Schwabl H (1993). Yolk is a source of maternal testosterone for developing birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 90: 11446 - 11450.
 - Schwabl H (1996a). Maternal testosterone in the avian egg enhances postnatal growth. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 114A: 271-276.
 - Schwabl H (1996b). Environment modifies the testosterone levels of a female bird and its eggs. *Journal of Experimental Zoology*, 276: 157-163.
 - Schwabl H (1997). Maternal steroid hormones in the egg. En S. Harvey & R. J. Etches (Eds): *Perspectives in Avian Endocrinology*, pp. 3-13. *Journal of Endocrinology*. Bristol.
 - Schwabl H, Mock, DW, Gieg JA (1997) A hormonal mechanism for parental favouritism. *Nature* 386: 231.
 - Searcy WA (1988). Do female red-winged blackbirds limit their own breeding densities? *Ecology*, 69: 85-95.
 - Sargent ED, Sargent ET (1952): Recherches experimentales sur l'infection latente et la prémunition dans le paludisme. *Archives de l'Institut Pasteur d'Argelie* 30: 203-239
 - Seutin G (1994). Plumage redness in redpoll finches does not reflect hemoparasitic infection. *Oikos*, 70: 280-286.
 - Shaffer LR, Formanowicz DR (1996). A cost of viviparity and parental care in scorpions: Reduced sprint speed and behavioural compensation. *Anim. Behav.* 51: 1017-1023
 - Sheldon B, Verhulst S (1996). Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends. Ecol. Evol.* 11: 317-321
 - Sockman KW, Schwabl H (2000). Yolk androgens reduce offspring survival. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 267: 1451- 1456.
 - Sohal RS, Arnold LA, Sohal BH (1990). Aged-related changes in antioxidants enzymes and pro-oxidant generation in tissues of the rat with special reference to parameters in two insect species. *Free Rad Biol Med* 10: 495-500
 - Soler JJ (2002a). Selección natural y adaptación. En *Evolución: la base de la biología* (Soler, M. Ed.). Proyecto Sur, Granada, pp: 127-157.
 - Soler JJ (2002b). La Teoría evolutiva y la medicina. En *Evolución: la base de la biología* (Soler, M. Ed.). Proyecto Sur, Granada, pp: 389-405

-
- Stearns SC (1992). The evolution of life histories. Oxford University Press, Oxford.
 - Stearns SC, Hoekstra RF (2000). Evolution: an introduction. Oxford University Press, New York
 - Temple SA (1986). Do predators always capture substandard individuals disproportionately from prey populations? *Ecology* 68: 669-674
 - Tilman D, Knops J, Wedin D, Reich P, Ritchie M, Siemann E (1997). The influence of functional diversity and composition on ecosystem processes. *Science* 277: 1300-1302
 - Thomas F, Guégan Jf, Michalakis Y, Renaud F (2000). Parasites and host life-history traits: implications for community ecology and species co-existence. *International Journal for Parasitology* 30: 669-674
 - Thomas F, Bonsall MB, Dobson AP (2005). Parasitism, biodiversity and conservation. En *Parasitism & Ecosystem* (ed. F Thomas, F Renaud y JF Guégan). Oxford University Press, New York
 - Toft CA (1986) Communities of parasites with parasitic life-styles. En *Community Ecology* (ed. JM Diamond y TJ Case). Harper & Row, New York
 - Ulfstrand S, Ross G, Alerstam T (1974): Visible bird migration at Falsterbo, Sweden. *Var Fagelvård suppl.* 8: 1-245
 - Van Nouhuys S, Hanski I (2002). Colonization rates and distances of a host butterfly and two specific parasitoids in a fragmented landscape. *Journal of Animal Ecology* 71: 639-650
 - Van Valen L (1973). A new evolutionary law. *Evol. Theory* 1:1-30.
 - Von Schantz T, Bensch S, Grahn M, Hasselquist D, Wittzell H (1999). Good genes, oxidative stress and condition-dependent sexual signals. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 266: 1-12.
 - Wagner R, Davidar P, Schug M, Morton E (1997): Do blood parasites affect paternity, provisioning and mate-guarding in Purple martins?. *The Condor* 99: 520-523
 - Weatherhead PJ, Bennett GF (1991). Ecology of Red-winged Blackbird parasitism by haematozoa. *Canadian Journal of Zoology* 69: 2352-2359.
 - Weatherhead PJ, Bennett, GF (1992). Ecology of parasitism of brown-headed cowbirds by haematozoa. *Canadian Journal of Zoology* 70: 1-7

-
- Weatherhead PJ, Metz KJ, Bennett GF, Irwin R (1993). Parasite fauna, testosterone and secondary sexual traits in male red-winged blackbirds. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 33: 13-23
 - White III HB (1991). Maternal diet, maternal proteins and egg quality. En D. C. Deeming & M. W. J. Ferguson (Eds.): *Egg incubation: its effects on embryonic development in birds and reptiles*, pp. 1-15. Cambridge University Press. Cambridge.
 - Williams GC (1957): Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. *Evolution* 11: 398-411
 - Williams GC (1966). *Adaptation and natural selection*. Princeton University Press, Princeton.
 - Williams TD (1994). Intraspecific variation in egg size and egg composition in birds: effects on offspring fitness. *Biological Reviews*, 68: 35-59.
 - Zuk M, Stoehr AM (2002): Immune defence and host life history. *The American Naturalist* 160: S09-S22 *et al.*

Capítulo II

Cómo los parásitos maláricos pueden disminuir el éxito reproductor: un estudio experimental.

MALARIAL PARASITES DECREASE
REPRODUCTIVE SUCCESS: AN
EXPERIMENTAL STUDY IN A
PASSERINE BIRD.

Oecología (2005) 142: 541-545

Abstract

Malarial parasites are supposed to have strong negative fitness consequences for their hosts, but relatively little evidence supports this claim due to difficulty of making experimental tests. We experimentally reduced levels of infection with the blood parasite *Haemoproteus prognei* in its host the house martin *Delichon urbica*, by randomly treating adults with primaquine or a control treatment. Treated birds had significantly fewer parasites than controls. The experiment increased clutch size by 18%, and this difference increased to 39% at hatching and 42% at fledging. There were no effects of treatment on quality of offspring measured in terms of tarsus length, body mass, haematocrit or T-cell mediated immune response. These findings demonstrate that malarial parasites can have dramatic effects on clutch size and other demographic variables, potentially influencing the evolution of clutch size, but also the population dynamics of heavily infected populations of birds.

INTRODUCCIÓN

Los parásitos son ubicuos y pueden tener efectos detrimentales o incluso drásticos sobre sus hospedadores, debido a la explotación de recursos limitados que podrían de otra manera ser encaminados a otras actividades por los hospedadores (Noble y Noble 1976; Price 1980; Combes 2001). Se supone que muchos aspectos de las estrategias vitales de los hospedadores, como la edad de maduración, el tamaño de la puesta y el tamaño de la descendencia se ven afectados por la acción de los parásitos (Hochberg *et al.* 1992; Lehmann 1993; Møller 1997). En las últimas décadas han comenzado a surgir resultados que apoyan esas ideas. Sin embargo nuestro conocimiento de las relaciones causales es todavía escaso debido principalmente a la falta de manipulaciones experimentales que comprueben de forma empírica estas afirmaciones.

La malaria es una de las enfermedades más importantes y extendida que puede provocar la muerte en humanos (Miller *et al.* 2002), y también presumiblemente en muchos otros organismos (Atkinson y Van Riper 1991; Bennett *et al.* 1993). Se supone que tiene efectos muy negativos en la eficacia biológica del hospedador, debido a que este grupo de parásitos intracelulares provoca un descenso en la eficacia del metabolismo (Chen *et al.* 2001). Los parásitos maláricos son unos de los más profusos, con prevalencias que a menudo alcanzan el 100% de las infecciones crónicas (Atkinson y Van Riper 1991). De cualquier modo, las consecuencias de las infecciones de malaria en la eficacia biológica aún son poco conocidas. No obstante, algunos estudios han mostrado experimentalmente que un incremento en la inversión parental causa un aumento en los niveles de infección (Oppliger *et al.* 1996; Merino *et al.* 1996; Allander 1997; Merila and Andersson 1999; Wiehn *et al.* 1999). A pesar de que diversas investigaciones han sugerido que los parásitos maláricos conducen a la reducción en los componentes de la eficacia biológica, los resultados son en parte contradictorios en cuanto a la magnitud del efecto resultante (Korpimäki *et al.* 1995; Sundberg 1995; Oppliger *et al.* 1997; Bennett *et al.* 1988; Dawson and Bortolotti 2000; Sanz *et al.* 2001). Algunos estudios han mostrado débiles efectos, que explican al menos un porcentaje de la varianza. Pero el principal problema de todas estas investigaciones, repertmos, es la falta de experimentación. Hasta la fecha únicamente un solo estudio ha tratado de forma experimental los efectos de la malaria en las aves. Merino y colaboradores (2000) redujeron significativamente el nivel de infección de herrerillos

comunes (*Parus caeruleus*) mediante la administración de primaquina, y ésta disminución de la parasitemia condujo a un incremento en el éxito reproductor, con lo que comprobaron un efecto directo de la enfermedad en el éxito reproductor de las aves.

El objeto de este estudio es comprobar experimentalmente cómo la infección de malaria afecta al tamaño de puesta, manipulando el status de infección con la droga antimalárica primaquina. Este tipo de experimentos es importante porque pueden ser usados para calcular si las infecciones tempranas de malaria durante el ciclo reproductor tienen efectos mayores en el éxito reproductor de esa estación. Para ello se requiere realizar el tratamiento experimental de los adultos antes del inicio de la reproducción, aprovechando que es el momento en el cual realizan la mayor producción de hormonas sexuales y que los individuos con infecciones crónicas pueden mostrar recaídas en la infección con la consecuente pérdida de productividad (p.ej. Chernin 1952; Applegate and Beaudoin 1970; Allander and Sundberg 1997). De esta forma, al realizar el tratamiento experimental de los hospedadores de forma temprana, se espera que reduzcan o mantengan los niveles de infección en un momento crítico del ciclo reproductor en el que normalmente las infecciones aumentan de forma considerable.

MATERIALES Y MÉTODOS

Entre marzo y mayo de 2002, 49 parejas de Avión Común fueron escogidas al azar antes del comienzo de sus puestas y se les asignó igualmente al azar uno de los dos tratamientos. El tratamiento se realizó de media unos 9.37 días (SD = 1.97) antes del comienzo de la puesta de los huevos; 52 adultos pertenecientes a 26 nidos fueron sometidos al tratamiento, mientras que otros 46 adultos de 23 nidos se establecieron como grupo control. Las malas condiciones atmosféricas (precipitaciones y fuertes vientos) fueron las causantes de la deserción de algunos adultos, circunstancia normal en esta especie, quedando finalmente para el estudio 32 adultos en el grupo experimental y 28 en el control. No hubo diferencias significativas en la fecha de captura (Mann–Whitney U-test, $z = -0.18$, $P = 0.87$), peso corporal (Mann–Whitney U-test, $z = -0.44$, $P = 0.68$), longitud del ala (Mann–Whitney U-test, $z = -1.27$, $P = 0.22$), longitud del tarso (Mann–Whitney U-test, $z = -0.45$, $P = 0.65$) y valor del hematocrito (Mann–Whitney U-test, $z = 0.19$, $P = 0.85$) entre los individuos experimentales y

control que abandonaron sus nidos y los que se utilizaron para el estudio. Únicamente se utilizaron en el estudio los datos de las primeras puestas, al ser las que mejor caracterizan el potencial reproductor de la especie ya que sólo la mitad de las parejas reproductoras realizan segundas puestas (Pajuelo *et al.* 1992).

Los individuos fueron capturados al amanecer en sus nidos y a los adultos del grupo experimental se les inyectó subcutáneamente 0.01 mg de primaquina (Sigma, St. Louis, Mo.) en 0.1 ml de solución salina, o el mismo volumen de solución salina al grupo control, siguiendo el procedimiento utilizado por Merino y colaboradores (2000). La primaquina es un compuesto químico anti-malárico usado en diferentes tratamientos para reducir los niveles de parasitemia en aves (Redig *et al.* 1993). Para minimizar los efectos dosidependientes que este tratamiento puede provocar, como problemas gastrointestinales, desarrollo de anemia hemolítica y methaemoglobinaemia (Mayorga *et al.* 1997), se redujo el tratamiento administrado al grupo experimental a la mínima concentración en una única dosis. En cualquier caso, la toxicidad de la primaquina descarta la posibilidad de efectos beneficiosos secundarios de la medicación más allá de la reducción de los parásitos sanguíneos (ver Merino *et al.* 2000)

Las muestras de sangre para las mediciones hematológicas se tomaron de la vena braquial justo antes de la inoculación del tratamiento. Para la identificación de los parásitos sanguíneos, se extendió una gota de sangre en un portaobjeto y se dejó secar al aire. Todos los individuos fueron identificados individualmente con anillas de metal numeradas.

Los nidos fueron inspeccionados cada día con el fin de obtener información de las fechas exactas de puesta, tamaño de puesta, fecha de eclosión y tamaño de la nidada (día 1 = 10 de marzo, correspondiente a la deposición del primer huevo).

Cuando los pollos tuvieron 12 días de edad se recapturó a los padres y se les extrajo una segunda muestra de sangre para comprobar el efecto del tratamiento sobre la prevalencia e intensidad de parasitismo.

Las muestras de sangre fueron fijadas en metanol absoluto y teñidas con Giemsa. Para el análisis de los parásitos se siguió el procedimiento utilizado por Merino y colaboradores (1997). La mitad de cada frotis se examinó a 200 aumentos para buscar parásitos grandes extraeritrocíticos como *Trypanosoma*, y en la otra mitad del frotis se revisaron 20 campos a 400 aumentos para comprobar la presencia de hematozoos intraeritrocíticos (i.e. *Haemoproteus*). La intensidad de parásitos extra-eritrocíticos se cuantificó como el número de parásitos por 100 campos revisados, y los parásitos intra-

eritrocíticos como el número de parásitos por cada 2000 eritrocitos a 1000 aumentos con aceite de inmersión.

El sistema de defensa más sofisticado utilizado por los hospedadores para luchar contra los parásitos es el sistema inmune. Para cuantificarlo se usó la respuesta inmune mediada por células T producida por la inoculación de un antígeno nuevo, la fitohemaglutinina (PHA). Esta es una medida estándar utilizada comúnmente en estudios de aves de corral para conocer la capacidad de producción de una respuesta inmune mediada por células T (Goto *et al.* 1978; Parmentier *et al.* 1993). La inyección de PHA produce una activación y proliferación local de células T, seguida de un reclutamiento local de células implicadas en la reacción de inflamación y un incremento de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (Goto *et al.* 1978; Abbas *et al.* 1994). Esta medida tiene una alta repetitibilidad, como se ha demostrado en estudios previos (Gonzalez *et al.* 1998; Navarro *et al.* 2003)

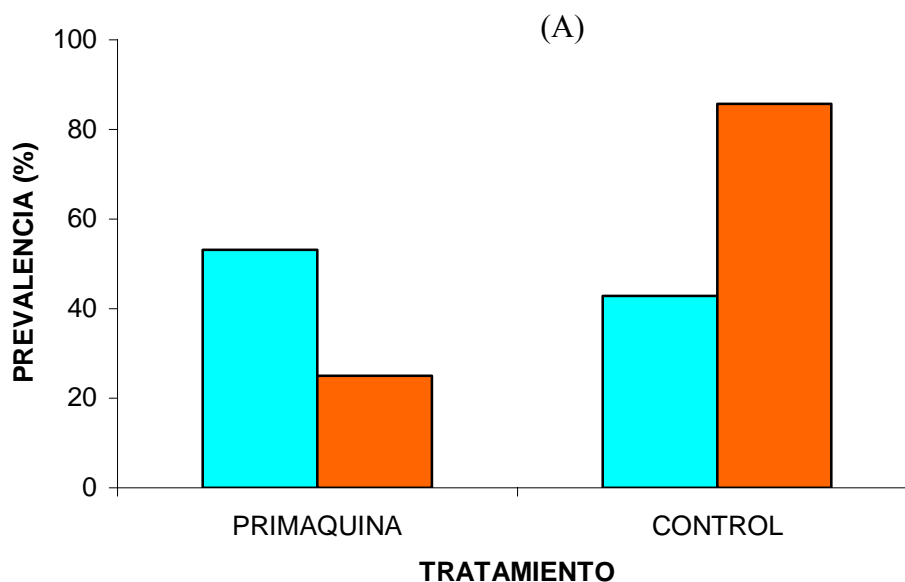
A la edad de 15 días se administró a los pollos 0.05 ml de PBS que contenían 0.2 mg de PHA en el patagio de un ala (Smits *et al.* 1999). A todos los individuos se les inyectó por la tarde entre las 16.00 y las 18.00 horas. La dosis de PHA usada en este estudio es la misma utilizada en otros en cautividad y en condiciones naturales (Saino *et al.* 1997; Christe *et al.* 1998, 2000; Birkhead *et al.* 1999; González *et al.* 1999; Horak *et al.* 1999; Soler *et al.* 1999; Merino *et al.* 2000; Navarro *et al.* 2003). Se midió el espesor del patagio inyectado con PHA inmediatamente antes de la inoculación y 24 horas después de la misma, usando un espesímetro (Digimatic Indicator ID-C, Mitutoyo Absolute 547-301, Japan) con una precisión de 0.01 mm. En análisis posteriores se tomó el aumento del espesor del patagio como una medida de la intensidad de la respuesta inmune inducida por PHA. En la primera captura también se midió la masa corporal utilizando una balanza Pesola con una precisión de 0.1 g, y la longitud del tarso con un calibre digital de precisión 0.01 mm. Los microcapilares con la sangre se centrifugaron a 14.000 r.p.m. durante 10 minutos para estimar el valor del hematocrito (la proporción de sangre ocupada por glóbulos rojos por unidad de volumen)

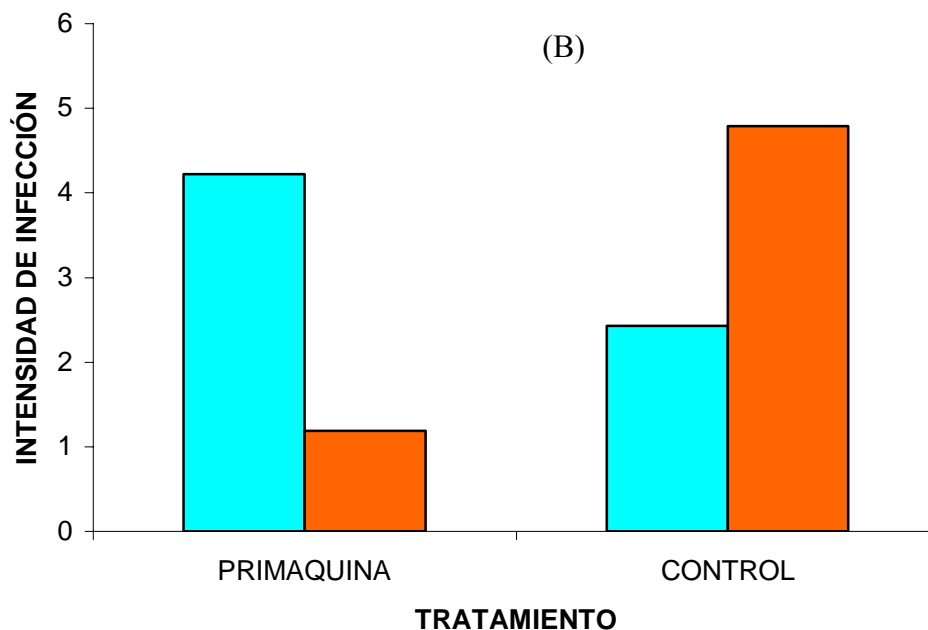
RESULTADOS

Antes del tratamiento, al comienzo de la estación reproductora, el 48% de los adultos (n = 60) estaban infectados con *Haemoproteus*, el principal parásito sanguíneo

en la población de Avión Común. En la fase previa al tratamiento con primaquina no existieron diferencias significativas en la prevalencia ($\chi^2 = 0.63$, $P = 0.43$) ni en la intensidad de parasitismo entre los grupos (Mann-Whitney U-test, $z = -1.33$, $P = 0.18$; n experimental = 32 y n control = 28). Tal y como se esperaba, apareció un descenso significativo tanto en la prevalencia (McNemar $\chi^2 = 3.77$, $P = 0.049$; Fig 1A) como en la intensidad de parasitismo (Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test, $z = -3.29$, $P = 0.001$; Fig 1B) en el grupo experimental, mientras que en el grupo control hubo un incremento significativo en el número de individuos infectados (McNemar $\chi^2 = 8.64$, $P = 0.002$; Fig. 1A) y en la intensidad de parasitismo (Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test, $z = -2.43$, $P = 0.015$; Fig. 1B). Además, permanecieron un mayor número de individuos libre de parásitos en el grupo experimental (34.4%) que en el grupo control (10.7%) ($\chi^2 = 9.314$, $P = 0.002$).

Fig. 1. (A) Prevalencia (%) y (B) intensidad de infección de *Haemoproteus prognei* en adultos de Avión Común antes (azul) y después (naranja) del tratamiento con primaquina. El tamaño de muestra es de 16 parejas experimentales y 14 controles.





También encontramos diferencias significativas entre ambos grupos en el tamaño de puesta, el tamaño de la nidada al eclosionar y el número de volantones (Tabla 1). El tamaño de puesta fue un 18% de media mayor en los individuos tratados con primaquina que en los controles, y estas diferencias aumentaron hasta un 39% en el momento de la eclosión y a un 42% en el número de volantones. El éxito de eclosión fue mayor en el grupo experimental. Esto sugiere que la calidad del huevo y/o del comportamiento durante la incubación se vió afectada por el tratamiento (Tabla 1). Por el contrario, no hubo diferencias en el éxito de cría o en el éxito reproductor total (Tabla 1). Al introducir la intensidad de infección final por *Haemoproteus* como covariable en un análisis de covarianza, la diferencia en el tamaño de puesta en el grupo experimental fue pequeña y no llegó a ser significativa ($F_{1,57} = 3.52$, $P = 0.07$).

La calidad de la descendencia medida en términos de peso corporal, longitud del tarso, hematocrito y respuesta inmune mediada por células T no marcó diferencias significativas entre grupos (Tabla 1)

Tabla 1. Éxito reproductor medio (SD) y calidad de los pollos del grupo experimental (N = 16) y del grupo control (N = 14). El número de los pollos del grupo experimental fue de 45 y 22 controles. Las diferencias para los pollos fueron analizadas usando medias de cada nidada.

TABLA 1	Grupo EXPERIMENTAL	Grupo CONTROL	Z (Mann-Whitney Utest)	P
Tamaño de puesta	4.44 (0.62)	3.64 (0.93)	-2.466	0.02
Tamaño de nidada al eclosionar	3.37 (1.25)	2.07 (0.83)	-3.352	0.001
Tamaño de nidada (volantones)	2.81 (1.11)	1.64 (0.63)	-3.350	0.001
Éxito de eclosión	0.75 (0.27)	0.58 (0.26)	-2.233	0.03
Éxito de volantones	0.85 (0.16)	0.82 (0.20)	-0.496	0.65
Éxito de cría	0.63 (0.26)	0.48 (0.27)	-1.842	0.07
Hematocrito (%)	45.52 (2.76)	46.53 (3.18)	-0.831	0.413
Peso corporal (g)	17.69 (1.16)	17.40 (1.15)	-0.577	0.586
Longitud del tarso (mm)	10.29 (0.32)	10.31 (0.34)	-0.438	0.683
R. Inmune células T (mm)	1.49 (0.43)	1.35 (0.18)	-0.30	0.786

DISCUSIÓN

El tamaño de puesta incrementó un 18% como consecuencia del tratamiento con primaquina (Tabla 1). Se han propuesto numerosas hipótesis para explicar el tamaño de puesta óptimo (ver. revisión en Roff 2001). La importancia del parasitismo en la evolución del tamaño de puesta no ha sido siempre reconocida, y únicamente unos pocos estudios han tenido en cuenta esta cuestión, a pesar de la ubicua presencia de los parásitos en todos los hospedadores (Møller 1991; Richner & Heeb 1995; Martin *et al.* 2001). Una de las variadas hipótesis relaciona directamente la evolución del tamaño de puesta óptimo con el impacto de los parásitos en el éxito reproductor de los hospedadores, donde los individuos con un mayor tamaño de puesta deberían acusar más los efectos negativos del parasitismo (Møller 1991). Tales efectos suceden en aquellas puestas de mayor tamaño, ya que en estas puede ocurrir un crecimiento muy rápido de la población parásita, o donde las consecuencias del parasitismo sobre el éxito reproductor pudieran ser más perjudiciales, pues un mayor número de crías se ven afectadas negativamente por los parásitos (Møller 1991). Nuestro estudio ha sido el primero en demostrar que, efectivamente, existe una mejora en el tamaño de puesta debida a una reducción en el número de parásitos. Únicamente podemos especular cuáles son los mecanismos que pueden generar tal efecto, ya que no se han evaluado de manera directa en este estudio. En primer lugar, los parásitos maláricos podrían tener un efecto directo sobre la habilidad de captura de alimento de sus hospedadores y, en consecuencia, sobre el nivel de adquisición de recursos necesarios en una fase vital tan crítica como es la producción de huevos. En segundo lugar, los componentes usados por el sistema inmune para luchar contra las infecciones juegan, de hecho, un papel importante en la formación del huevo. En este sentido, Blount *et al.* (2004) han demostrado recientemente que la disponibilidad de carotenoides limita la producción de huevos en las aves. Saino *et al.* (2003) comprobaron a su vez que los carotenoides limitan la respuesta inmune mediada por células T, la cual también está implicada en la defensa inmune antimalárica (Wakelin 1996). Finalmente, por definición, los parásitos extraen nutrientes de sus hospedadores que, en otras circunstancias, podrían haber sido usados por estos (Price 1980). De manera similar, el sistema inmune requiere recursos que, de otra forma, podrían ser destinados a otras funciones (Sheldon y Verhulst 1996), en este caso, a la producción de una puesta más efectiva.

Mientras que la diferencia en el tamaño de puestas entre los grupos fue del 18% de media, la diferencia en el éxito de eclosión aumentó notablemente al 39% y al 42% en los volantones criados, debido a un efecto significativo del tratamiento en el éxito de eclosión (Tabla 1). El efecto del tratamiento en el éxito de eclosión pudiera ser porque afectase a la calidad y viabilidad del huevo, o causado por alguna diferencia en el comportamiento de incubación por parte de la hembra. Si hay un compromiso entre el uso de carotenoides y otros antioxidantes en la producción de los huevos y la inmunidad como se citó anteriormente (Blount *et al.* 2004; Saino *et al.* 2003), las yemas de los huevos puestos por las hembras del grupo control deberían tener unos niveles menores de antioxidantes, lo que directamente conduciría a un menor éxito reproductor (Surai 2003). De forma alternativa, los adultos de Avión Común podrían haberse visto afectados negativamente por las infecciones con malaria, causando una reducción en la eficacia de la incubación y en el aprovisionamiento de la descendencia. Esta última hipótesis parece menos probable ya que el esfuerzo parental durante el periodo de cría de los pollos es considerablemente mayor que durante la incubación (Wendeln y Becker 1996). Por tanto, deberíamos esperar efectos mucho mayores en el éxito de los volantones que en el éxito de eclosión, mientras que en realidad observamos lo contrario. Por ello, sugerimos dos hipótesis alternativas para explicar este hecho. Primero, desde la inoculación de la primaquina hasta el momento en el que hemos medido a los volantones transcurrió casi un mes, con lo que los efectos del tratamiento sobre el status de infección pudieran no ser tan evidentes en ese momento. Segundo, pudiera también ocurrir que los padres ajustaran su esfuerzo parental al tamaño de cría, como se apunta en otros estudios (véase Sheldon y Verhulst 1996) y no tuvieron ya suficiente energía para apoyar en fases posteriores.

Aunque los parásitos pueden tener fuertes efectos sobre los parámetros demográficos de sus hospedadores, no se conocen con exactitud las posibles consecuencias sobre las dinámicas poblacionales. Utilizando los datos obtenidos en este estudio podemos hacer unas estimaciones preliminares de los efectos de los parásitos maláricos sobre la población de Avión Común en España y Dinamarca. El éxito reproductor anual de avión común en España es, de media, de unos 4.3 huevos en la primera puesta y de 3.7 en la segunda. Estos 8.0 huevos dan, de media, 6.8 volantones (Pajuelo *et al.* 1992). El parásito *Haemoproteus* tiene una prevalencia del 48% en la población de avión común española. En esa población infectada, cuando reducimos el número de parásitos sanguíneos, el éxito reproductor se incrementa un 42%. Por tanto,

la producción total de volantones se reduce aproximadamente en un 40% por la presencia de parásitos sanguíneos. En Dinamarca, el Avión Común tiene una primera puesta de unos 4.08 huevos de media, y un 67.7% de la población pone una segunda puesta con una media de 3.36 huevos (Møller 1974). Estos huevos dan 5.87 volantones de media. Dado que la prevalencia de *Haemoproteus* en Dinamarca es del 0% (n = 55 adultos, A. P. Møller datos no publicados), no existe una supresión de la reproducción por parásitos sanguíneos. De esta manera, los parásitos de la malaria decrecen el total anual de volantones en un 40% en la población española, pero no en la población danesa. Por tanto, existen efectos considerables de los parásitos sanguíneos en el tamaño de las poblaciones de hospedadores después de la época reproductora, y esto pudiera afectar a la contribución relativa de las diferentes poblaciones al total del tamaño poblacional de los hospedadores debido a las diferencias de productividad de las distintas poblaciones.

REFERENCIAS

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (1994) Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia, W. B. Saunders Co.
- Allander K (1997) Reproductive investment and parasite susceptibility in the great tit. *Funct. Ecol.* 11: 358-364.
- Allander K, Sundberg J (1997) Temporal variation and reliability of blood parasite levels in captive yellowhammer males *Emberiza citrinella*. *J. Avian Biol.* 28: 325-330.
- Applegate JE, Beaudoin RL (1970) Mechanism of spring relapse in avian malaria: effect of gonadotropin and corticosterone. *J. Wildl. Dis.* 6: 443-447.
- Atkinson C, Van Riper III C (1991) Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon* and *Haemoproteus*. In: Loye JE, Zuk M (eds) Bird-Parasite interactions, Oxford University Press, Oxford, pp 19-48.
- Bennett GF, Caines JR, Bishop MA (1988) Influence of blood parasites on the body mass of Passeriform birds. *J. Wildl. Dis.* 24: 339-343.
- Bennett GF, Peirce MA, Ashford RW (1993) Avian Haematozoa: mortality and pathogenicity. *J. Nat. Hist. Lond.* 26: 993-1001.

-
- Birkhead TR, Fletcher F, Pellatt EJ (1999) Nestling diet, secondary sexual traits and fitness in the zebra finch. *Proc. R. Soc. Lond. B* 266: 385–390.
 - Blount JD, Houston DC, Surai PF, Møller AP (2004) Egg-laying capacity is limited by carotenoid pigment availability in wild gulls *Larus fuscus*. *Proc. R. Soc. Lond. B [Suppl]*: s79 – s81.
 - Chen M, Shi L, Sullivan Jr.D (2001) *Haemoproteus* and *Schistosoma* synthesize heme polymers similar to *Plasmodium* hemozoin and β - hematin. *Molec. Biochem. Parasitol.* 113: 1-8.
 - Chernin E (1952) The relapse phenomenon in *Leucocytozoon* infections of the domestic duck. *Am. J. Hygiene* 56: 101-118.
 - Christe P, Møller AP, de Lope F (1998) Immunocompetence and nestling survival in the house martin: “The tasty chick hypothesis”. *Oikos* 83: 175-179.
 - Christe P, Møller AP, Saino N, de Lope F (2000) Genetic and environmental components of phenotypic variation in immune response and body size of a colonial bird, the house martin *Delichon urbica*. *Heredity* 85: 75-83.
 - Combes C (2001) Parasitism. University of Chicago Press. Chicago, I 11.
 - Dawson RD, Bortolotti GR (2000) Effects of hematozoan parasites on condition and return rates of American kestrels. *Auk* 117: 373-380.
 - González G, Sorci G, de Lope F (1999) Seasonal variation in the relationship between cellular immune response and badge size in male house sparrows (*Passer domesticus*). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 46: 117-122.
 - Goto N, Kodama H, Okada K, Fujimoto Y (1978) Suppression of phytohaemagglutinin skin response in thymectomized chickens. *Poultry Sci.* 52: 246-250.
 - Hochberg ME, Michalakis Y, de Meeus T (1992) Parasitism as a constraint on the rate of life-history evolution. *J. Evol. Biol.* 5: 491-504.
 - Hõrak P, Tegelmann L, Ots I, Møller AP (1999) Immune function and survival of great tit nestlings in relation to growth conditions. *Oecologia* 121: 316-322.
 - Korpimäki E, Tolonen P, Bennett GF (1995) Blood parasites, sexual selection and reproductive success of European kestrels. *Ecoscience* 2: 335-343.
 - Lehmann T (1993) Ectoparasites: Direct impact on host fitness. *Parasitol. Today* 9: 8-13.

-
- Martin T, Møller AP, Merino S, Clobert J (2001) Does clutch size evolve in response to parasites and immunocompetence? Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 2071-2076.
 - Mayorga P, Deharo E, Landay I, Couarraze G (1997) Preliminary evaluation of primaquine activity on rodent malaria model after transdermal administration. Parasite 4: 87-90.
 - Merilä J, Andersson M (1999) Reproductive effort and success are related to hematozoan infection in blue tits. Ecoscience 6: 421-428.
 - Merino S, Potti J, Moreno J (1996) Maternal effort mediates the prevalence of trypanosomes in the offspring of a passerine bird. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 5726-5730.
 - Merino S, Potti J, Fargallo JA (1997) Blood parasites of some passerine birds from Central Spain. J. Wildl. Dis. 33: 638-641.
 - Merino S, Moreno J, Sanz JJ, Arriero E (2000) Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). Proc. R. Soc. Lond. B 267: 2507-2510.
 - Miller LH, Baruch DR, Marsh K, Doumbo OK (2002) The pathogenic basis of malaria. Nature 415: 673-679.
 - Møller AP (1974) A three-year study in colonies of house martins (*Delichon urbica*) by means of artificial nests. Flora Fauna 80: 74-80.
 - Møller AP (1991) Ectoparasite loads affect optimal clutch size in swallows. Funct. Ecol. 5: 351-359.
 - Møller AP (1997) Parasitism and the evolution of host life history. In: Clayton DH, Moore J (eds) Host-parasite evolution: General principles and avian models. Oxford University Press, Oxford, pp 105-127.
 - Navarro C, Marzal A, de Lope F, Møller AP (2003) Dynamics of an immune response in house sparrow *Passer domesticus* in relation to time of day, body condition and blood parasite infection. Oikos 101: 291-298.
 - Noble ER, Noble GA (1976) Parasitology. Philadelphia: Lea and Febiger
 - Oppliger A, Christe P, Richner H (1996) Clutch size and malaria resistance. Nature 381: 565
 - Oppliger A, Christe P, Richner H (1997) Clutch size and malarial parasites in female great tits. Behav. Ecol. 8: 148-152.

-
- Pajuelo L, de Lope F, da Silva E (1992) Biología de la reproducción del avión común (*Delichon urbica*) en Badajoz, España. *Ardeola* 39: 15-23.
 - Parmentier HK, Scharma JW, Meijer F, Nieuwland MGB (1993) Cutaneous hypersensitivity responses in chickens divergently selected for antibody responses to sheep red blood cells. *Poultry Sci.* 72: 1679-1692.
 - Price PV (1980) *Evolutionary biology of parasites*. Princeton: Princeton University Press.
 - Redig PT, Talbot B, Guamera T (1993) Avian malaria. *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians, 1993*. Lake Worth, Florida: AAV; 173-181.
 - Richner H, P Heeb (1995) Are clutch and brood size patterns in birds shaped by ectoparasites? *Oikos* 73: 435-441.
 - Roff DA (2001) *Life history evolution*. Sunderland, MA: Sinauer Associates Inc.
 - Saino N, Calza S, Møller AP (1997) Immunocompetence of nestling barn swallows in relation to brood size and parental effort. *J. Anim. Ecol.* 66: 827-836.
 - Saino N, Ferrari R, Romano M, Martinelli R, Møller AP (2003) Experimental manipulation of egg quality affects immunity of barn swallow nestlings. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270: 2485 - 2489.
 - Sanz JJ, Arriero E, Moreno J, Merino S (2001) Interactions between hemoparasite status and female age in the primary reproductive output of pied flycatchers. *Oecologia* 126: 339-344.
 - Sheldon BC, Verhulst S (1996) Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends Ecol Evol* 11: 317-321.
 - Smits J, Bortolotti G, Tella J (1999) Simplifying the phytohemagglutinin skin-testing technique in studies of avian immunocompetence. *Funct. Ecol.* 13: 567-572.
 - Soler M, Martín-Vivaldi M, Marín JM, Møller AP (1999) Weight lifting and health status in the black wheatear. *Behav. Ecol.* 10: 281-286.
 - Sundberg J (1995) Parasites, plumage coloration and reproductive success in the yellowhammer, *Emberiza citrinella*. *Oikos* 74: 331-339.
 - Surai PF (2003) *Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction*. Nottingham University Press, Nottingham
 - Wakelin D (1996) *Immunity to parasites: How parasitic infections are controlled*. Cambridge University Press, Cambridge

- Wendeln H, Becker PH (1996): Body mass change in breeding Common Terns *Sterna hirundo*. Bird Study 43: 85-95
- Wiehn J, Korpimäki E, Pen I (1999) Haematozoan infections in the Eurasian kestrel: effects of fluctuating food supply and experimental manipulation of paternal effort. Oikos 84: 87-98.

Capítulo III

Sobre los costes de la respuesta inmune en
las estrategias vitales

LIFE HISTORY COSTS OF AN
IMMUNE RESPONSE

Oecología (2005) en revisión

Abstract

Immune responses constitute a major way for hosts to defend themselves against parasites. Since hosts do not habitually produce strong responses all the time, immune responses must be costly to maintain or produce. We tested experimentally if the production of a response to a challenge with a novel antigen resulted in a cost in terms of life history, using the highly colonial house martin *Delichon urbica* as a model system. We injected adult breeding birds during laying of the first clutch with Newcastle disease virus (NDV) or a control injection, and the clutch was subsequently removed to induce relaying. NDV stimulates the non-specific immune system, causing production of antibodies during a period of more than two weeks. Accordingly, we found a change in leukocyte counts in experimental birds compared to controls. Experimental treatment reduced the frequency of re-laying, caused a delay in timing of relaying and a reduction in clutch size. Quality of nestlings in terms of body size, body mass and T-cell mediated immune response did not differ significantly between treatments. Therefore, seasonal reproductive success differed significantly between treatments, showing that the production of an immune response is costly in terms of future fecundity.

INTRODUCCIÓN

El parasitismo es una de las principales causas de reducción de la fecundidad y de la viabilidad en animales y plantas domésticas y de vida libre. Como efecto, los hospedadores han desarrollado una gran variedad de defensas para contrarrestar los costes del parasitismo en su eficacia biológica. Estas estrategias incluyen modos de evitar la infección en un primer momento y maneras de eliminar o reducir los efectos del parasitismo una vez que son infectados. El sistema inmune de los vertebrados ha evolucionado como la mejor forma de reducir y controlar los efectos del parasitismo en el interior del organismo, debido a su especificidad para distinguir entre lo propio y lo ajeno. Las respuestas inmunes específicas y generales permiten al hospedador responder eficazmente al desafío, causando reducciones en la viabilidad y fecundidad del parásito. Una respuesta inmune fuerte y eficiente se supone que es beneficiosa, porque previene o reduce los efectos de los parásitos en la fecundidad o viabilidad del hospedador (ver revisión en Wakelin 1996). Pero si estas respuestas inmunes tan intensas tienen generalmente muchos beneficios, ¿por qué los hospedadores no mantienen unas fuertes respuestas continuamente? Dado que estas se producen principal o únicamente en el hospedador ante el desafío del parásito, parece evidente pensar que debe haber unos costes significativos asociados al desarrollo de una respuesta inmune efectiva.

Los costes de la inmunidad derivan principalmente del desarrollo del sistema inmune, del mantenimiento de dicho sistema dentro de un orden funcional y de la producción de una respuesta que permita frustrar la invasión de un parásito (Klasing 2004). Estos costes pueden ser medidos en términos energéticos, de respuestas autoinmunes, o en efectos en las estrategias vitales (e. g. Deerenberg and Lochmiller 2000; Raberg *et al.* 1998; Jacote *et al.* 2004). Por ejemplo, Ots *et al.* (2001) comprobó los costes energéticos de la respuesta inmune durante el invierno en el Carbonero Común (*Parus major*). En otro estudio de inmunidad se mostraron los elevados costes metabólicos que debía soportar la mariposa Blanquita de la Col (*Pieris rapae*) en la activación de su sistema inmune (Freitak *et al.* 2003).

Un segundo tipo de coste de la inmunidad está basado en el hecho de que una respuesta inmune muy fuerte puede volverse contra el propio individuo que la desarrolla, causándole problemas de salud en forma de enfermedades autoinmunes (Raberg *et al.* 1998). A pesar de que existen varios ejemplos en humanos de dichas enfermedades (ver revisión en Raberg *et al.* 1998), no tenemos hasta la fecha

conocimiento de ningún estudio que defina este mecanismo en organismos de vida salvaje. Por último, las respuestas inmunes pueden ser costosas si nos referimos a fecundidad futura o viabilidad, dado el compromiso existente entre la producción, el mantenimiento de la inmunidad y los componentes de las estrategias vitales. Este tipo de coste ha sido uno de los principales puntos de estudio en inmunología ecológica en los últimos cinco años. Los estudios de los costes de la inmunidad en las estrategias vitales incluyen ejemplos de reducción de viabilidad en el abejorro *Bombus terrestris* (Baer y Schmid-Hempel 1999), disminución del esfuerzo parental tras activación de la inmunidad en el Papamoscas Cerrojillo *Ficedula hypoleuca* (Raberg *et al.* 2000), o una mayor duración de la estancia de los pollos en el nido en especies de aves con respuestas inmunes fuertes (Moller *et al.* 2001).

Aunque estos estudios sugieren que dichos costes son comunes, actualmente no se conoce con exactitud cuáles son las causas que determinan su magnitud y si existen diferencias significativas entre especies de hospedadores. Por ejemplo, estudios comparativos de las respuestas inmunes en diferentes especies de hospedadores han mostrado diferencias muy grandes en la intensidad de las respuestas entre especies, pudiendo estas diferencias ser resultado de una frecuencia y probabilidad distinta de transmisión de parásitos (e. g. Moller & Erritzoe 1996; Moller *et al.* 2001; Van Nouhuys y Hanski 2002). Estos resultados podrían implicar que los costes de la inmunidad pudieran ser particularmente grandes en aquellas especies que sufren ataques virulentos de parásitos. De acuerdo con esta predicción, un estudio comparativo de los miembros de la familia de las golondrinas sugirió que aquellas especies que producían una mayor respuesta inmune tuvieron mayores períodos de desarrollo de su tamaño corporal (Moller *et al.* 2001). En este estudio tratamos de ampliar estas investigaciones al cuantificar directamente los costes de la respuesta inmune en las estrategias vitales, utilizando como modelo un ave colonial que sufre un impacto negativo muy fuerte por los parásitos en su éxito reproductor.

Los objetivos de este estudio consistieron en cuantificar los costes en las estrategias vitales de la producción de una respuesta inmune, mediante la inyección de un antígeno novedoso a un grupo de adultos y comparando los resultados con un segundo grupo de adultos pertenecientes al grupo control. Para ello, utilizamos de nuevo como modelo del sistema el Avión Común (*Delichon urbica*) debido a que la gran sociabilidad y la proximidad de los nidos de esta especie puede provocar que se viese particularmente afectada por parásitos virulentos, que de hecho son transmitidos

de forma horizontal rápidamente entre adultos en grandes colonias de cría. Los costes de la inmunidad en las estrategias vitales fueron calculados en el grupo experimental a través de la sustracción de la primera puesta en el momento de la inyección del antígeno, tras la cual se registraron la frecuencia y el tiempo que transcurrió hasta la nueva puesta de reposición. También calculamos el éxito reproductor de la misma. Si la inyección con un nuevo antígeno provoca un costo en términos de estrategias vitales, podríamos predecir que un menor número de hembras del grupo experimental tendrían puestas de reposición, o las harían más tarde o con menor número de huevos que las hembras del grupo control a las cuales no se les inoculó vacuna. Además, deberíamos esperar que la magnitud de los costes fuera directamente proporcional a la magnitud del efecto del tratamiento en las variables reproductivas de la puesta de reposición.

Como se ha señalado, el Avión Común es un paseriforme insectívoro que cría en colonias con un tamaño máximo estimado de más de 1000 parejas reproductoras. Esta especie migratoria llega a sus lugares de cría de sus cuarteles invernales a comienzos de la primavera, y tanto machos como hembras construyen un nuevo nido o reutilizan uno viejo. Algunas semanas después realizan una primera puesta de 3 a 6 huevos, y son incubados unos 15 días tras los cuales los pollos son alimentados durante tres o cuatro semanas por ambos progenitores. Aproximadamente la mitad de las parejas reproductoras realizan una segunda puesta (Pajuelo *et al.* 1992). Las colonias grandes facilitan la transmisión de muchas especies diferentes de parásitos, tanto generalistas como especialistas, que imponen costos muy importantes en la eficacia biológica de los hospedadores al reducir su éxito reproductor (de Lope *et al.* 1993; Christe *et al.* 1998; Marzal *et al.* 2005). Algunos estudios anteriores han mostrado que el Avión Común produce respuestas inmunes mediadas por células T muy fuertes en comparación con otras especies de hirundínidos (Moller *et al.* 2001) y dichas respuestas inmunes se ven afectadas tanto por factores genéticos como por ambientales (Christe *et al.* 2000).

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en la colonia descrita en los métodos durante la estación reproductora primaveral del año 2004.

Los nidos fueron inspeccionados cada dos días para determinar la fecha exacta del comienzo de la puesta. En el momento en el que no se añadió ningún huevo más a la puesta se consideró que ésta había terminado, se capturó a las hembras en sus nidos al

amanecer, y se les asignó de forma aleatoria uno de los dos tratamientos. A las hembras del grupo experimental se les inoculó 40 µl de la vacuna del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV, n = 17; vacuna de reovirus aviar, bronquitis infecciosa, enfermedad de gumboro y de Newcastle, NOBILIS®) y a las hembras pertenecientes al grupo control 40 µl de agua fisiológica, que se utilizó para calcular los efectos del tratamiento *per se* en las hembras (PBS, n = 14).

Antes del tratamiento se midió a las hembras la longitud del ala, de la cola y la envergadura con una regla milimétrica, la longitud del pico, del tarso y de la quilla con un calibre digital de 0.01 mm de precisión, y el peso corporal con una balanza Pesola de 0.5 g de precisión. Las plumas fueron inspeccionadas para comprobar la presencia de barras de crecimiento, malófagos y ácaro, manteniendo la cola y el ala extendidas y contando las barras de muda y los parásitos (ver Christe *et al.* 2002 para más información). Se extrajo una gota de sangre de la vena braquial y se realizó un frotis sanguíneo que permitiese la cuantificación de leucocitos y parásitos sanguíneos al comienzo del experimento.

Tras la inyección se retiró la primera puesta con el fin de inducir una puesta de reposición. Posteriormente, los nidos fueron revisados cada dos días y se registró el comienzo y el tamaño de estas puestas de reposición. Se anotó el tamaño de puesta, los huevos eclosionados y el éxito reproductor estimado como la proporción de los pollos volados entre los huevos puestos.

Cuando los pollos tuvieron 9 días de edad se recapturó a las hembras y se tomó una segunda muestra de sangre para cuantificar los leucocitos y los parásitos sanguíneos tras el tratamiento. Además, se volvieron a tomar registros del peso corporal y de la abundancia de ácaros y malófagos.

Siguiendo el protocolo establecido por Merino y colaboradores (1997), para el estudio de la prevalencia e intensidad de hemoparásitos se revisaron con el objetivo de 200 aumentos la mitad de cada preparación haciendo barridos de izquierda a derecha para detectar grandes parásitos extraeritrocíticos como tripanosomas y microfilarias. A continuación, en la otra mitad de la preparación, se buscó una zona de distribución homogénea de las células y se revisaron 20 campos para localizar parásitos intraeritrocíticos con el objetivo de 400 aumentos, que fueron cuantificados contando el número de parásitos por 2.000 eritrocitos a 1000 aumentos. El conteo leucocitario se estimó revisando 50 campos a 1000 aumentos en una zona homogénea del frotis con células bien separadas que permitiesen la correcta identificación (Merino *et al.* 1999).

Finalmente, a los 14 días de edad se capturó a los volantones y se les midió la longitud del tarso, la masa corporal, se tomó una muestra de sangre en un micro capilar para conocer valor del hematocrito y se realizó un frotis sanguíneo. También se le midió la respuesta inmune mediada por células T mediante la inyección intradérmica en el patagio de 0.04 mg de fitohemaglutinina (PHA) en 0.1 ml de PBS. El espesor del patagio se midió con un calibrador espesímetro con una precisión de 0.01 mm (Digimatic Indicator ID-C, Mitutoyo Absolute 547-301, Japan) antes de la inyección y 24 horas después. La respuesta inmune mediada por células T se cuantificó como la diferencia en espesor del patagio al final del periodo de las 24 horas menos el espesor antes de la inoculación (ver Christe *et al.* 1999; Smits *et al.* 1999). Para más detalles sobre este procedimiento ver Navarro *et al.* 2003.

Se comprobó si las variables seguían una distribución normal, y se usaron en consecuencia tests paramétricos y no paramétricos para determinar si las diferencias entre los grupos eran estadísticamente significativas. Se usaron análisis de la varianza de medidas repetidas para comprobar los cambios en las variables reproductivas entre las primeras puestas y las puestas de reposición, teniendo en cuenta la dependencia de las medidas.

RESULTADOS

No se encontraron diferencias significativas entre las hembras de ambos grupos en medidas fenotípicas, fecha y tamaño de puesta antes del tratamiento, implicando que no hubo un sesgo no intencionado en la composición de las muestras (tabla 1). De cualquier modo, se usaron los valores fenotípicos en un análisis de la varianza para medidas repetidas con objeto de controlar cualquier variación antes del tratamiento entre los grupos.

Las hembras inyectadas con NDV tardaron significativamente más tiempo en producir una puesta de reposición que las hembras del grupo control, siendo la diferencia media entre tratamientos de unos 5 días o casi dos desviaciones estándar (Fig. 1A, tabla 2)

Tabla 1. Media (SD) de las variables fenotípicas y de otros parámetros de las hembras del grupo control y de las hembras del grupo experimental (NDV) antes del tratamiento, la fecha de la primera puesta (día 1 = 1 Marzo) y del tamaño de la misma.

TABLA 1	Tratamiento (NDV)	Control	Z (Mann-Witney U test)	p
Longitud ala	105.59 (2.24)	105.52 (2.07)	- 0.052	0.958
Longitud rectrices	60.00 (2.29)	59.64 (2.52)	- 0.556	0.579
Envergadura	282.90 (5.41)	283.02 (5.20)	- 0.211	0.833
Longitud pico	6.44 (0.35)	6.46 (0.44)	- 0.026	0.979
Longitud tarso	11.12 (0.27)	11.14 (0.39)	- 0.813	0.416
Longitud quilla	18.034 (0.695)	18.33 (0.84)	- 1.289	0.197
Peso corporal	16.00 (1.30)	16.39 (1.09)	- 0.807	0.444
Barras de crecimiento	19.22 (2.46)	19.02 (2.17)	- 0.165	0.869
Hematocrito (%)	49.412 (3.606)	50.071 (3.626)	- 0.599	0.570
Tamaño puesta	4.706 (0.686)	4.857 (0.363)	- 0.675	0.625
Fecha puesta	73.81 (26.99)	60.35 (13.10)	- 0.507	0.612

Figura 1A. Diagramas de caja del tiempo transcurrido (días) desde la retirada de la primera puesta hasta la puesta de reposición para las hembras del grupo experimental y del grupo control. Se indican los valores medios, desviación estándar y valores extremos.

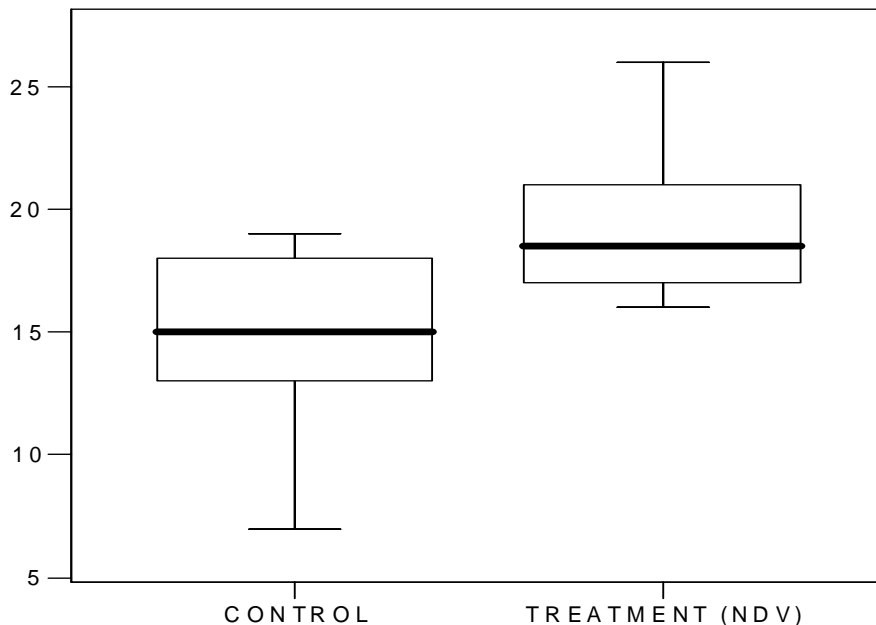


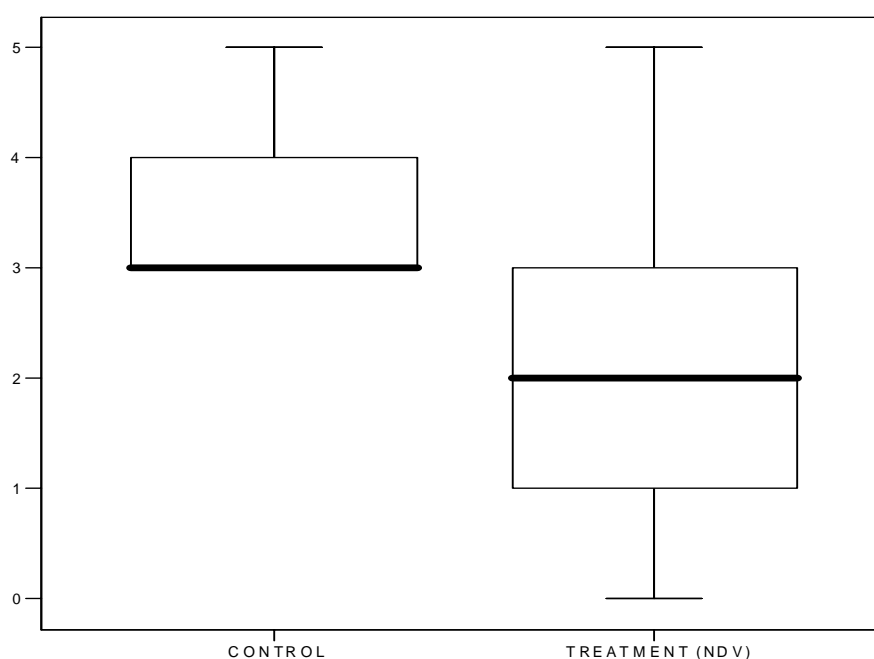
Tabla 2. Media (SD) de las variables reproductoras en las hembras del grupo control y en las hembras del grupo experimental (NDV)

TABLA 2	Tratamiento (NDV)	Control	Z (Mann-Witney U test)	p
Días entre puestas	19.36 (2.78)	14.64 (3.30)	- 3.814	0.001
Tamaño de nidada	2.41 (1.46)	3.36 (0.93)	-2.182	0.029
Éxito reproductor	0.56 (0.30)	0.83 (0.20)	-2.712	0.007

El tamaño de la puesta de reposición fue significativamente menor que el tamaño de la primera puesta en ambos grupos (tabla 3), aunque la diferencia entre ambos no fue estadísticamente significativa. De cualquier modo, las hembras control

tuvieron un número significativamente mayor de pollos que las hembras tratadas, con una diferencia en valores medios de casi un pollo o una desviación estándar (Figura 1B, tabla 2). Por tanto, el éxito reproductor estimado como el número de volantones dividido por el tamaño de puesta fue de media un 83% y significativamente mayor en el grupo control en comparación con la media del 56% en el grupo experimental (tabla 2).

Figura 1B. Diagramas de caja del número de pollos criados por las hembras del grupo experimental y las del grupo control. Se indican los valores medios, desviación estándar y valores extremos.



Las hembras control que tuvieron mayores tamaños de puesta también tuvieron significativamente mayores valores de hematocrito en la segunda captura que en la primera, pero este no fue el caso para las hembras del grupo experimental (Fig. 1C, tabla 3).

La masa corporal de las hembras disminuyó significativamente de la primera a la segunda captura en el grupo control, pero no se redujo en el grupo experimental (tabla 3). No hubo un descenso significativo en el número de ácaros de la pluma y la intensidad de infección de *Haemoproteus* entre capturas o tratamientos (tabla 3). No obstante, el número de malófagos de la pluma aumentó significativamente entre

capturas en el grupo experimental, pero no en las hembras del grupo control (Fig. 1D, tabla 3)

Figura 1C. Diagramas de caja del valor del hematocrito (%) para las hembras del grupo control y del grupo experimental. Se indican los valores medios, desviación estándar y valores extremos.

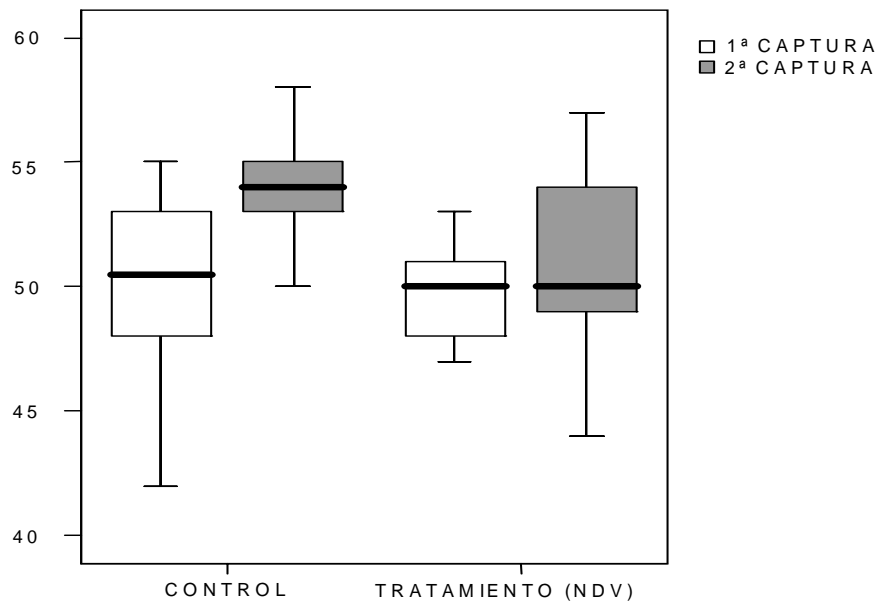


Figura 1D. Diagramas de caja de la abundancia de malófagos de la pluma de las hembras del grupo control y del grupo experimental. Se indican los valores medios, desviación estándar y valores extremos.

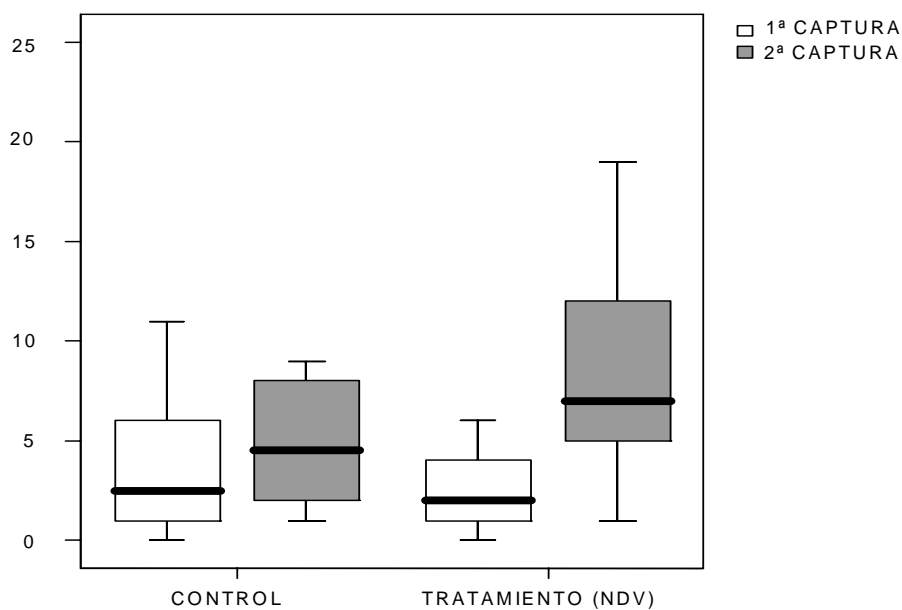
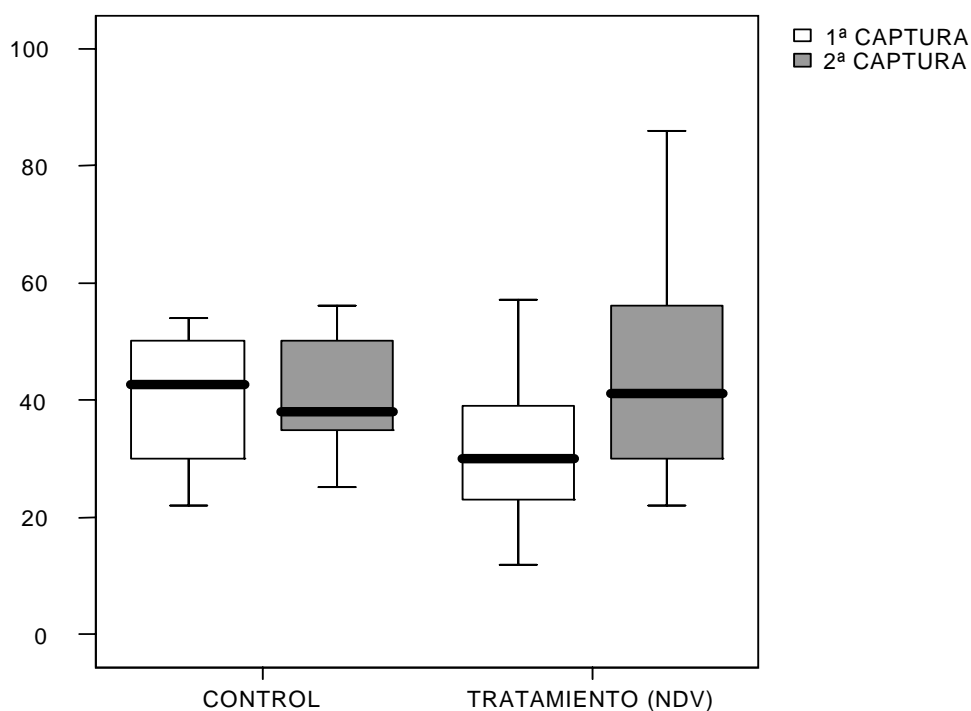


Tabla 3. Media (SD) en la primera puesta y en la puesta de reposición del tamaño de puesta, intensidad de infección de ácaros de la pluma, intensidad de infección de malófagos de la pluma, valor del hematocrito, intensidad de infección de parásitos sanguíneos y conteo leucocitario de las hembras del grupo control y las del grupo experimental (NDV)

TABLA 3	1ª puesta	Puesta reposición	z (test Wilcoxon)	de P
Tamaño puesta control	4.86 (0.36)	4.07 (0.83)	-2.50	0.013
Tamaño puesta NDV	4.71 (0.69)	4.29 (0.77)	-2.65	0.008
Ácaros control	5.50 (7.47)	12.07 (18.22)	-1.73	0.08
Ácaros NDV	13.00 (23.98)	15.18 (20.47)	-1.54	0.12
Malófagos control	4.79 (6.57)	4.86 (3.06)	-0.67	0.50
Malófagos NDV	4.29 (5.24)	8.77 (5.24)	-2.61	0.009
Hematocrito control (%)	50.07 (3.63)	53.21 (3.07)	-2.66	0.008
Hematocrito (%) NDV	49.41 (3.61)	51.06 (3.38)	-1.17	0.24
Peso (g) control	16.39 (1.10)	15.96 (1.10)	-2.36	0.018
Peso (g) NDV	16.00 (1.30)	15.74 (1.40)	-0.86	0.39
Intensidad <i>Haemoproteus</i> control	3.11 (10.10)	2.87 (4.14)	-1.79	0.07
Intensidad <i>Haemoproteus</i> NDV	0.84 (2.21)	1.44 (2.59)	-0.96	0.34
Leucocitos control	44.00 (18.46)	40.21 (9.07)	0.485	0.498
Leucocitos NDV	31.47 (13.46)	45.24 (18.07)	11.12	0.004

El conteo de leucocitos de las hembras que recibieron el tratamiento con NDV incrementó significativamente entre las capturas, pero no en las hembras del grupo control (Fig. 1E, Tabla3). Al introducir el tiempo transcurrido hasta la puesta de reposición como una covariable en un análisis de la covarianza, con el tratamiento como factor, comprobamos que aún se produjo un efecto significativo del tratamiento en el conteo de leucocitos ($F = 8.20$; $df = 1, 28$; $p = 0.008$)

Figura 1E. Diagramas de caja de la concentración de leucocitos para las hembras del grupo experimental (A) y del grupo control (B). Se indican los valores medios, desviación estándar y valores extremos.



No hubo diferencias significativas en la calidad de la descendencia entre los grupos. La longitud media del tarso, la masa corporal, el hematocrito y la respuesta inmune mediada por células T no difirió entre tratamientos (Tabla 4)

Tabla 4. Media (SD) del hematocrito, tamaño corporal, peso y respuesta inmune mediada por células T en los volantones

TABLA 4	Tratamiento	Control	Z (Mann-Witney U test)	P
Hematocrito pollos (%)	43.35 (4.42)	44.57 (2.74)	-0.795	0.444
Longitud tarso pollos (mm)	10.84 (0.48)	11.04 (0.45)	-1.628	0.109
Peso pollos (g)	20.28 (2.34)	21.11 (2.54)	-1.253	0.215
Respuesta inmune células T (mm)	113.44 (39.00)	133.51 (43.64)	-0.556	0.597

DISCUSIÓN

Los principales resultados de este estudio experimental sobre los costes de la respuesta inmune en las estrategias vitales fueron: (i) comprobar que el desarrollo de una respuesta inmune causa un retraso significativo en el comienzo de la puesta; (ii) una reducción en el balance del éxito reproductivo y (iii) un incremento en la infestación por malófagos de la pluma. Por el contrario, no hubo efectos del tratamiento experimental en la calidad fenotípica de los pollos, lo que sugiere que los costes de la inmunidad son pagados directamente por las hembras reproductoras. Discutiremos brevemente cada uno de estos puntos.

La enfermedad del virus de Newcastle (NDV) es muy frecuente en muchas especies de aves silvestres y domésticas, en las que provoca altas tasas de mortandad (Alexander 1997; Kuiken *et al.* 1998). La inoculación de la vacuna de NDV ocasiona la producción de una respuesta inmune específica y también de una respuesta inmune inespecífica, con un incremento exponencial de anticuerpos específicos que dura generalmente entre 7 y 10 días, pudiendo llegar hasta los 28 días tras la vacunación (Svensson *et al.* 1998; Saino *et al.* 2002; Rahman *et al.* 2004). En nuestro estudio no se cuantificaron directamente la concentración de anticuerpos específicos, pero si

encontramos que la concentración de leucocitos aumentó significativamente entre la primera captura, donde se inyectó el antígeno, y la segunda captura, cuando los pollos tenían 9 días de edad. Esta diferencia en los patrones temporales de incremento de leucocitos entre los tratamientos podría ser debida al retardo en la reproducción en las hembras del grupo experimental en referencia a las hembras del grupo control, pues las primeras fueron capturadas con la estación reproductora más avanzada. Dado que la abundancia de parásitos se incrementa a lo largo de la estación reproductora, deberíamos esperar que las hembras de Avión Común que crían más tarde estuviesen más expuestas a los parásitos y, por tanto, tuvieran mayores niveles de leucocitos circulando en su torrente sanguíneo. Dicho efecto ya ha sido descrito con anterioridad en el Avión Común (Christe *et al.* 2001). Sin embargo, al introducir en un análisis estadístico el tiempo transcurrido hasta la puesta de reposición, aún encontramos un efecto significativo del tratamiento en la concentración de leucocitos. Por tanto, esta diferencia entre tratamientos no puede ser considerada como un mero efecto de diferencias en el retardo entre los tratamientos, sino una respuesta fisiológica real con efecto a largo plazo debido a las diferencias en los costes de la inmunidad.

El cambio en el sistema inmune tras el NDV afectó al ritmo de reproducción al causar un retraso en el comienzo de la puesta en las hembras del grupo experimental. Se ha comprobado que muchas especies sufren un descenso muy acusado en el éxito reproductor conforme avanza la estación de cría, en particular aquellas con una única puesta por estación reproductora, ya que tienen que optimizar el momento de esa única puesta (Crick *et al.* 1993). En comparación, las especies con dos puestas tienden a realizar su primera puesta antes del pico estacional de máximo alimento, con la finalidad de optimizar tanto la primera como la segunda puesta (Crick *et al.* 1993). En este contexto, se han propuesto dos hipótesis para explicar las pautas del descenso estacional en la estación reproductora (Arnold *et al.* 2004). La hipótesis del ritmo (*timing hypothesis*) sugiere que el éxito reproductor desciende debido a factores asociados a la fecha de puesta como cambios en condiciones ambientales, reducción de la asincronía, y/o restricciones parentales resultado del menor valor reproductivo de los pollos criados en último lugar (Hatchwell 1991; Moreno 1998; Arnold *et al.* 2004). La hipótesis de la calidad parental (*parental quality hypothesis*) apunta que el éxito reproductivo desciende porque los individuos que crían más tarde son aquellos más jóvenes, con menos experiencia y/o de peor calidad que aquellos que tienen las puestas antes (Parson 1975; Hatchwell 1991; Brinkhoff *et al.* 1993). En nuestro estudio hemos

comprobado que existe un retraso en la reproducción debido al desarrollo de una respuesta inmune, y esta idea concuerda con la hipótesis del ritmo, ya que una variación en las condiciones ambientales reflejado en un cambio en la abundancia de parásitos (simulado en nuestro experimento mediante la activación del sistema inmune al azar en hembras adultas) provocó el retraso en el ritmo de la reproducción. Realmente en nuestro estudio no pudimos saber la edad exacta de los individuos, aunque se tuvo la precaución de que aquellos que se incluyeron en el mismo fueran los capturados por primera vez, evitando así los efectos de interacción con experimentos previos y minimizando los errores debidos a la diferencia de edad. Pudiera ser que aquellos que criaron más tarde fueran los más jóvenes, pero esta idea puede desecharse por lo avanzado de la estación y la sincronización de las puestas (prácticamente todos los individuos criaron a la vez), lo que de nuevo refuerza la primera hipótesis.

La activación del sistema inmune con la inyección de la vacuna de NDV no causó ningún efecto en el tamaño de puesta, pero sí un descenso significativo en el tamaño de nidada y en el éxito reproductor. Este efecto equivale a una diferencia en la variación estándar. El efecto global probablemente sea más fuerte que el indicado en las diferencias del tamaño de cría pues el momento de los volantones tuvo un desfase de 5 días de media entre las hembras tratadas experimentalmente y las hembras del grupo control, y esto podría acarrear un descenso en la futura viabilidad y eficacia biológica de los pollos criados más tarde (Brown y Brown 1999). Estas averiguaciones de los costes de la inmunidad en los hospedadores podrían explicar en parte los resultados encontrados en estudios anteriores sobre los efectos de los parásitos en el éxito reproductor del Avión Común (de Lope *et al.* 1993; Christie *et al.* 1999; Marzal *et al.* 2005). Obviamente, los hospedadores deberían contraer dichos costes sólo si pudieran lograr beneficios en la reducción de su eficacia biológica como consecuencia del parasitismo. De cualquier modo, esto no descarta la posibilidad de que una fracción de los costes del parasitismo sea debida a los efectos directos de los parásitos sobre los costes inmunológicos en el hospedador.

Investigamos los posibles efectos que pudiera causar el tratamiento experimental en tres especies diferentes de parásitos, utilizando para ello un potente diseño que nos permitiese utilizar a los individuos como sus propios controles. No encontramos evidencias que mostraran cambios significativos en la abundancia de ácaros de la pluma ni en la infección del parásito sanguíneo del género *Haemoproteus*, el más frecuente en este especie. Aun así, la abundancia de malófagos de la pluma incrementó

significativamente en las hembras a las que se les provocó la respuesta inmunológica, pero no en las hembras del grupo control. Este cambio podría ser debido a que las hembras del grupo experimental tendrían menos tiempo y energía para la limpieza e higiene de la pluma, tal y como apuntan estudios previos (Mooring 1995; Giorgi *et al.* 2001; ver revisión en Moore 2002). Este incremento en la abundancia de malófagos de la pluma podría tener efectos perjudiciales al causar menores prestaciones en el vuelo (Barbosa *et al.* 2003), lo que indirectamente influiría en la habilidad de las hembras en la captura de los insectos que les sirven de alimento y su posterior condición corporal.

Calculamos la calidad de la descendencia de las hembras tratadas experimentalmente y del grupo control, pero no encontramos ninguna diferencia fenotípica en la comparación. De cualquier modo, hubo un efecto muy claro del tratamiento en el éxito reproductor, lo que nos indica que la ausencia de cualquier efecto en la calidad de los volantones fue debida a la baja calidad de los pollos, que sufren una mortandad mucho mayor en el grupo experimental que en el grupo control. Los costes de la inmunidad podrían afectar a la calidad o la cantidad de los cuidados parentales, tal y como estudios previos han mostrado en otras especies (Ilmonen *et al.* 2000; Raberg *et al.* 2000). La estimulación del sistema inmune de las madres pudiera también afectar a la transferencia maternal de anticuerpos (Saino *et al.* 2000) y, de este modo, influir indirectamente en el desarrollo de los pollos. En nuestro estudio no pudimos estimar la cantidad de cuidado parental realizado por los padres, por lo que no podemos conocer con exactitud si el tratamiento experimental afectó al éxito reproductor a través de los efectos en el cuidado parental u otros mecanismos. Pero nuestras interpretaciones podrían sustentarse en el hecho que el hematocrito aumentó significativamente en las hembras control, pero no en las hembras inyectadas con la vacuna de NDV. Algunos estudios han demostrado que un aumento en el hematocrito es un indicador de mayores niveles de actividad (Christe *et al.* 1999; Sánchez-Guzmán *et al.* 2004), tal y como hemos visto en nuestro estudio durante el momento de cría de los pollos, donde los adultos aumentan la tasa de captura de insectos para alimentar a su prole.

En resumen, en este capítulo hemos mostrado que la inoculación de un antígeno novel a las hembras adultas de Aviión Común causó un retardo significativo en el tiempo de reproducción y un menor éxito reproductor. Estos resultados nos proporcionan pruebas evidentes de la existencia de costes de la inmunidad en las estrategias vitales de una especie colonial que sufre un fuerte impacto de los parásitos en su éxito reproductor.

REFERENCIAS

- Alexander, DJ (1997) Newcastle disease and other Avian Paramyxoviridae Infections. En: Diseases of Poultry, 10th ed. Editado por: B. W. Calnek, Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, pp. 541-582.
- Arnold JM, Hatch JJ, Nisbet ICT (2004). Seasonal declines in reproductive success of the common tern *Sterna hirundo*: timing or parental quality? J. Avian Biol. 35: 33-45.
- Baer, B & Schmid-Hempel, P. (1999): Experimental variation in polyandry affects parasite loads and fitness in a bumblebee. Nature 397, 151 – 154.
- Barbosa A, Merino S, Moller AP, de Lope F. (2003). Effects of feather lice on the flight behavior of male Barn swallows (*Hirundo rustica*). Auk 119(1) : 213-216
- Brinkhoff MWG, Cavé AJ, Perdeck AC (1993). Timing of reproduction and fledging success in the coot *Fulica atra*: evidence for a causal relationship. J. Anim. Ecol. 62: 577 – 587
- Brown CR, Brown MB (1999): Fitness components associated with laying date in the Cliff swallow. The Condor 101: 230 - 245
- Christe P, Møller AP, de Lope F (1998) Immunocompetence and nestling survival in the house martin: “The tasty chick hypothesis”. Oikos 83: 175-179
- Christe P, Møller AP, Saino N, de Lope F (2000) Genetic and environmental components of phenotypic variation in immune response and body size of a colonial bird, the house martin *Delichon urbica*. Heredity 85: 75-83
- Christe P, de Lope F, González G, Saino N, Møller A.(2001). The influence of environmental conditions on immune responses morphology and recapture probability of nestling house martins (*Delichon urbica*). Oecologia 126, 333-338
- Christe P, Møller AP, González G, de Lope F(2002). Intraseasonal variation in immune defence body mass and hematocrit in adult house martin *Delichon urbica*. Journal of Avian Biology 33: 321-325.
- Crick HQP, Gibbons DW, Magrath RD (1993). Seasonal changes in clutch size in British birds. J. Anim. Ecol. 62: 263 - 273
- de Lope F, Gonzalez G, Pérez J, Moller AP (1993). Increased detrimental effects of ectoparasites on their bird hosts during adverse environmental conditions. Oecologia 95:234-240.

-
- Freitak D, Ots I, Vanatoa, A, Hõrak P.(2003) Immune response is energetically costly in white cabbage butterfly pupae. Proceedings of the Royal Society of London Series B (Suppl.) 270: S220-S222
 - Giorgi MS, Arlettaz R, Christe P, Vogel P (2001). The energetic grooming costs imposed by a parasitic mite (*Spinturnix myotis*) upon its bat host (*Myotis myotis*). Proceedings of the Royal Society London Series B 268:2071–2075
 - Hatchwell BJ (1991): An experimental study of the effects of timing breeding on the reproductive success of common guillemots (*Uria aalge*). J. Anim. Ecol. 60: 721 - 736
 - Ilmonen P, Taarna T, Hasselquist D (2000). Experimentally activated immune defence in female pied flycatchers results in reduced breeding success. Proceedings of the Royal Society of London series B. 267:665-670.
 - Jacot A, Scheuber H, Brinkhof MW (2004) Costs of an induced immune response on sexual display and longevity in field crickets. Evolution Int J Org Evolution 58(10): 2280- 2286
 - Klasing KC (2004): The cost of immunity. Acta Zoologica Sinica 50 (6): 961 – 964
 - Kuiken T, Leighton FA, Wobeser G, Danesik KL, Riva J, Heckert RA (1998): An epidemic of Newcastle disease in double-crested cormorants from Saskatchewan. Journal of Wildlife Diseases 34(3): 457-471
 - Lochmiller RL, Deerenberg C (2000). Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? Oikos 88:87–98.
 - Marzal A, de Lope F, Navarro C, Moller AP (2005): Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. Oecología 142: 541-545.
 - Merino S, Potti J, Fargallo JA(1997). Blood parasites of some passerine birds from Central Spain. Journal of Wildlife Diseases 33: 638-641.
 - Merino S, Martínez J, Møller AP, Sanabria L, de Lope F, Pérez-Serrano J, Rodríguez-Caabeiro F (1999). Phytohemagglutinin injection assay and physiological stress in nestling house martin. Animal Behaviour 58: 219-222
 - Moller AP, Erritzoe J (1996). Parasite virulence and host immune defense: host immune response is related to nest reuse in birds. Evolution 50: 2066-2072.

-
- Møller AP, Merino S, Brown CR, Robertson RJ (2001) Immune defense and host sociality: A comparative study of swallows and martins. *Am. Nat.* 158:136 – 145
 - Moore J (2002). *Parasites and the behaviour of animals*. Oxford series in ecology and evolution. Oxford University Press, New York.
 - Mooring MS (1995): The effect of tick challenge on grooming rate by impala. *Anim. Behav.* 50: 377 - 392.
 - Moreno J (1998): The determination of seasonal declines in breeding success in seabirds. *Etología* 6: 17 – 31
 - Navarro C, Marzal A, de Lope F, Møller AP (2003) Dynamics of an immune response in house sparrow *Passer domesticus* in relation to time of day, body condition and blood parasite infection. *Oikos* 101: 291-298.
 - Ots I, Kerimov AB, Ivankina EV, Ilyina TA, Hõrak P (2001). Immune challenge affects basal metabolic activity in wintering great tits. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 268: 1475-1482
 - Pajuelo L, de Lope F, da Silva E (1992) Biología de la reproducción del avión común (*Delichon urbica*) en Badajoz, España. *Ardeola* 39: 15-23.
 - Parson J (1975). Seasonal variation in the breeding success of the Herring Gull: an experimental approach to pre-fledging success. *J. Anim. Ecol.*, 44: 553-573.
 - Raberg L, Grahn M, Hasselquist D, Svensson E (1998): On the adaptive significance of stress-induced immunosuppression. *Proc. R. Soc. Lond. B* 265, 1637-1641
 - Raberg L, Nilsson JA, Ilmonen P, Stjernman M, Hasselquist D (2000) The cost of an immune response: vaccination reduces parental effort. *Ecol. Lett.* 3: 382 - 386.
 - Rahman MB, Rahman MM, Rahman M, Kabir SML, Nazir KHMNH, Amin MM (2004): Efficacy of V₄HR Newcastle Disease (V₄HR-ND) Vaccine in Broiler Birds in Bangladesh. *International Journal of Poultry Science* 3(5): 365 – 368.
 - Saino N, Dall'Ara P, Martelli R, Møller AP (2002) Early maternal effects and antibacterial immune factors in the eggs, nestlings and adult of the barn swallow. *Journal of Evolutionary Biology* 15:735-743.

-
- Saino N, Romano M, Ferrari RP, Martinelli R, Møller AP (2003) Maternal antibodies but not carotenoids in barn swallow eggs covary with embryo sex. *J. evol. Biol.* 16:516-522
 - Sánchez-Guzmán JM, Villegas A, Corbacho C, Moran R, Marzal A, Real R (2004): Response of the haematocrit to body condition changes in Northern Bald Ibis *Geronticus eremita*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 139: 41 – 47.
 - Van Nouhuys S, Hanski I (2002). Colonization rates and distances of a host butterfly and two specific parasitoids in a fragmented landscape *J. Anim. Ecol* 71, 639–650
 - Smits J, Bortolotti G, Tella J (1999) Simplifying the phytohemagglutinin skin-testing technique in studies of avian immunocompetence. *Funct. Ecol.* 13: 567–572
 - Svensson E, Raberg L, Koch C, Hasselquist D(1998) Energetic stress, immunosuppression and the costs of an antibody response. *Funct. Ecol.* 12: 912 – 919
 - Wakelin D (1996) *Immunity to parasites: How parasitic infections are controlled.* Cambridge University Press, Cambridge

Capítulo IV

Costes inmunológicos de la deposición de andrógenos en la yema.

FEMALE HOUSE MARTINS (*Delichon urbica*) REDUCE EGG ANDROGEN DEPOSITION IN RESPONSE TO A CHALLENGE OF THEIR IMMUNE SYSTEM.

Behavioural Ecology Sociobiology(2005) aceptado

Abstract

Female birds deposit in the yolks of eggs substantial amounts of androgens, such as testosterone and androstenedione. These androgens have been shown to speed up nestling development, induce a fast development of ornaments and increase dominance in adults. Experiments in several species have reported that females invest greater amounts of androgens in the eggs fathered by attractive males, suggesting that yolk androgen is a costly investment for either the offspring or the mother. There is some evidence that nestling immunocompetence may be partially suppressed by high levels of yolk androgens, but it is not known whether this is also the case for females. We tested this hypothesis in the house martin by inducing an immune challenge through an injection of sheep red blood cells (SRBC). Experimental birds laid eggs with lower amounts of yolk androstenedione than controls, and there was a similar non significant trend for testosterone. Furthermore, the probability of laying a replacement clutch was higher for birds that had laid a first clutch with relatively high levels of yolk testosterone. These results suggest that yolk androgen deposition is limited by immune costs in the female, and that only females in good condition may afford to invest higher levels of androgen in eggs.

INTRODUCCIÓN

Los efectos maternos están recibiendo en los últimos años un especial interés como un mecanismo muy poderoso que puede ser utilizado para promover la adaptación a las complejas y cambiantes condiciones ambientales (Mousseau y Fox 1998). Desde el descubrimiento de los andrógenos en los huevos de las aves por Schwabl (1993), un gran número de investigaciones ha encontrado que pequeñas diferencias en la cantidad de andrógenos de la yema pueden tener efectos muy importantes en el desarrollo futuro del ave. Estos efectos comenzarían desde el inicio del desarrollo, donde se ha encontrado que niveles elevados de andrógenos en los huevos tendrían como resultado periodos de incubación más cortos y un mejor crecimiento del embrión (Schwabl 1996b; Lipar & Ketterson 2000; Eising *et al.* 2001). Esto conduce a una cascada de efectos entre los que se incluyen un incremento en la petición de alimento, un desarrollo más rápido de los ornamentos sexuales y una mayor dominancia jerarquía social (Schwabl 1993; Eising & Groothuis 2003; Strasser & Schwabl 2004).

A pesar de estos claros beneficios, no todas las hembras tienen puestas que contienen niveles elevados de andrógenos (e.g. Pilz *et al.* 2003). Más aún, estudios experimentales en tres especies diferentes de aves mostraron que las hembras no siguen el mismo patrón de distribución de andrógenos en los huevos al emparejarse con machos atractivos (Gil *et al.* 1999; Gil *et al.* 2004; Tanvez *et al.* 2004; Gil *et al.* 2005). Estos resultados sugieren que los niveles elevados de andrógenos en la yema deben acarrear alguno tipo de coste, tanto para la descendencia como para la hembra (Gil 2003). Así, un estudio reciente ha encontrado que los pollos nacidos de huevos a los que se les inyectó testosterona tuvieron una respuesta inmune celular reducida (Groothuis *et al.* 2005). De cualquier modo, no tenemos conocimiento de ningún estudio hasta el momento que indique que los costes sean pagados por la hembra. Esta hipótesis es ciertamente probable, dado que elevados niveles de andrógenos podrían ser inmunosupresivos para la hembra (Duffy y Ball 2002).

Nuestro objetivo en este estudio es comprobar esta hipótesis, mediante una manipulación experimental del sistema inmune con la inoculación de eritrocitos de carnero (SRBC), y comparando los niveles de andrógenos en la puesta de las hembras manipuladas con aquellos de puestas pertenecientes al grupo control.

MATERIALES Y MÉTODOS

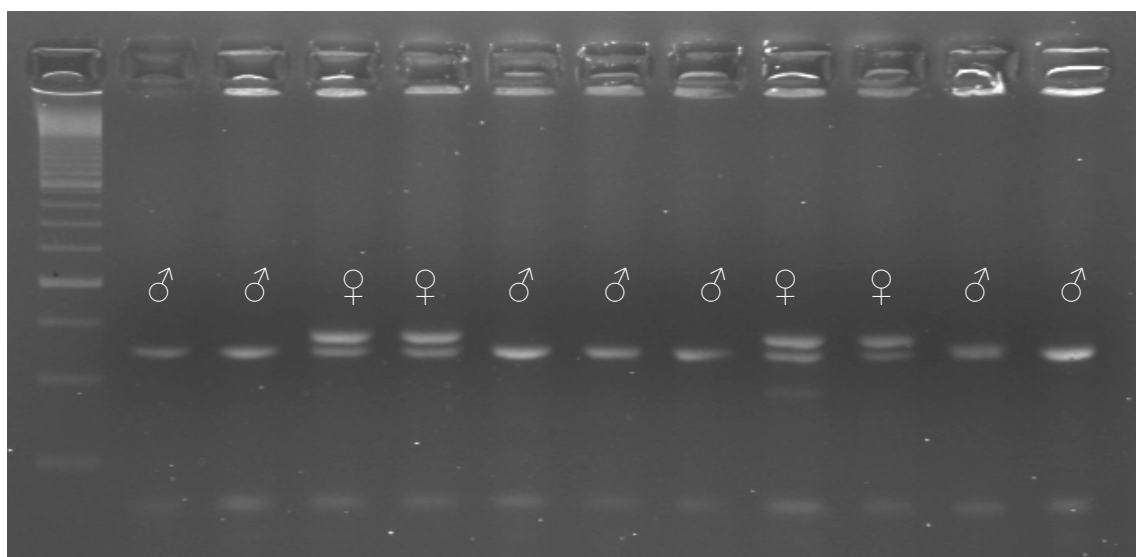
El estudio se llevó a cabo en la colonia de Avión Común cercana a la Universidad de Extremadura (Badajoz). Los nidos fueron revisados cada 2 días desde principios de febrero con objeto de marcar diariamente con tinta indeleble los huevos nuevos que se iban encontrando en las puestas. Las hembras fueron capturadas en sus nidos al amanecer en el cuarto día de la incubación (media = 3.77, SD = 1.13) e inyectadas subcutáneamente con 0.1 ml de una solución al 5% de SRBC a las hembras del grupo experimental, o el mismo volumen de tampón fosfato salino a las hembras del grupo control. La cantidad de SRBC administrada a las hembras es similar a la utilizada en otros estudios con esta especie (Moller *et al.* 2001). A continuación la puesta fue retirada y almacenada para su posterior estudio. Se prosiguió con la revisión de los nidos en espera de poder recolectar las puestas de reposición tras un periodo de incubación similar a las primeras puestas (media = 3.96, SD = 0.71).

Los huevos fueron congelados a -20°C hasta su disección. Para permitir una buena separación de la yema y el embrión, esta se llevó a cabo manteniendo los huevos a temperatura de congelación. Las yemas se pesaron y los esteroides fueron extraídos añadiendo 3 ml de dietil éter a las muestras, introduciéndolas posteriormente en el vórtex, centrifugándolas y decantando la fase de éter tras la separación mediante snap-freezing en un baño de etanol a -20°C . La fase de éter se evaporó bajo un flujo de nitrógeno y disuelto en un volumen fijo de PBS. A continuación se utilizaron kits comerciales de radioinmuno ensayo (RIA) con el radioisótopo marcador I^{125} para el ensayo de las muestras (DSL Labs, USA). Estos equipos tienen anticuerpos con una alta especificidad de reconocimiento de las hormonas (100%) y una baja reactividad cruzada con otras hormonas. Los casos citados de reactividad cruzada con el kit de androstenodiona fueron menores del 1% para todas las hormonas probadas, y menores del 5% en el caso del kit de testosterona (excepto la $5\alpha\text{-DHT}$ que fue del 5.8%). El coeficiente de variación intra-ensayo fue de 5.4 para la testosterona y de 6.8 para la androstenodiona. El coeficiente de variación inter-ensayo fue 13.3 para la testosterona y de 8.85 para la androstenodiona.

El sexo de los embriones se determinó por amplificación mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de fragmentos del gen CHD, localizado en los cromosomas sexuales de las aves. Las copias del gen localizadas en los cromosomas Z y W presentan diferencias de secuencia que permiten su distinción mediante diversos

métodos; en nuestro caso, siguiendo el procedimiento descrito por Griffiths *et al.* (1998). El ADN se extrajo utilizando la resina Chelex® 100 (Bio-Rad Laboratories, CA), un método rápido y eficaz usado en diversos estudios anteriores (Walsh *et al.* 1991; Vigilant 1999). Para la identificación de los sexos se emplearon los primers P8 (5'-CTCCAAGGATGAGRAAYTG-3') y P2 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3') (Griffiths *et al.* 1998). La amplificación de la PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25 μ l, con las siguientes condiciones finales: 20 μ l ddH₂O (Sigma, St Louis, Mo); 2.5 μ l of Taq ADN polimerasa 10X buffer (Promega), 50 mM de cada dNTP; 100 ng de cada primer y 0.5 unidades de Taq polimerasa (Promega). Entre 50 y 250 ng de ADN se usaron como molde. Al final de la adición de todos los componentes de la PCR se añadieron 2 μ l de aceite mineral para evitar la evaporación de los mismos durante el desarrollo de los ciclos en el termociclador Intelligent Heating Block (Cherlyn Electronics Ltd). El primer paso fue una desnaturalización a 94°C durante 5 min, seguida de una hibridación a 55°C durante 2 min y una extensión a 72°C durante 5 min. Posteriormente se repitieron 35 ciclos de 94°C durante 1 min, 55°C durante 2 min y 72°C durante 5 min. El último paso fue a 72°C durante 7 min para completar el programa. Los productos resultados de la PCR fueron separados mediante electroforesis durante 105 minutos con un voltaje de 50 V en un gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio, y revelados en un documentador de geles.

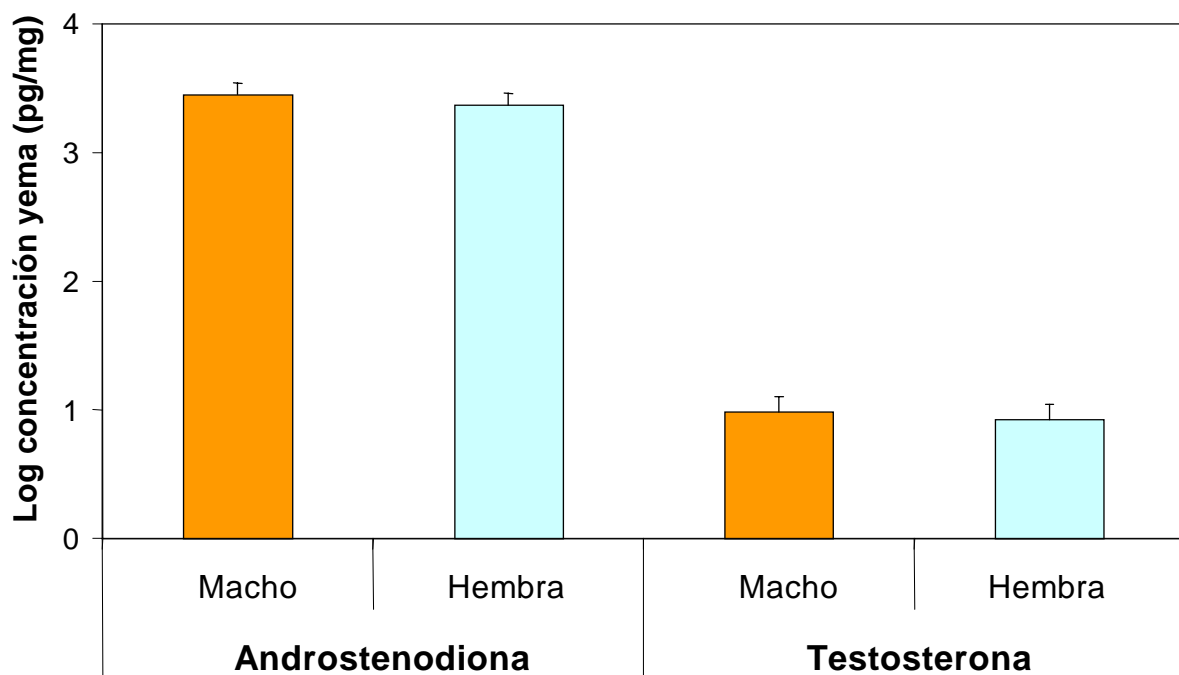
Fig. 1 Revelado de producto de la PCR en gel de agarosa al 3% mediante un documentador de geles.



RESULTADOS

Ejecutamos varios modelos exploratorios para valorar las fuentes de la varianza no controladas en la concentración de los andrógenos de los huevos, tomando la nidada como un factor aleatorio, e incluyendo al sexo de los embriones y el orden de puesta, así como su interacción, como factores fijos. Ni el sexo, ni el orden de puesta, ni su interacción fueron significativos: Los huevos pertenecientes a embriones machos y hembras tuvieron cantidades similares de andrógenos (log T: $F_{1,64.9} = 0.54$, $P = 0.46$; log A4: $F_{1,65.1} = 1.49$, $P = 0.22$; Fig. 2).

Fig. 2 El sexo del embrión no influye en la composición de andrógenos de la yema. El gráfico muestra la media de mínimos cuadrados y el error estándar.



Ambos andrógenos se incrementaron con el orden de puesta (log T: $F_{1,63.3} = 11.7$, $P < 0.001$, estimate (SE) = 0.11 (0.03); log A4: $F_{1,63.4} = 7.26$, $P < 0.01$, estimate (SE) = 0.06 (0.02)) El efecto del orden de puesta puede verse alterado por un periodo de incubación distinto, dado que las hembras generalmente comienzan la incubación antes de la puesta del último huevo y se ha comprobado que la concentración de andrógenos decrece con

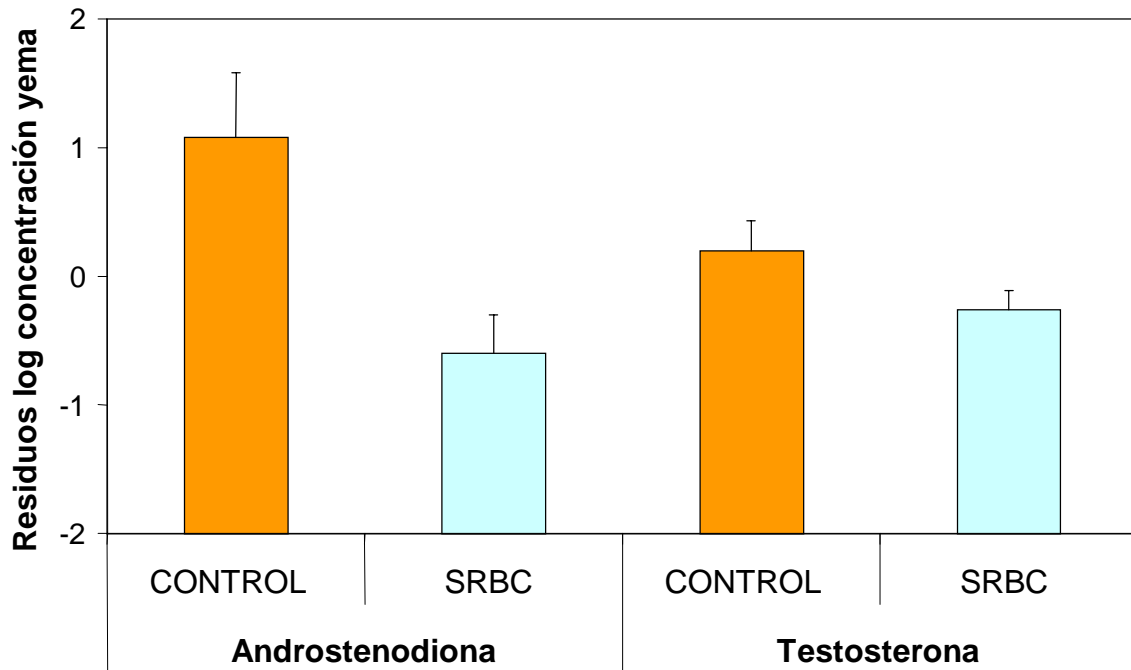
el tiempo de incubación, probablemente debido a una mezcla del albumen y la yema (Elf & Fivizzani 2002; Pilz *et al.* 2005). Por tanto, en posteriores análisis se tomaron los logaritmos de las concentraciones medias de los andrógenos de cada hembra de los residuos de las regresiones del orden de puesta para controlar las diferencias en el periodo de incubación. Los resultados no varían si usamos en su lugar los datos en bruto.

Las hembras inoculadas con SRBC hicieron una puesta de reposición al igual que las hembras del grupo control (SRBC: 0.39% vs. PBS: 0.55%; $\chi^2 = 0.98$, $df = 1$, $P = 0.321$). Se utilizó una regresión logística paso a paso tomando las concentraciones de los dos andrógenos como predictores de la probabilidad de realizar una puesta de reposición, mostrando que las hembras que realizaron una puesta de reposición tuvieron niveles de testosterona en las yemas de su primera puesta significativamente mayores que las hembras que no hicieron una puesta de reposición ($\chi^2 = 6.59$, $df = 1$, $P < 0.05$). Los valores de androstenodiona no se tuvieron en cuenta en el modelo final.

Los resultados también mostraron una gran repetitibilidad en la concentración de testosterona en la yema entre la primera y segunda puesta ($r_p = 0.65$, $n = 16$, $P < 0.01$), pero no en las concentraciones de androstenodiona ($r_p = 0.07$, $n = 16$, $P = 0.87$).

Nuestra principal predicción era que la concentración de andrógenos en la yema en las puestas de reposición debería ser menor en las hembras inyectadas con SRBC que en las hembras control. Se realizó un modelo lineal general para las concentraciones de testosterona y androstenodiona, tomando el tratamiento como un factor principal. En el caso de las concentraciones de testosterona añadimos las concentraciones de la primera puesta como covariable para corregir las diferencias en la probabilidad de reposición. Encontramos que las hembras inyectadas con SRBC pusieron huevos con menores niveles de androstenodiona que las hembras del grupo control ($F_{1,12} = 6.57$, $P < 0.05$; Fig. 3). No encontramos las mismas diferencias en las concentraciones de testosterona, aunque la tendencia fue similar ($F_{1,12} = 2.55$, $P = 0.13$; Fig. 3)

Fig. 3 Diferencias entre grupos en la concentración de andrógenos en la yema en las puestas de reposición. Se muestran las medias de los residuos de las concentraciones, incluyendo el error estándar.



DISCUSIÓN

Encontramos que las hembras a las que se les indujo experimentalmente una respuesta inmune mediante la inyección con SRBC pusieron huevos con menor contenido en androstenediona que las hembras del grupo control. En el caso de las concentraciones de testosterona en los huevos las hembras siguieron un patrón similar, si bien este no fue estadísticamente significativo. Dado que la inyección con SRBC induce una respuesta inmune costosa en términos energéticos que invierte recursos que podrían ser destinados a otras funciones del organismo, aumentando la tasa metabólica y disminuyendo la condición corporal (Ots *et al.* 2001), nuestros resultados sugieren que la distribución de los andrógenos de los huevos es muy costosa y constituye una inversión directamente dependiente de la condición corporal. Más aún, de acuerdo con esta conclusión, encontramos que la posibilidad de realizar una puesta de reposición

está relacionada de forma directa con los niveles de testosterona en la primera puesta, tal y como debiéramos esperar en caso de que la deposición de andrógenos en la yema fuera un rasgo dependiente de la condición corporal.

Los andrógenos de la yema son transferidos desde la madre hasta el huevo (Schwabl 1993), donde modulan el desarrollo del embrión (Lipar y Ketterson 2000), pudiendo tener consecuencias perdurables en el tiempo en el comportamiento de los pollos, e incluso cuando estos alcancen la edad adulta. Los pollos nacidos de huevos manipulados experimentalmente con concentraciones elevadas de andrógenos tuvieron una actitud de petición de alimento más intensa y menores períodos de incubación (Schwabl 1996b; Eising & Groothuis 2003), aunque los efectos beneficiosos de esta etapa podrían ser más relevantes en situaciones de fuerte competencia por el alimento (Pilz *et al.*, 2004). Cuando alcanzan la edad adulta esos pollos tienen mayor probabilidad de alcanzar un status dominante en la jerarquía (Schwabl 1993), y desarrollar los ornamentos sexuales más rápidamente que los controles (Strasser & Schwabl 2004).

Se ha comprobado en diversos estudios que, de acuerdo con la teoría de las estrategias vitales (Burley 1988), las hembras invierten mayores niveles de andrógenos cuando se emparejan con machos más atractivos (Gil *et al.* 1999; Gil *et al.* 2004; Tanvez *et al.* 2004; Gil *et al.* 2005). Este patrón de inversión diferencial sugiere que las hembras obtienen beneficios indirectos a partir de su descendencia (Sheldon 2000), pero también que una gran inversión elevada en andrógenos ha de ser costosa de una u otra manera (Gil 2003). Estos costes pueden ser identificados de, al menos, tres maneras: (1) niveles altos de andrógenos en la yema pueden resultar costosos a la descendencia, por ejemplo debilitando su sistema inmune. Recientemente se han mostrado evidencias que apoyan este punto, como una respuesta inmune mediada por células T reducida en huevos de gaviota reidora (*Larus ridibundus*) a los que se les elevó experimentalmente su concentración de andrógenos (Groothuis *et al.* 2005); (2) pudiera ocurrir también que los niveles óptimos de andrógenos fueran diferentes para los pollos hembras y machos, limitando así la capacidad de determinar una sex ratio óptima (Saino *et al.* enviado); y (3) la distribución de niveles elevados de andrógenos puede ser costosa para las hembras. Nuestro estudio aporta resultados conformes a este tercer tipo de coste.

Los niveles de andrógenos se incrementan en las hembras durante el periodo de puesta (Schwabl *et al.* 2005), como consecuencia de la gran producción de andrógenos que tiene lugar en los folículos de desarrollo (Staub & De Beer 1997; Johnson 1999).

Un estudio experimental realizado en el canario *Serinus canaria* ha mostrado que los niveles de testosterona en el plasma de las hembras son reflejo de la producción de andrógenos de la yema (Schwabl 1996a), sugiriendo que las hembras que ponen huevos con niveles altos de testosterona también tienen elevados niveles de testosterona en su plasma. Con relación a este punto, estudios comparativos han revelado que las hembras de especies coloniales ponen huevos con mayores cantidades de andrógenos (Gil *et al.* unpublished manuscript), y también tienen mayores niveles de hormonas en su torrente circulatorio (Møller *et al.* 2005). Dado que se ha demostrado que grandes niveles de andrógenos pueden reducir la respuesta inmune tanto en machos como en hembras (Folstad & Karter 1992; Verhulst *et al.* 1999; Duffy *et al.* 2000), nuestros resultados sugieren que la respuesta inmune frente a la inyección de SRBC interfirió con la producción de andrógenos en los individuos manipulados experimentalmente. Esto podría haber resultado en la reducción de la cantidad de andrógenos encontrados en las yemas de los huevos puestos por esas hembras.

De cualquier modo, resultados aportados por otros estudios hacen pensar en una compleja relación entre costos, beneficios e inversión de andrógenos en la yema. Por ejemplo, se ha visto que su inoculación en el Cernícalo Americano *Falco sparverius* incrementa la mortalidad de los pollos (Sockman & Schwabl 2000). Este resultado sugiere que los beneficios de los niveles elevados de andrógenos pueden depender de la calidad fenotípica o genotípica de la descendencia. En línea con esta idea, también pudiera ocurrir que el nivel óptimo de andrógenos fuera diferente para cada sexo (Saino *et al.* submitted). Además, dos estudios diferentes de alimentación suplementaria han mostrado que las hembras a las que se les incrementó el alimento no aumentaron sus niveles de andrógenos en las yemas en lo esperado, tal y como debería haber sido si esta distribución se viese afectada por recursos limitados (Verboven *et al.* 2003; Gil *et al.* enviado). En conjunto, todas estas evidencias muestran que este efecto maternal sigue una compleja regulación de costos y beneficios, en el que la máxima de “cuanto más, mejor” no puede ser aplicada en este caso. En otras palabras, no es correcto considerar a los andrógenos de la yema como cualquier otro recurso presente en el huevo, sino más bien como un agente capaz de modificar el fenotipo sujeto a costos y beneficios que muestra diferencias de una generación a otra.

REFERENCIAS

- Burley N (1988) The differential-allocation hypothesis: an experimental test. *American Naturalist*, 132, 611-628
- Duffy DL, Ball GF (2002) Song predicts immunocompetence in male European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 269, 847-852
- Duffy DL, Bentley GE, Drazen DL, Ball GF (2000) Effects of testosterone on cell mediated and humoral immunity in non-breeding adult European starlings. *Behavioral Ecology*, 11, 654-662
- Eising CM, Eikenaar C, Schwabl H, Groothuis TGG (2001) Maternal androgens in black-headed gull (*Larus ridibundus*) eggs: consequences for chick development. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 268, 839-846
- Eising CM, Groothuis TGG (2003) Yolk androgens and begging behaviour in black-headed gull chicks: an experimental field study. *Animal Behaviour*, 66, 1027-1034
- Elf PK, Fivizzani AJ (2002) Changes in sex steroid levels in yolks of the Leghorn chicken, *Gallus domesticus*, during embryonic development. *Journal of Experimental Zoology*, 293, 594-600
- Folstad I, Karter AJ (1992) Parasites, bright males, and the immunocompetence handicap. *American Naturalist*, 139, 603-622
- Gil D (2003) Golden eggs: maternal manipulation of offspring phenotype by egg androgen in birds. *Ardeola*, 50, 281-294
- Gil D, Gasparini J, Gill VA, Hatch SA, Rocha M, Boulinier T, Puerta M (en revisión) Positive correlation between egg androgens and immunoglobulins in the black-legged kittiwake (*Rissa tridactyla*).
- Gil D, Graves JA, Hazon N, Wells A (1999) Male attractiveness and differential testosterone investment in zebra finch eggs. *Science*, 286, 126-128
- Gil D, Leboucher G, Lacroix A, Cue R, Kreutzer M (2004) Female canaries produce eggs with greater amounts of testosterone when exposed to preferred male song. *Hormones and Behavior*, 45, 64-70

-
- Gil D, Ninni P, Lacroix A, de Lope F, Tirard C, Marzal A, Møller AP (2005). Yolk androgens in the barn swallow (*Hirundo rustica*): a test of some adaptive hypotheses. *Journal of Evolutionary Biology*
 - Griffiths R, Double MC, Orr K, Dawson RJG (1998). A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology*, 7, 1071-1075
 - Groothuis TGG, Eising CM, Dijkstra C, Müller W (2005). Balancing between costs and benefits of maternal hormone deposition in avian eggs. *Biology Letters*, 1, 78-81
 - Johnson AL (1999) Reproduction in the female. In: *Avian Physiology* (ed. Whittow GC), pp. 569-596. Academic Press, New York
 - Lipar JL, Ketterson ED (2000) Maternally derived yolk testosterone enhances the development of the hatching muscle in the red-winged blackbird *Agelaius phoeniceus*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 267, 2005-2010
 - Møller AP, Merino S, Brown CR, Robertson RJ (2001): Immune defence and host sociality: a comparative study of swallows and martins. *The American Naturalist* 158: 136 - 145
 - Møller AP, Garamszegi LZ, Gil D, Hurtrez-Bousses S, Eens M (2005) Correlated evolution of male and female testosterone profiles in birds and its consequences. *Behavioral Ecology and Sociobiology*
 - Mousseau TA, Fox CW (1998). *Maternal Effects as Adaptations*. Oxford University Press, New York.
 - Ots I, Kerimov AB, Ivankina EV, Ilyina TA, Horak P (2001) Immune challenge affects basal metabolic activity in wintering great tits. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 268, 1175-1181
 - Pilz KM, Adkins-Regan E, Schwabl H (2005) No sex difference in yolk steroid concentrations of avian eggs at laying. *Biology Letters*
 - Pilz KM, Quiroga M, Schwabl H, Adkins-Regan E (2004) European starling chicks benefit from high yolk testosterone levels during a drought year. *Hormones and Behavior*, 46, 179-192
 - Pilz KM, Smith HG, Sandell MI, Schwabl H (2003) Interfemale variation in egg yolk androgen allocation in the European starling: do high-quality females invest more? *Animal Behaviour*, 65, 841-850

-
- Saino N, Ferrari RP, Romano M, Martinelli R, Lacroix A, Gil D, Møller AP (enviado). Maternal allocation of androgens and antagonistic effects of yolk androgens on sons and daughters.,
 - Schwabl H (1993) Yolk is a source of maternal testosterone for developing birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 90, 11446-11450
 - Schwabl H (1996a) Environment modifies the testosterone levels of a female bird and its eggs. *Journal of Experimental Zoology*, 276, 157-163
 - Schwabl H (1996b) Maternal testosterone in the avian egg enhances postnatal growth. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 114A, 271-276
 - Schwabl H., Flinks H. & Gwinner E. (2005) Testosterone, reproductive stage, and territorial behavior of male and female European stonechats *Saxicola torquata*. *Hormones and Behavior*, 47, 503-512
 - Sheldon BC (2000) Differential allocation: tests, mechanisms and implications. *Trends in Ecology and Evolution*, 15, 397-402
 - Sockman KW, Schwabl H (2000) Yolk androgens reduce offspring survival. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 267, 1451-1456
 - Staub NL , de Beer M (1997) The role of androgens in female vertebrates. *General and Comparative Endocrinology*, 108, 1-24
 - Strasser R, Schwabl H (2004) Yolk testosterone organises behavior and male plumage coloration in house sparrows (*Passer domesticus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 56, 491-497
 - Tanvez A, Béguin N, Chastel O, Lacroix A, Leboucher G (2004) Sexually attractive phrases increase yolk androgen deposition in canaries (*Serinus canaria*). *General and Comparative Endocrinology*, 138, 113-120
 - Verboven N, Monaghan P, Evans DM, Schwabl H, Evans N, Whitelaw C, Nager RG (2003) Maternal condition, yolk androgens and offspring performance: a supplemental feeding experiment in the lesser black-backed gull (*Larus fuscus*). *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 270, 2223-2232
 - Verhulst S, Dieleman SJ, Parmentier HK (1999) A tradeoff between immunocompetence and sexual ornamentation in domestic fowl. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 96, 4478-4481

-
- Vigilant L (1999): An Evaluation of Techniques for the Extraction and Amplification of DNA from Naturally Shed Hairs. *Biol. Chem.* Vol. 380: 1329 – 1331.
 - Walsh PS, Metzger DA, Higuchi, R (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10, 506 – 513.

Capítulo V

El parasitismo como un síntoma del envejecimiento: un estudio comparativo en hirundínidos

ECOLOGICAL INTERACTIONS AMONG PROTOZOAN PARASITES AND THEIR AVIAN HOSTS: AN APPROACH (2005)

En “RECENT RESEARCH DEVELOPMENTS IN MULTIDISCIPLINARY APPLIED MICROBIOLOGY” (aceptado)

Abstract

Senescence is the progressive loss of functionality accompanied by fertility decreasing and increasing in risk of mortality as time goes by. Immune system deteriorates as ageing, so it could cause an ability reduction to fight against parasites and to prevent diseases. That is the reason why parasitism has been supposed to be involved in the expression of the senescence. Several studies have shown that immune function declines with age in humans and captive animals, but little is known about whether immune function deteriorates with age in natural populations due to the impossibility to study the same individual consecutive years.

In this study we made a comparative test for prevalence of malarial infection (*Trypanosoma* and *Haemoproteus*) between two avian species, capturing the same individual every year. We show that protozoan parasites are related to the expression of their hosts' senescence in three natural populations of two different avian species (*Delichon urbica* and *Hirundo rustica*), because immune system declines with age at the same time that prevalences and intensities of blood parasites infection increase as a consequence of this immune deterioration. The most prevalence of infection happens at three years old individual, and decreases in older birds. It could be because these older birds had no previous exposition to infection, or because they have a strong immune system to fight against parasites.

INTRODUCCIÓN

El envejecimiento es un proceso, continuo e irreversible, de cambios graduales con el paso de los años. Habitualmente se utiliza como sinónimo de senescencia, si bien el Manual de Gerontología de Merck (2000) define el envejecimiento como un “proceso de cambio gradual y espontáneo que resulta en la maduración, a través de la infancia, pubertad y adolescencia, para después descender en la edad madura”, mientras que ve a la senescencia como el “proceso de pérdida de capacidad de división celular, crecimiento y funcionalidad con el paso del tiempo y que en último término conduce a la muerte” (ver Beers y Berkow 2000). Así, de forma general se habla de componentes positivo en la vejez como la sabiduría y experiencia, pero la senescencia únicamente nos trae la idea del proceso degenerativo que termina con la muerte. A pesar de todo, ambos términos se usan habitualmente como sinónimos, ya que la senescencia conduce al envejecimiento y es su causa fundamental, aunque no todos los efectos del envejecimiento puedan ser atribuidos a la senescencia (de Magalhães 2003, 2005).

Pero, ¿cuáles son las causas del envejecimiento? Desde hace mucho tiempo se han propuesto muchas teorías, pero aún no hay una respuesta clara y definitiva (ver revisión en Barja 1998, tabla 1)

Tabla 1. Teorías del envejecimiento y senescencia (tomado de Barja 1998)

-
1. TEORÍAS ORGÁNICAS
 - Inmunitaria
 - Neuroendocrina
 2. TEORÍAS CELULARES
 - Límite de la duplicación celular
 3. TEORÍAS MOLECULARES
 - Acumulación de residuos
 - Entrecruzamientos entre macromoléculas
 - Mutaciones somáticas
 - Errores catastróficos
 - Metabólica
 - Glucooxidación
 - Radicales libres
 4. TEORÍAS DE ENVEJECIMIENTO PROGRAMADO
 - Programa genético de envejecimiento
 5. TEORÍAS EVOLUTIVAS
 - Distribución de energía entre esfuerzo reproductivo y mantenimiento
 - Intensidad de predación
 - Teorías pleitrópicas
-

Según Fisher (1930) la senescencia es el descenso, dependiente de la edad, del valor reproductivo residual en especies con separación de la línea germinal y somática, asociado normalmente a un deterioro del fenotipo y a un aumento de la tasa de mortalidad. Por ello, el declive de las funciones fisiológicas asociado a la edad resulta en un incremento en la tasa de mortalidad (Finch 1990; Holmes y Austad 1995).

Ricklefs (2000) propone dos hipótesis para explicar la senescencia. En primer lugar, el deterioro fisiológico que acompaña a la vejez podría incrementar la vulnerabilidad de los organismos a los mismos factores extrínsecos que pueden causar la muerte en otras edades, como predación, enfermedades contagiosas y estrés asociado al ambiente. La segunda hipótesis plantea que la senescencia pueda ser reflejo de un incremento asociado a la edad de causas intrínsecas de muerte (enfermedades vasculares, cáncer, enfermedades autoinmunes y daños genéticos acumulados) que matan al individuo más o menos independientemente del medio externo. Así, la mortalidad extrínseca ha sido considerado como el factor clave que determina cómo la selección natural moldea la mortalidad intrínseca (Abrahams 2004)

Varias especies de animales han figurado de manera prominente en la investigación del envejecimiento (Sprott y Austad 1996). Muchos de estos estudios se han centrado en las bases genéticas del envejecimiento y en una mayor comprensión de los caminos que regulan la tasa de envejecimiento, creando un nuevo marco para el estudio de las enfermedades relacionadas con la senescencia (Rogina *et al.* 2000; Reedy *et al.* 2004). Los investigadores han identificado los genes animales que influyen en la esperanza de vida, alguno de los cuales modifican el proceso de la senescencia en conjunto (Lin *et al.* 2004), mientras que otros actúan modelando la expresión de enfermedades asociadas a la vejez (Guenette & Tanzi 1999; Eslamboli *et al.* 2005).

Con unas pocas excepciones, las aves presentan longevidades llamativamente superiores comparadas con los mamíferos, pudiendo vivir hasta tres veces más que ellos atendiendo a la masa corporal equivalente (Finch 1990; Holmes & Austad 1995). Estas tasas de envejecimiento lento son paradójicas, pues las aves muestran unas tasas metabólicas más elevadas (entre 2-2.5 veces superiores, con gastos energéticos en toda una vida de hasta 15 veces mayores), temperaturas corporales más altas (aproximadamente 3°C más) y niveles de glucemia de dos a cuatro veces superiores a lo habitual en los mamíferos. De acuerdo con las actuales teorías bioquímicas de la senescencia, la elevación de esos parámetros en las aves debería contribuir a un daño tisular acelerado debido a la acumulación de productos deletéreos resultantes del

metabolismo oxidativo y de la reacción de Maillard (Monnier *et al.* 1991; Kristal & Yu 1992; Holmes *et al.* 2001). Sin embargo, varias especies de aves se encuentran entre las de mayor esperanza de vida del reino Animal (Carey & Judge 2000). Algunos investigadores creen que serían aquellas que envejecen lentamente porque maduran más tarde y presentan una fecundidad reducida, pero estudios recientes sugieren que las aves tienen mecanismos para protegerse de los daños oxidativos y pueden regenerar algunas neuronas de su cerebro (Monnier *et al.* 1991; Kristal & Yu 1992; Holmes *et al.* 2001; Holmes & Ottinger 2003)

A pesar de esta predisposición de las aves para desafiar a la senescencia, es obvio que envejecen, por lo que serían particularmente interesantes estudios sobre envejecimiento en este grupo de vertebrados. Más aún, dado que las aves y otros vertebrados homeotermos (incluyendo humanos y primates) muestran un modelo de senescencia gradual con una duración de la vida definida (Finch 1990; Holmes *et al.* 2001), el estudio de los procesos del envejecimiento en las aves deberían cobrar más importancia debido a que serían más similares a los humanos que los habituales modelos básicos de procesos de envejecimiento en mamíferos, que usan como modelo a roedores de vida corta (Holmes & Ottinger 2003).

En seres humanos y en animales de laboratorio se ha observado un descenso en la función inmune asociado a la edad (Nagel *et al.* 1986; Miller 1990), al igual que en invertebrados (Adamo *et al.* 2001; Kurtz *et al.* 2002). Los mecanismos fisiológicos que subyacen bajo este descenso en la función inmune han sido bien documentados. Por ejemplo, se ha comprobado que los mecanismos de proliferación de células T, su actividad, la producción de interleucinas, la generación de efectos citotóxicos e incluso el mecanismo de presentación antigénico se deteriora con la edad (Miller 1996; 2000). Además, en varios estudios en poblaciones naturales de aves se ha comprobado que la producción de anticuerpos es menor en los individuos de edad más avanzada (Cichon *et al.* 2003, Saino *et al.* 2003).

Todos estos estudios demuestran el deterioro fisiológico que sufren los individuos con la edad, pero habría que ver cuáles son las consecuencias de dicha reducción. Uno de los posibles efectos sería una disminución en la habilidad para luchar frente a los parásitos y prevenir la expresión de las enfermedades. Siguiendo esta línea, el parasitismo y las enfermedades con una base genética han sido desde hace tiempo implicadas en la expresión de la senescencia (Medawar 1952, Williams 1957). La razón es porque un signo típico de la senescencia es un incremento en la susceptibilidad al

parasitismo y a la expresión de enfermedades como el cáncer (ver revisión Miller 1996). Esta mayor susceptibilidad podría ser causada por el descenso de la función inmune de las células T citado anteriormente, que es la implicada en la defensa inmune antimalárica (Wakelin 1996). Por tanto, los individuos deberían sufrir una mayor intensidad de parasitismo cuando avanzan en la edad.

Los efectos de la senescencia vinculados al parasitismo serían particularmente interesantes en aquellas poblaciones que sufran un fuerte impacto de los parásitos, ya que esta causa de mortalidad extrínseca podría influir en la mortalidad intrínseca a través de los efectos en la senescencia (ver Abrahams 2004). Así pues, el mejor estudio posible sería aquel que examinase la prevalencia e intensidad de infección en el mismo individuo durante toda su vida o, al menos, durante varios años consecutivos.

Hasta el momento sólo tenemos constancia de un único estudio que investigue comparativamente en diferentes especies la evolución del parasitismo en el mismo individuo a lo largo de los años (ver Bennett y Bishop 1990). Con tal fin, en este capítulo se muestra un análisis comparativo de la prevalencia e intensidad de distintas especies de hemoparásitos (*Trypanosoma* y *Haemoproteus*) entre dos especies de hirundínidos (*Delichon urbica* e *Hirundo rustica*) en referencia al envejecimiento, estudiando la evolución del parasitismo y el sistema inmune en el mismo individuo a través de los años.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en tres colonias diferentes de hirundínidos. La primera fue la colonia de Avión Común descrita en los métodos generales. La segunda colonia, distante 10 kms. de la primera, es una colonia de Avión Común ubicada bajo un depósito de aguas en el I.E.S. Ntra. Sra. de Botoa (38°53'N, 6°55'W). La tercera localidad de estudio fue una colonia de Golondrina Común situada en una granja a 14 kms. de Badajoz (38°52'N, 6°50'W) (para más información ver de Lope y Møller 1993).

Durante los años de estudio se tomaron, aparte de otros registros, muestras de sangre que nos han permitido la realización del presente estudio, que forma parte de otro más amplio a largo plazo. Cuando los pollos tuvieron trece días de edad fueron anillados. Los juveniles y adultos fueron capturados mediante redes y sexados, medidos y marcados con anillas metálicas procedentes de la Sociedad Española de Ornitología

para su posterior reconocimiento. Para la diferenciación de los sexos y la edad se siguieron los criterios establecidos por Svensson (1992).

De cada individuo se tomó una gota de sangre de la vena braquial y se realizó el frotis sanguíneo según lo propuesto por Bennett (1970). Los frotis fueron inmediatamente secados al aire para evitar cualquier contaminación, y fijados con metanol puro tan pronto como fue posible para minimizar la disminución del contraste que sucede si se demora en exceso este paso (Bennett 1970). Posteriormente se tiñeron durante 45 minutos utilizando la tinción de Giemsa. Este colorante consiste en una mezcla de una parte de Giemsa con 10 partes de solución de tampón fosfato a pH 7.2, realizado inmediatamente antes de usar la tinción (Merino 1999). A continuación se dejaron secar y se montaron con cubreobjetos utilizando medio de montaje DePeX (BDH Laboratory Supplies).

Para el estudio de la prevalencia e intensidad de hemoparásitos se utilizó un microscopio Nikon modelo Labophot y un microscopio Zeiss modelo KF2. Se revisó con el objetivo de 200x la mitad de la preparación haciendo barridos de izquierda a derecha para detectar parásitos grandes extraeritrocíticos como *Trypanosomas* y *Microfilarias*. A continuación en la otra mitad de la preparación se buscó una zona de distribución homogénea de las células (bien separadas) y se revisaron 20 campos para localizar parásitos intraeritrocíticos con el objetivo de 400x. Si se detectó o sospechó que pudiese haber algún parásito se comprobó con el objetivo de 100x (Godfrey *et al.* 1987, Fedinch *et al.* 1995, Merino & Potti 1995, Merino 1999)

Dada la poca intensidad de parásitos extracelulares sólo se utilizaron datos de prevalencia. Los parásitos intraeritrocíticos se cuantificaron contando el número de parásitos por 2.000 eritrocitos a 1000x (Godfrey *et al.* 1987, Fedynich *et al.* 1995, Merino & Potti 1995, Merino *et al.* 1999). Si se tenía la seguridad de que un individuo estaba infectado pero la intensidad era muy baja se contaron 10.000 eritrocitos, y si aún no aparecía ningún parásito se consideraba que la intensidad de la infección era de 0.1 (Merino *et al.* 1997). Para cálculos posteriores todas las intensidades fueron normalizadas en referencia a número de parásitos por 2.000 eritrocitos. Todos los frotis fueron examinados por la misma persona (*A. Marzal*). Las especies de parásitos fueron identificadas basándonos en especificidad de la familia hospedadora y características morfológicas (Bennett *et al.* 1993, Bennett *et al.* 1994).

El conteo leucocitario se realizó buscando una zona del frotis homogénea y con células separadas. En esa zona se barre el frotis de arriba hacia abajo contando el

número de leucocitos en 50 campos a 1000x como medida relativa del número de leucocitos totales (Naguib *et al.* 2004)

Para comparar las prevalencias de infección entre los distintos años se utilizó el test de χ^2 de McNemar. El análisis estadístico de las intensidades y conteo leucocitario se realizó mediante el test de Wilcoxon para muestras emparejadas (SPSS para Windows versión 12.0).

RESULTADOS

En la revisión de los frotis se encontraron varias especies de hemoparásitos, siendo *Trypanosoma* la más abundante en las golondrinas y *Haemoproteus* en las muestras de Avión Común de ambas poblaciones (tabla 1). Dada la escasa presencia de otros hemoparásitos en las poblaciones estudiadas (prevalencias inferiores al 2%), para posteriores análisis sólo se tendrán en cuenta los datos referentes a la infección causada por *Haemoproteus* en aviones y *Trypanosoma* en golondrinas.

Desde 1997 a 2005 se procedió al anillamiento y toma de frotis sanguíneos de más de 6.000 aves: 5.000 aviones comunes y 1.000 golondrinas durante la época reproductora. El número de muestras total utilizadas para el análisis de la prevalencia e intensidad de parasitismo en el mismo individuo en años consecutivos fue de 412 aviones en la colonia de la RUCAB, 54 aviones en la colonia de Botoa y 100 golondrinas, agrupadas en 206, 27 y 50 emparejamientos, respectivamente. Dada la alta mortalidad que presentan estas especies en diferentes eventos (Bryant 1979, Turner 1994) y las tasas de retornos nidales y natales (de Lope y da Silva 1988, Turner 1994) nos resultó imposible obtener una muestra más abundante.

Tabla 1. Prevalencia de infección (%) por distintas especies de hemoparásitos en las poblaciones de hirundínidos estudiadas. Se muestra el número de aves examinadas en cada población

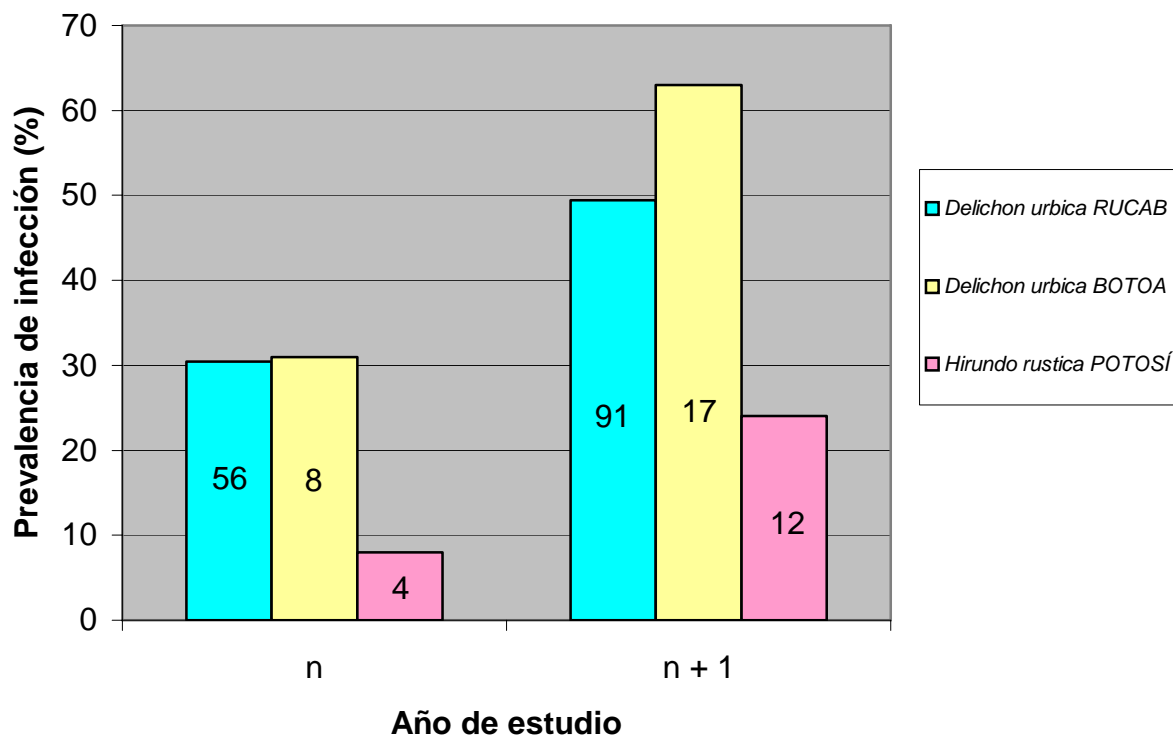
población	N	<i>Haemoproteus</i>		<i>Trypanosoma</i>		<i>Leucocytozoon</i>		Microfilaria	
		infectadas	prevalencia	infectadas	prevalencia	infectadas	prevalencia	infectadas	prevalencia
<i>Delichon urbica</i> RUCAB	1008	534	52.9	15	1.5	1	0.1	6	0.6
<i>Delichon urbica</i> BOTOA	40	21	52.5	0	0	0	0	0	0
<i>Hirundo rustica</i> POTOSÍ	265	4	1.5	59	22.2	0	0	5	1.9

Al realizar el seguimiento del mismo grupo de individuos dentro de cada población, encontramos diferencias significativas entre dos años consecutivos de estudio en la infección por hemoparásitos en las poblaciones de avión común, apareciendo infectados alrededor del 30% de los individuos en el primer año de captura, y el 60% el año siguiente. Al comparar esta distribución de infección con la de golondrinas, observamos que siguen un patrón muy similar, ya que en éstas también se comprobó un aumento significativo de la infección con el paso de los años (tabla 2, figura 1).

Tabla 2. Comparativa de prevalencia de infección en las poblaciones de hirundínidos estudiadas.

	X_i^2 Pearson	p
<i>Delichon urbica</i> RUCAB	10.125	0.001
<i>Delichon urbica</i> BOTOA	6.033	0.014
<i>Hirundo rustica</i>	4.000	0.046

Figura 1. Prevalencia de infección por hemoparásitos en las poblaciones de hirundínidos en dos años consecutivos de estudio. Se muestra el número de aves infectadas en cada año de estudio



Como puede observarse en la tabla de contingencia (tabla 3), en la población de Avión Común de la RUCAB el primer año estuvieron infectados 56 individuos de los 184 que se controlaron en sucesivos años, mientras que en el segundo año el número de individuos infectados se duplicó; 65 individuos que en el primer año no se encontraban contagiados sí se hallaron parasitados el año siguiente. En cambio, únicamente encontramos 10 casos en los que la infección pareció remitir. En 63 aves no se registró rastros de infección en ninguno de los dos años. Conjuntamente, 46 individuos estuvieron infectados ambos años.

Para el análisis estadístico de las prevalencias se empleó el test de χ^2 de McNemar para datos emparejados, estimándose que las diferencias de infección entre ambos años eran significativas (χ^2 de McNemar = 14,08; $p \leq 0,001$).

Tabla 3. Prevalencia de infección de adultos de *Delichon urbica* de la colonia de la RUCAB.

<i>D. urbica</i> RUCAB	Año 2 INFECTADOS	Año 2 NO INFECTADOS	TOTAL
Año 1 INFECTADOS	46	10	56
Año 1 NO INFECTADOS	65	63	128
TOTAL	111	73	184

En la colonia de *Delichon urbica* de BOTOA se observó un patrón de infección muy similar (tabla 4), encontrando diferencias significativas en la prevalencia de infección entre los dos años de estudio (χ^2 de McNemar = 7.11; $p < 0,05$)

Tabla 4. Prevalencia de infección de adultos de *Delichon urbica* de la colonia de Ntra. Sra. de Botoa.

<i>D. urbica</i> BOTOA	Año 2 INFECTADOS	Año 2 NO INFECTADOS	TOTAL
Año 1 INFECTADOS	8	0	8
Año 1 NO INFECTADOS	10	9	19
TOTAL	18	9	27

En el caso de la Golondrina Común, el primer año estuvieron infectados 4 individuos de los 50 que se controlaron en años sucesivos, mientras que en el segundo año el número de individuos infectados se triplicó. 10 individuos que el primer año no se encontraban infectados sí se hallaron parasitados el año siguiente. En cambio, únicamente encontramos dos casos en los que la infección pareció remitir. En 36 individuos no se registró rastros de infección en ninguno de los dos años, y 2 ejemplares estuvieron infectados ambos años.

Para el análisis estadístico de las prevalencias se empleó el test de χ^2 de McNemar para datos emparejados, estimándose que las diferencias de infección entre ambos años eran significativas (χ^2 de McNemar = 4,083; $p < 0,05$)

Tabla 5. Prevalencia de infección de adultos de *Hirundo rustica* en dos años consecutivos de estudio.

Hirundo rustica	Año 2 INFECTADOS	Año 2 NO INFECTADOS	TOTAL
	Año 1 INFECTADOS	2	
Año 1 NO INFECTADOS	10	36	46
TOTAL	12	38	50

Con el fin de realizar un estudio más exhaustivo y concreto de la prevalencia de infección en relación a la senescencia, los individuos estudiados de la colonia de *Delichon urbica* de la RUCAB fueron categorizados según su edad. Se dividió al total en tres grupos, quedando enmarcados en un primer grupo aquellos individuos cuya edad fue de un año (tabla 6). Un segundo grupo agrupó a los individuos cuya edad fue menor o igual a tres años (tabla 7), mientras que en el último grupo se dispusieron aquellos cuya edad superaba los tres años (tabla 8). Se estimó que la edad correcta para hacer tales categorizaciones era 3 años, dado que estudios anteriores en esta colonia indican que esa edad es la esperanza de vida del Avión Común (de Lope, datos no publicados). En las tres categorizaciones las diferencias entre las proporciones de infección volvieron a ser significativas [(pollo a 1 año: χ^2 de McNemar = 12.07; $p \leq 0.001$), (edad ≤ 3 años: χ^2 de McNemar = 27.841; $p \leq 0.001$), (edad > 3 años: χ^2 de McNemar = 10.452; $p \leq 0.001$)].

Tabla 6. Prevalencia de infección de individuos con 1 año de edad.

<i>D. urbica</i> RUCAB	Año 2 INFECTADOS	Año 2 NO INFECTADOS	TOTAL
Año 1 INFECTADOS	0	0	0
Año 1 NO INFECTADOS	14	8	22
TOTAL	14	8	22

Tabla 7. Prevalencia de infección de individuos de edad menor o igual a 3 años.

<i>D. urbica</i> RUCAB	Año 2 INFECTADOS	Año 2 NO INFECTADOS	TOTAL
Año 1 INFECTADOS	25	4	29
Año 1 NO INFECTADOS	40	37	77
TOTAL	65	41	106

Tabla 8. Prevalencia de infección de individuos de edad mayor a 3 años.

<i>D. urbica</i> RUCAB	Año 2 INFECTADOS	Año 2 NO INFECTADOS	TOTAL
Año 1 INFECTADOS	21	6	27
Año 1 NO INFECTADOS	25	26	51
TOTAL	46	32	78

Para el estudio de las intensidades de infección de *Haemoproteus* en las colonias de Avión Común no se pudo utilizar el test t de Student para datos apareados al no poder asumirse la condición de normalidad de la variable diferencia (test de Kolmogorov-Smirnov, $p \leq 0,001$). Por ello se empleó el test de Wilcoxon para datos apareados, concluyendo que las intensidades entre los dos años de estudio mostraban diferencias significativas ($p < 0,05$) en ambas colonias (Tabla 9)

Tabla 9. Comparativa de intensidad de infección en las poblaciones de Aviión Común.

	<i>Z Wilcoxon</i>	p
<i>Delichon urbica</i> RUCAB	-2.190	0.029
<i>Delichon urbica</i> BOTOA	-2.268	0.023

En el estudio comparativo del sistema inmune de las dos especies de hirundínidos con respecto a su edad, comprobamos que el número de leucocitos disminuyó significativamente en el mismo individuo conforme avanzaba en edad en ambas especies (Tabla 10)

Tabla 9. Comparativa de conteo leucocitario en las poblaciones de Aviión Común y Golondrina Común

	<i>Z Wilcoxon</i>	p
<i>Delichon urbica</i> RUCAB	-3.415	0.001
<i>Hirundo rustica</i> POTOSÍ	-2.613	0.009

Entre los años 1999 y 2005 se realizó un estudio de la prevalencia de infección en referencia a la edad exacta conocida de los individuos en las poblaciones de Aviión Común (RUCAB) (figura 2) y Golondrina Común (figura 3). Para evitar la pseudoreplicación se tuvo la precaución de no incluir al mismo individuo en diferentes clases de edad conforme avanzaba su edad, excluyendo asimismo todos los individuos que fueron utilizados en otros experimentos. Como puede observarse, las prevalencias de infección parecen seguir una curva de distribución gaussiana similar cuando se enfrenta a la edad en ambas especies.

Figura 2. Prevalencia de infección por *Haemoproteus* en la colonia RUCAB de *Delichon urbica* en grupos de edad conocida. Se muestra el número de aves analizadas en cada clase de edad

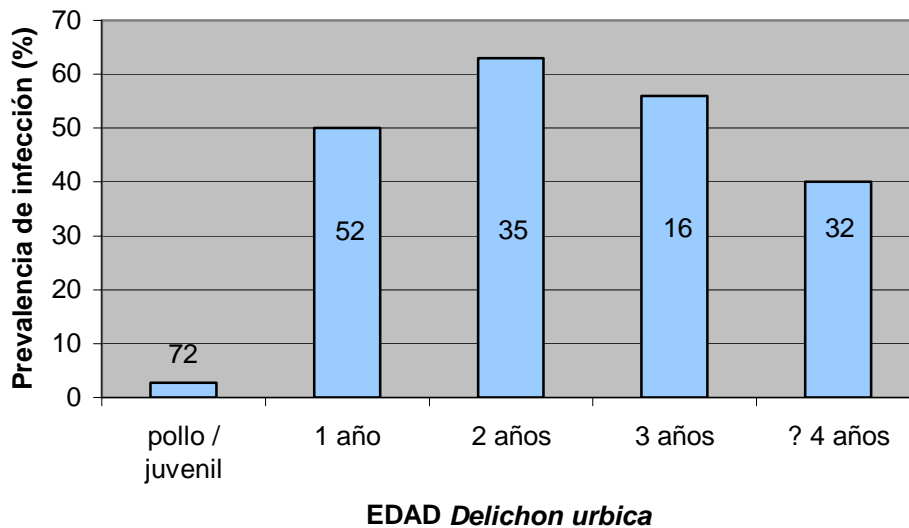
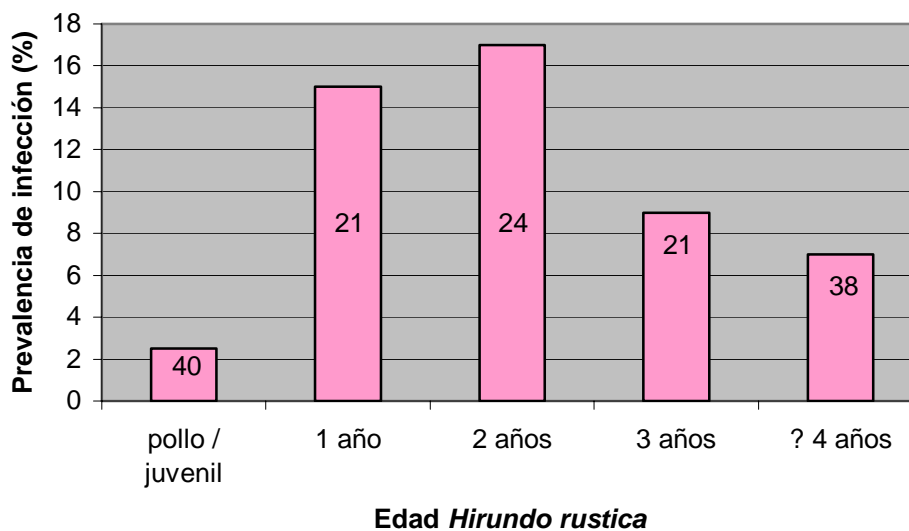


Figura 3. Prevalencia de infección por *Trypanosoma* en la colonia de *Hirundo rustica* en grupos de edad conocida. Se muestra el número de aves analizadas en cada clase de edad



DISCUSIÓN

Los principales resultados de este estudio fueron: (i) el sistema inmune se deteriora con la edad en poblaciones silvéticas de hirundínidos, como demuestra el hecho de la disminución de leucocitos circulantes; (ii) este declive inmunitario coincide con el aumento de la prevalencia e intensidad de parásitos sanguíneos en los individuos conforme avanzan en edad; y (iii) la mayor prevalencia de infección por hemoparásitos en el Avión Común y en la Golondrina Común se da en los individuos de tres años de edad, siendo menor en individuos de edad más avanzada. Discutiremos a continuación estos resultados.

Desde el año 1997 se anillaron más de 5.000 individuos de Avión Común y más de 1.000 Golondrinas, de los cuales únicamente se pudieron recapturar 283 individuos útiles para este estudio. Las causas de este número de pruebas se deben fundamentalmente a la alta mortalidad de estas especies (Lack 1949; Bryant 1979), estimándose en el 88% en el primer año (Rheinwald 1975; Rheinwald *et al.* 1976) y también a la baja esperanza de vida de los individuos de estas colonias, siendo de 2 años y medio, aproximadamente (de Lope *et al.* inédito). A esto habría que añadirle la dificultad intrínseca para realizar estudios de este tipo. De hecho, sólo tenemos conocimiento de uno sobre senescencia y parasitismo en el que haya sido posible la captura de un mismo individuo varios años consecutivos (Bennett & Bishop 1990; ver también Allander & Bennett 1994).

Bernis (1966) definió a la filopatria como los retornos a los lugares de nacimiento o nidificación. Es una característica muy común en aves (véase Gautheraux 1982), siendo bastante general en los Passeriformes (Baker 1978; Shields 1982), especialmente en los Hirundínidos (de Lope 1983). En el cálculo de la tasa de retorno se han de tener en cuenta tres factores fundamentales: la supervivencia de la especie, su capacidad de dispersión, y la probabilidad de recaptura de los individuos. En un estudio previo se estimaron las tasas de retorno en una de nuestras colonias (BOTOA), oscilando los retornos natales entre el 6.1 % en el segundo año calendario al 0.5 % en el cuarto y disminuyendo los retornos nidales desde el 27.3 % en el segundo año calendario al 0.5 % en el sexto (de Lope & da Silva 1988). Dada la incapacidad de acceder a todos los nidos de la población y el anillamiento de todos los pollos en las otras colonias de estudio no ha sido posible estimar estas tasas de retorno, a pesar de

existir programas específicos para el cálculo de este parámetro (White 2000), debido a que este aspecto no ha sido la intención de este estudio.

Todas las muestras sanguíneas fueron tomadas durante la época reproductora, entre los meses de marzo y junio, ya que se ha comprobado en diversos trabajos que es en esta fase del ciclo vital cuando podemos encontrar la máxima intensidad de hemoparásitos (Allander & Bennett 1994), si bien las infecciones pueden durar hasta finales de otoño, aunque en menor intensidad (ver Allander & Sundberg 1997). Además, otras investigaciones de hemoparásitos en climas templados han demostrado que la mayoría de la transmisión ocurre durante la época de cría, cuando las poblaciones de hemoparásitos se incrementan con la llegada de la estación más cálida, y cuando en los individuos con infecciones crónicas se produce un relapso de la misma que puede ser utilizada como fuente de infección, siendo un claro ejemplo de adaptación del parásito en la coevolución hospedador - parásito (ver Atkinson y van Ripper 1991). Así, tenemos la certeza de que la infección por *Haemoproteus* es inferida en nuestra localidad, dado que, si bien no conocemos con exactitud cuáles de los múltiples potenciales vectores son los que actúan, sí se ha comprobado que la infección se produce aquí al encontrar en estudios anteriores individuos volantones afectados por *Haemoproteus prognei* (Marzal 2001). Esto también es atribuible a la transmisión de *Trypanosoma*, pues se han encontrado pollos de avión común de 13 días de edad infectados (Merino *et al.* 1998).

(i) Sobre las prevalencias de infección

En el análisis de los frotis se encontraron cuatro especies de parásitos sanguíneos. La especie que tuvo mayor prevalencia fue *Haemoproteus prognei* en las poblaciones de Avión Común, con una prevalencia de infección superior al 50% en ambas poblaciones. Las infecciones por otros parásitos sanguíneos resultaron ser mixtas con *Haemoproteus*, tal y como han aparecido en otros estudios (Allander & Bennett 1994; Merilä *et al.* 1995; Dawson & Bortolotti 1999; Marzal 2001). En la población de Golondrina Común el parásito más abundante fue *Trypanosoma*, encontrándose infectados el 22 % de los adultos. Como hemos señalado, dada la escasa relevancia de las infecciones por los otros parásitos (menores al 2%), para el estudio de la prevalencia e intensidad sólo se tuvieron en cuenta los datos referentes a la infección por

Haemoproteus en Aviones y *Trypanosoma* en Golondrinas, tal y como se han efectuado en otros estudios de hemoparásitos (Merino *et al.* 2000).

Otras referencias también muestran altos porcentajes de infección por *Haemoproteus* en aves. Así, en un estudio realizado en *Centrocercus urophasianus*, el 37.5% de los adultos estuvo infectado por *Haemoproteus* (Gibson 1990). Merino & Potti (1995) estudiaron la prevalencia de hemoparásitos en una población de *Ficedula hypoleuca*, resultando infectados por *Haemoproteus* el 15.71% de los adultos, mientras que el 70.84% de los adultos de *Emberiza citrinella* tuvieron *Haemoproteus coatneyi* (Sundberg 1995). Allander & Bennett (1994) encontraron que el 75.7% de los adultos de carbonero común estaban infectados por *Haemoproteus majoris*. Aproximadamente el 55% de los adultos de *Falco sparverius* presentaron infección por *Haemoproteus tinnunculi* (Dawson & Bortolotti 2000). *Haemoproteus prognei*, el hemoparásito más abundante en nuestra colonia, también infecta a otros hospedadores como *Progne subis*, con tasas de infección del 28% (Davidar & Morton 1993).

Como consecuencia de este análisis comparativo podemos deducir que los porcentajes de infección por *Trypanosoma* en otros estudios de paseriformes son similares a los del nuestro (Merino & Potti 1995; Merino *et al.* 1997; ver también Scheuerlein & Ricklefs 2004). Es decir, Avión Común y Golondrina Común tienen unas prevalencias de hemoparásitos que se pueden considerar como normales.

(ii) *El papel de los parásitos en la expresión de la senescencia*

Las variaciones en la prevalencia pueden ser debidas tanto a factores intrínsecos de los hospedadores (resistencia genotípica, actitudes de comportamiento o estado de salud), como a factores extrínsecos (diferencias en la exposición a vectores) (van Riper *et al.* 1986; Atkinson y van Riper 1991; Holmstad & Skorping 1998; Wiehn *et al.* 1999), pudiendo también ser debidas al sexo (McCurdy *et al.* 1988) o a la edad (Weatherhead & Bennett 1992). Algunos estudios sobre parasitismo únicamente aportan datos sobre la prevalencia de infección en una o varias poblaciones, aún cuando la prevalencia por sí misma es un indicador pobre de efectos de los parásitos en sus hospedadores (May 1984; Anderson 1986; Kirkpatrick 1991), si bien cambios en la prevalencia pueden proporcionar una información muy valiosa (Kitron & Higashi 1985; Kirkpatrick 1991). Como es lógico pensar, la mejor investigación posible sobre cambios en la prevalencia e intensidad en una población es aquella capaz de contrastar el posible

cambio en el mismo individuo, si bien no tenemos constancia de ningún otro estudio capaz de realizarlo en aves silvestres durante tan largo plazo.

En este estudio presentamos datos de prevalencia e intensidad de infección de adultos de Avión Común y Golondrina Común. De acuerdo con nuestras predicciones, el sistema inmune se deteriora con la edad como demuestra el descenso en el número de leucocitos en los individuos, y esto causa un mayor porcentaje de individuos infectados y una mayor intensidad de infección conforme avanzaron en edad.

El parasitismo y las enfermedades con base genética han sido desde hace tiempo implicadas en la expresión de la senescencia (Medavar 1952; Williams 1957). La razón es debida al incremento a la susceptibilidad del parasitismo y a la expresión de enfermedades con base genética, como por ejemplo el cáncer, que es considerada un signo típico de senescencia, y al deterioro que sufre el sistema inmune con el paso del tiempo (Miller 1996). Además, la intensidad de infección por ácaros hematófagos y malófagos ectoparásitos aumenta con la edad, según demuestran los estudios realizados por Møller y de Lope (1999) en la Golondrina Común (*Hirundo rustica*). Esto es consecuente con el descenso en la habilidad del hospedador para defenderse frente a los parásitos cuando alcanzan la edad adulta.

El riesgo de contagio aumenta con los años debido al aumento a la exposición del vector (Weatherhead & Bennett 1991; Allander & Bennett 1994). Además, Bennett y Bishop (1990) aseguran que muchas aves suelen retener la infección a través de los años, con lo que las aves infectadas en una edad lo seguirían estando al año siguiente, además de las infectadas de nuevo en este último año. Esto concuerda con nuestros resultados, donde se comprueba que la mayoría de los individuos ha retenido la infección con los años, o bien se ha infectado, siendo mínimo el porcentaje de individuos en los que parece remitir la infección. También es lógico pensar que un individuo que vive más está más expuesto que otro que vive menos a cualquier riesgo ambiental, incluido la infección por hemoparásitos.

Otro punto que reafirma nuestras hipótesis tiene en cuenta la reincidencia en la infección durante la reproducción debida al estrés ambiental. Las recaídas en las infecciones de hemoparásitos pueden ser desencadenadas por hormonas asociadas a la reproducción (Atkinson & van Riper 1991), de forma que se debería esperar un predominio mayor durante la estación reproductora (Allander & Sundberg 1997). La liberación de hormonas sexuales al inicio de la reproducción puede causar supresión del sistema inmune y la activación de algunas infecciones parasitarias latentes (Zuk 1991;

Folstad y Karter 1992). Parece lógico pensar que, en condiciones normales, un individuo de $n + 1$ años habrá sufrido mayor inmunosupresión que un individuo de sólo n años de vida, pues el primero habrá vivido más estaciones reproductoras. Estudios de hemoparásitos en climas templados han demostrado que la mayoría de la transmisión ocurre durante la época de cría, cuando las poblaciones de vectores se incrementan con la llegada de la estación más cálida, momento en el que los individuos con infecciones crónicas sufren una activación de dicha infección que pudiera ser utilizada como fuente de contagio (Atkinson y van Riper 1991).

Otra explicación posible al aumento de la infección, en conexión con la anterior, sería la relación entre parasitismo y esfuerzo reproductor. En aves se ha demostrado que un gran esfuerzo reproductor puede incrementar la carga parásita tanto en poblaciones naturales (Korpimäki *et al.* 1993; Allander & Bennett 1995; Dufva 1996; Oppliger *et al.* 1997; Ilmonen *et al.* 1999) como en tamaños de puesta manipulados experimentalmente (Norris *et al.* 1994; Richner *et al.* 1995; Ots & Hôrak 1996; Allander 1997; Siikamäki *et al.* 1997; Wiehn & Korpimäki 1998; Wiehn *et al.* 1999). Por tanto, parece lógico pensar que el porcentaje de individuos parasitados aumente con el número de eventos reproductores que un individuo va llevando a cabo a lo largo de su vida.

De igual forma, otra de las causas que pueden provocar una recaída es el estrés asociado a la migración (Valkiunas 1991). Además, las aves migradoras sufren más infecciones por parásitos protozoos que las aves residentes (Bennett & Fallis 1960; Dogiel 1964; Greiner 1975; Figuerola & Green 2000), especialmente las aves con migraciones trans-saharianas (Peirce & Mead 1978), como es nuestro caso. Møller y Erritzoe (1988) demostraron que las aves migratorias tenían órganos de sistema inmune de mayor tamaño que las especies sedentarias. Por tanto, debemos asumir que la probabilidad de contraer una infección, o aumentar la intensidad de una ya existente, aumenta conforme avanza la edad de los individuos y acrecentada por los viajes migratorios, asumiendo la patogenicidad de *Haemoproteus*.

Aunque históricamente se ha considerado que las especies de *Haemoproteus* son escasamente patogénicas (Atkinson & van Riper 1991), sí existen descripciones de Columbiformes moribundos que presentaban altas tasas de parasitemia con este género, concluyendo por tanto que efectivamente debían ser patogénicas (Coatney 1933; Markus 1972). Las aves infectadas experimentalmente por *Haemoproteus* desarrollan miopatía, tienen un crecimiento reducido, pudiendo incluso morir algunas de ellas. Los parásitos intraeritrocíticos probablemente causen estrés fisiológico adicional al

hospedador destruyendo las células y consumiendo la hemoglobina (Atkinson y van Riper 1991). En este sentido los pigmentos granulares de algunos hematozoos parecen ser residuos insolubles producidos durante la digestión y el metabolismo de la hemoglobina del hospedador (Yamada y Sherman 1979). Merino *et al.* (2000) demostraron experimentalmente que los individuos infectados con altas intensidades de *Haemoproteus* tuvieron menor éxito reproductor y peor condición corporal. En un estudio realizado en rapaces se notificaron un elevado número de infecciones por *Haemoproteus* asociadas a severas pérdidas de peso y a colapsos debidos a anemias. Además se han encontrado infecciones letales de *Haemoproteus* en buhos nivales, cárabos y halcones de Harris (Hawkey & Samour 1988; Evans & Otter 1998; Butterworth & Harcourt- Brown 1996). Olsen y Gaunt (1985) observaron que la duración de la rehabilitación de rapaces silvestres fue significativamente mayor cuando se encontraron infectadas por hematozoos que aquellas aves no infectadas. Otro estudio mostró que las hembras de Cernícalo Primilla comenzaron a sus puestas más tarde, y éstas fueron menores cuando se emparejaron con machos infectados con *Haemoproteus tinniculi* en comparación con las hembras emparejadas con machos no infectados (Korpimaki *et al.* 1995). Apanius (1991) comprobó que las parejas de *Falco sparverius* con menores intensidades de infección por *H. tinniculi* tuvieron mayor número de volantones que individuos con mayores intensidades de parasitemia. Chen y otros investigadores (2001) comprobaron que algunos parásitos como *Haemoproteus* degradan la hemoglobina del hospedador durante su estadio intraeritrocítico. Parece, por tanto, que altas intensidades de infección por *Haemoproteus* pueden inducir a un deterioro progresivo de la condición corporal, o incluso la muerte. Esta puede ser la razón por la que presenten mayor proporción e intensidad de infección conforme avanza el tiempo.

Nuestros resultados concuerdan significativamente con las hipótesis anteriores, ya que constatamos un aumento en la prevalencia e intensidad de infección en los individuos conforme avanzaron en edad en las tres poblaciones estudiadas.

Como ya se he citado anteriormente, la mayoría de los individuos de Avión Común y de Golondrina Común no supera los dos años y medio de vida. Esta es la razón por la que decidimos profundizar más en el análisis de la prevalencia con el fin de dar aún más robustez a nuestro estudio. Para ello dividimos la muestra inicial en tres grupos según la edad conocida de los individuos. En todos los casos volvimos a encontrar diferencias significativas entre los años de estudio, reafirmandose aún más

nuestras predicciones, pudiendo afirmar que los efectos del parasitismo, en referencia a la senescencia, comienzan a hacerse notar a edades tempranas.

(iii) *Análisis comparativo entre especies*

En condiciones naturales, los machos de *Parus major* en su primer año de cría tienen una menor prevalencia de hematozoos que los machos de edad más avanzada (Norris *et al.* 1994). Weatherhead y Bennett (1991) obtienen similares resultados en *Agelaius phoeniceus*. En otro estudio realizado en *Parus major*, Allander & Bennett (1994) concluyeron que los individuos de edad mayor o igual a 2 años tuvieron una mayor prevalencia de parásitos sanguíneos que los individuos de 1 año. Davidar y Morton (1993) demuestran que la prevalencia de infección por *Haemoproteus prognei* fue mayor entre los individuos del segundo o más años de crianza que entre aquellos de primer año en *Progne subis*. También el porcentaje de hembras de papamoscas cerrojillo (*Ficedula hypoleuca*) infectadas por parásitos sanguíneos aumenta con la edad (Sanz *et al.* 2001). Todos estos resultados concuerdan con los nuestros.

Diversas investigaciones relacionan la intensidad de parasitismo en varias clases de edad, encontrando en la mayoría de los casos un mayor grado de infección en los individuos juveniles que en los adultos (Seutin 1994; Sundberg 1995; Merilä *et al.* 1995; Allander & Sundberg 1997; Sol *et al.* 2000), seguramente debido a una inmunidad adquirida tras una exposición previa en los adultos, o a un menor desarrollo en el sistema inmune en los juveniles (Olsen 1974; Chung 1976). De igual forma, en nuestro estudio encontramos que la intensidad de infección de los individuos de Avión Común y de Golondrina Común analizados fue significativamente mayor el segundo año de estudio que el primer año, de acuerdo con nuestras hipótesis.

De cualquier forma, todas estas comparaciones con otras investigaciones deben tomarse con cierta cautela, debido a que varios factores pueden incidir para que haya discrepancias a la hora de comparar varios estudios, como que se hayan obtenido en diferentes periodos de tiempo (ver Atkinson & van Ripper III 1991), distintas zonas geográficas (Desser & Bennett 1993; Bennett *et al.* 1995), o que sean de especies distintas (Sorci & Moller 1997). Además está la dificultad que entraña la comparación de intensidades estimadas entre diversos estudios, ya que el procedimiento de búsqueda y conteo puede diferir un poco entre los individuos que realizan el estudio, por lo que para una total seguridad se requeriría una homogenización de registros entre los

distintos estudios para justificar tales comparaciones (Godfrey *et al.* 1987; Allander & Sundberg 1997)

Al estudiar comparativamente la prevalencia de infección en las poblaciones de Avión y Golondrina en referencia a la edad de los individuos analizados, podemos observar que la prevalencia es menor en los individuos de edad más avanzada. Proponemos dos hipótesis para explicar esto. Podría ser que estos individuos alcancen un edad madura debido a que no han estado expuestos previamente a la infección, o bien, que son precisamente aquellos que tienen un eficiente sistema inmune que les permite atenuar o incluso anular los efectos de la infección (Weatherhead & Bennett 1991; Allander & Bennett 1994; Wakelin 1996; Ots & Horak 1998).

A pesar de que ambas especies de hirundínidos sufren cambios en la prevalencia con el paso de los años, los porcentajes de infección son sustancialmente menores en las Golondrinas que en los Aviones. Las diferencias en prevalencias de infección reflejan un balance entre exposición y resistencia a la infección (van Riper *et al.* 1994). Posiblemente esta sea la causa de la diferencia entre ambas poblaciones, ya que el género *Trypanosoma* es transmitido por vectores simúlidos, más comunes en ambientes norteños (Scheuerlein & Ricklefs 2004)

En conclusión, y de acuerdo con nuestros resultados, comprobamos que el sistema inmune desciende con la edad en poblaciones naturales de aves, al mismo tiempo que la prevalencia e intensidad de parásitos sanguíneos aumenta como consecuencia del deterioro inmunológico, comenzando a notarse los efectos del parasitismo a edades tempranas. Por tanto, demostramos que los parásitos juegan un papel clave en la expresión de la senescencia, por lo que todos los estudios y comparaciones de los efectos de los parásitos en las poblaciones de sus hospedadores deberían tener en cuenta la edad de los individuos analizados.

REFERENCIAS

- Abrahams PA (2004) Evolutionary biology: Mortality and lifespan. *Nature* 431: 1048
- Adamo SA, Jensen M, Younger M (2001) Changes in lifetime immunocompetence in male and female *Gryllus texensis* (formerly *G. integer*): trade-offs between immunity and reproduction. *Animal Behavior* 62: 417–425

-
- Allander K (1997) Reproductive investment and parasite susceptibility in the great tit. *Functional Ecology* 11: 358-364
 - Allander K, Bennett GF (1994) Prevalence and intensity of hematozoan infections in a population of Great Tits *Parus major* from Gotland, Sweden. *Journal of Avian Biology* 25: 69-74
 - Allander K, Sundberg J (1997) Temporal variation and reliability of blood parasite levels in captive Yellowhammer males *Emberiza citrinella*. *Journal of Avian Biology* 28: 325-330
 - Anderson RM (1986) The population dynamics and epidemiology of intestinal nematode infections. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 80: 686 – 690
 - Apanius V (1991) Blood parasitism, immunity and reproduction in American kestrels (*Falco sparverius*). En *Biology and Conservation of Smalls Falcons* by MK Nicholls and R Clarke (eds). Proc. 1991 Hawk and Owl Trust Conference
 - Atkinson C, van Riper III C (1991) Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon* and *Haemoproteus*. En *Bird-Parasite interactions* (Loyle & Zuk eds.) Oxford University Press. Oxford pp. 19-48
 - Baker RR (1978) The evolutionary ecology of animal migrations. Hodder & Stoughton, London.
 - Beers MH, Berkow R (eds.) (2000). The Merck manual of geriatrics (3rd ed.). Whitehouse Station, NJ. Merck Research Laboratories.
 - Bennett GF, Fallis AM (1960) Blood parasites of birds in Algoquin Park, Canada, and a discussion of their transmission. *Can. J. Zool.* 38: 261 - 273
 - Bennett GF (1970). Simple techniques for making avian blood smears. *Canadian Journal of Zoology.* 48: 585-586
 - Bennett GF, Bishop MA (1990) Change in status of haematozoan infections in wild passeriform sampled in successive years. *Proc. Zool. Soc. (Calcutta)* 43: 9-18
 - Bennett GF, Peirce MA, Ashford RW (1993). Avian Haematozoa: mortality and pathogenicity. *J. Nat. Hist. Lond.* 26: 993-1001.
 - Bennett GF, Peirce MA, Earlé RA (1994). An annotated checklist of the valid avian species of *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* (Apicomplexa: Haemosporida) and *Hepatozoon* (Apicomplexa: Haemogregarinidae). *Systematic Parasitology* 29: 61-73

-
- Bennett GF, Squires-Parsons D, Siikamäki P, Huhta E, Allander K, Hillström L (1995) A comparison of blood parasites of three Scandinavian populations of the pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*). *Journal of Avian Biology* 26: 33-38
 - Bernis F (1966) Migración en aves. Tratado teórico y práctico. S.E.O. Madrid.
 - Bryant DM (1979). Reproductive cost in the house martin *Delichon urbica*. *Journal of Animal Ecology* 52: 905-925
 - Butterworth G, Harcourt- Brown NH (1996): Neonate husbandry and related diseases. En *BSAVA Manual of raptors, pigeons and waterfowl*, PH Benyon, NA Forbes and NH Harcourt-Brown (eds). BSVA, Cheltenham
 - Carey JR, Judge DS (2000). Longevity Records: Life Spans of Mammals, Birds, Amphibians, Reptiles, and Fish. Odense Monographs on Population Aging. Odense University Press, Odense, Dinamarca
 - Chen M, Shi L, Sullivan DJr (2001): *Haemoproteus* and *Schistosoma* synthesize heme polymers similar to *Plasmodium* hemozoin and β - hematin. *Molecular & Biochemical Parasitology* 113: 1-8
 - Chung TC (1976) General parasitology. Academic Press, New York
 - Cichon M, Sendecka J, Gustafsson L (2003). Age-related decline in humoral immune function in Collared Flycatchers. *Journal of Evolutionary Biology* 16: 1205-1210
 - Coatney GR (1933) Relapse and associated phenomena in the *Haemoproteus* infection of the pigeon. *American Journal of Hygiene* 18: 133-160
 - Davidar P, Morton ES (1993) Living with parasites: prevalence of a blood parasite and its effect on survivorship in the Purple Martin. *The Auk* 110(1): 109-116
 - Dawson RD, Bortolotti GR (1999) Prevalence and intensity of hematozoan infections in a population of American kestrels. *Canadian Journal of Zoology* 77: 162-170
 - Desser SS, Bennett GF (1993) The genera *Leucocytozoon*, *Haemoproteus*, and *Hepatocystis*. En *Parasitic Protozoa, Vol. 4, Chpt. 5.* (ed. JP Kreier). Academic Press. pp. 273-307
 - Dogiel (1964) General Parasitology. Oliver and Boyd. Edinburgh
 - Dufva R (1996) Blood parasitism, health, reproductive success, and egg volume in female great tits *Parus major*. *Journal of Avian Biology* 27: 83-87.

-
- Eslamboli A, Georgievska B, Ridley RM, Baker HF, Muzyczka N, Burger C, Mandel RJ, Annett L, Kirik D (2005). Optimizing GDNF gene therapy in Parkinsonian monkeys. *The Journal of Neuroscience* 25: 769-777
 - Evans M, Otter A (1998) Fatal combined *Haemoproteus noctuae* and *Leucocytozoon ziemanni* infection in juvenile snowy owls (*Nyctea scandiaca*); a case report. *Vet Rec* 143 (3): 72-76
 - Fedynich AM, Pence DB, Godfrey RD (1995). Hematozoa in thin blood smears. *Journal of Wildlife Diseases*, 31 (3): 436-438
 - Figuerola J, Green AJ (2000): Hematozoan parasites and migratory behaviour in waterfowl. *Evolutionary Ecology* 14: 143 - 153
 - Finch CE (1990). *Longevity, Senescence and the Genome*. University of Chicago Press, Chicago
 - Fisher RA (1930). *The Genetical Theory of Natural Selection*. Clarendon Press, Oxford
 - Folstad I, Karter AJ (1992) Parasites, bright males and the immunocompetence handicap. *American Naturalist* 139: 603-622.
 - Gauthreaux SA (1982) Site fidelity and Nomadism. En *Avian Biology Vol. VI* (D.Farner eds.), pp 144-146. Academic Press, New York
 - Gibson RM (1990) Relations between blood parasites, mating success and phenotypic cues in male sage grouse *Centrocercus urophasianus*. *Amer. Zool.* 30: 271-280.
 - Godfrey RD, Fedynich AM, Pence DB (1987). Quantification of hematozoa in blood smears. *Journal of Wildlife Diseases*, 23 (4): 558-565
 - Greiner EC (1975) Prevalence and potential vectors of *Haemoproteus* in Nebraska morning doves. *J. Wild. Dis* 11: 151 - 157
 - Guenette SY, Tanzi RE (1999). Progress toward valid transgenic mouse models for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 20: 201-11
 - Hawkey CM, Samour HJ (1988): The value of clinical haematology in birds. En *Exotic Animals*, ER Jacobsen and GV Kollias (eds) Churchill Livingstone. New York
 - Holmes DJ, Austad SN (1995). The evolution of avian senescence patterns: implications for understanding primary aging processes. *Amer. Zool.* 35: 307-317

-
- Holmes DJ, Fluckinger R, Austad SN (2001) Comparative biology of aging in birds: an update. *Exp Gerontol* 36: 869-83.
 - Holmes DJ, Ottinger MA (2003) Birds as long-lived animal models for the study of aging. *Experimental Gerontology* 38:1365-1375
 - Holmstad PR, Skorping A (1988) Covariation of parasites intensities in willow ptarmigan *Lagopus lagopus*. *Canadian Journal of Zoology* 76: 1581-1588
 - Ilmonen P, Hakkarainen H, Koivunen V, Korpimäki E, Mullie A, Shutler D (1999) Parental effort and blood parasitism in Tengmalm's owl: effects of natural and experimental variation in food abundance. *Oikos* 86: 79-86
 - Kirkpatrick CE, Robinson S, Kirton UD (1991) Phenotypic correlates of blood parasitism in the common grackle. En *Bird-Parasite interactions* (Loyle & Zuk eds.) Oxford University Press. Oxford pp. 344-358
 - Kitron, U.D. & Higashi, G.I. (1985): *Schistosoma haematobium* in Upper Egypt; analysis of dispersión patterns. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 34: 331 – 340
 - Korpimäki E, Hakkarainen H, Bennett GF (1993) Blood parasites and reproductive success of Tengmalm's owl: detrimental effects on females but not on males? *Funct. Ecol.* 7: 420-423
 - Korpimäki E, Tolonen P, Bennett GF (1995) Blood parasites, sexual selection and reproductive success of European kestrels. *Ecoscience* 2: 335-343
 - Kristal BS, Yu BP (1992) An emerging hypothesis synergistic inductions of aging of free radicals and Maillard reaction. *J. Gerontol. Biol. Sci* 47: B107-B114
 - Kurtz J, Van der Veen IT, Ryder JJ (2002). Ecological immunity of arthropods – a thread of Ariadne? *TREE* 17: 204–205.
 - Lack D (1949) Vital statistics from ringed swallows. *Brit. Birds* 42: 147 - 150
 - Lin S, Ford E, Haigis M, Liszt G, Guarente L (2004). Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH. *Genes & Development* 18:12–16
 - de Lope, F (1983) La reproducción d'*Hirundo rustica* en Extremadura (España). *Alauda* 51: 89-91.
 - de Lope F, da Silva E. (1988). La fidelidad al lugar de nidificación o de nacimiento en el avión común (*Delichon urbica urbica* L.) en Badajoz, España. *Ardeola*, 35 (1): 51-58

-
- de Lope F, Møller AP (1993). Female reproductive effort depends on the degree of ornamentation of their mates. *Evolution* 47: 1152-1160
 - de Magalhães JP (2003). Winning the war against aging. *The Futurist*, 37(2): 48-50.
 - de Magalhães JP (2005). Open-minded scepticism: inferring the causal mechanisms of human ageing from genetic perturbations. *Ageing Research Reviews* 4: 1-22.
 - Markus MB (1972) Pathogenicity of *Haemoproteus columbae*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 66: 186-187.
 - Marzal A (2001) Prevalencia e intensidad de parásitos hematozoos en el avión común (*Delichon urbica* Linneo 1758). Tesis de Licenciatura. Universidad de Extremadura
 - May RM (1984) Ecology and population Biology. En *Tropical and geographical medicine* (ed. KS Warren and AAF Mahmoud), pp. 152 – 166. McGraw – Hill, New York
 - McCurdy DG, Shutler D, Mullie A, Forbes MR (1988) Sex-biased parasitism of avian hosts: relations to blood parasite taxon and mating system. *Oikos* 82: 303-312
 - Medawar PB (1952). *An Unsolved Problem in Biology*. H. K. Lewis, London
 - Merilä J, Björklund M, Bennett GF (1995) Geographic and individual variation in hematozoan infections in the greenfinch, *Carduelis chloris*. *Can. J. Zool.* 73: 1798-1804
 - Merino S, Potti J (1995). High prevalence of hematozoa in nestlings of a passerine species, the pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*). *Auk* 112: 1041-1043
 - Merino S, Potti J, Fargallo JA (1997) Blood parasites of some passerine birds from Central Spain. *Journal of Wildlife Diseases* 33: 638-641
 - Merino S, Martínez J, Barbosa A, Møller AP, de Lope F, Pérez J, Rodríguez-Caabeiro F (1998). Increase in a heat shock protein from blood cells in response to parasitism of nestling house martins (*Delichon urbica*): An experimental approach. *Oecologia* 116: 343-347
 - Merino S (1999). Obtención de muestras sanguíneas para el estudio de las interacciones hospedador-parásito. *Etología* 17: 21-30

-
- Merino S, Moreno J, Sanz JJ, Arriero E (2000) Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). Proc. R. Soc. Lond. B 267: 2507-2510
 - Miller RA (1996). The aging immune system. Primer and prospectus. Science 273: 70-74
 - Miller RA (1990). Aging and the immune response. En *Handbook of the Biology of Ageing* (E. L. Schneider & J. W. Rowe, eds). Academic Press, New York
 - Møller AP, Erritzoe J (1998) Host immune defence and migration un birds. Evolutionary Ecology 12: 945 – 953
 - Møller AP, de Lope F (1999) Senescence in a short-lived migratory bird: age-dependent morphology, migration, reproduction and parasitism. Journal of Animal Ecology 68: 163-171
 - Monnier VM, Sell DR, Ramanakoppa HN, Miyata S (1991) Mechanisms of protection against damage mediated by the Maillard reaction in aging. Gerontology 37: 152-165
 - Nagel JE, Yanagihara RH, Adler WH (1986). Cells of the immune response. En *Handbook of the Cell Biology of Ageing* (V. J. Cristofalo, ed.). CRC Press, Boca Raton, FL, USA
 - Norris K, Anwar M, Read AR (1994) Reproductive effort influences the prevalence of hematozoan parasites in great tits. Journal of Animal Ecology 63: 601-610
 - Olsen OW (1974) Animal parasites. University Park Press, Baltimore.
 - Olsen GH, Gaunt SD (1985) Effects of haemoprotozoal infections on rehabilitation of wild raptors. J. Am. Vet. Med.Assoc. 187: 1204 - 1205
 - Oppliger A, Christe P, Richner H (1997) Clutch size and malarial parasites in female great tits. Behavioural Ecology 8: 148-152
 - Ots I, Hôrak P (1996) Great tits *Parus major* trade health for reproduction. Proc. R. Soc. Lond. B. 263: 1443-1447
 - Ots I, Hôrak P (1998) Health impact of blood parasites in breeding great tits. Oecologia 116: 441- 448
 - Peirce MA, Mead CJ (1978) Hematozoa of British birds III. Spring incidence of blood parasites of birds from Hertforddshire, especially returning migrants. J Nat Hist 12: 337 - 340

-
- Plowden J, Renshaw-Hoelscher M, Engleman C, Katz J, Sambhara S (2004). Innate immunity in aging: impact on macrophage function. *Aging Cell* 4: 161-167
 - Reddy PH, McWeeney S, Park BS, Manczak M, Gutala RV, Partovi D, Jung Y, Yau V, Searles R, Mori M, Quinn J (2004). Gene expression profiles of transcripts in amyloid precursor protein transgenic mice: up-regulation of mitochondrial metabolism and apoptotic genes is an early cellular change in Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics* 13: 1225-1240.
 - Rheinwald G (1975) The pattern of settling distances in a population of House martins *Delichon urbica*. *Ardea* 53: 136 – 145
 - Rheinwald G, Gutscher H, Hormeyer K (1976) Einfluss des Alters der Mehlschwalbe (*Delichon urbica*) auf ihre Brut. *Vogelwarte* 28: 190 – 206
 - Richner H, Christe P, Oppliger A (1995) Parental investment affects prevalence of malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1192-1194
 - Ricklefs RE (2000) Intrinsic aging-related mortality in birds. *Journal of Avian Biology* 31: 103-111
 - van Riper III C, van Ripper SG, Goff ML, Laird M (1986) The epidemiology and ecological significance of malaria in Hawaiian land birds. *Ecological Monograph* 56: 327-344
 - van Riper III C, Atkinson CT, Seed TM (1994). Avian Malaria. En. *Parasitic Protozoa Vol. 7*, 2nd Edition. JP Krier & JR Baker (eds.). pp. 71-138. Academic Press, New York
 - Rogina B, Reenan RA, Nilsen SP, Helfand SL (2000). Extended life-span conferred by cotransporter gene mutations in drosophila. *Science* 2000 290: 2137-2140.
 - Saino N, Ferrari RP, Romano M, Rubolini D, Møller AP (2003). Humoral immune response in relation to senescence, sex and sexual ornamentation in the barn swallow (*Hirundo rustica*). *J Evol Biol* 16: 1127-1134
 - Sanz JJ, Arriero E, Moreno J, Merino S (2001) Interactions between hemoparasite status and female age in the primary reproductive output of pied flycatchers. *Oecologia* 126: 339-344
 - Scheuerlein A, Ricklefs RE (2004) Prevalence of blood parasites in European passeriform birds. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 271: 1363-1370

-
- Seutin G (1994) Plumage redness in redpoll finches does not reflect hemoparasitic infection. *Oikos* 70: 280-286
 - Siikamäki P, Rätti O, Hovi M, Bennett GF (1997): Association between haematozoan infections and reproduction in the pied flycatcher. *Functional Ecology* 11: 176-183
 - Sol D, Jovani R, Torres J (2000) Geographical variation in blood parasites in feral pigeons: the role of vectors. *Ecogeography* 23: 307-314
 - Sorci G, Møller AP (1997) Comparative evidence for a positive correlation between haematozoan prevalence and mortality in waterfowl. *Journal of Evolutionary Biology* 10: 731-741.
 - Sprott RL, Austad S (1996). Animal models for aging research. En Schneider EL, Rowe JW, editors. *Handbook of the Biology of Aging*. 4th ed. Academic Press, Orlando
 - Sundberg J (1995) Parasites, plumaje coloration and reproductive success in the yellowhammer, *Emberiza citrinella*. *Oikos* 74: 331-339
 - Svensson L (1992). Identification guide to European passerines. Fingraf, Sweden
 - Turner AK (1994) TheSwallow. Hamlyn Species Guides. Hamlyn Limited, London.
 - Valkiunas (1991) The role of seasonal migration in the distribution of Haemosporidia of birds in North Palearctic. *Ekologija* 1993: 57 – 73.
 - Wakelin D (1996). Immunity to parasites: How parasitic infections are controlled. Cambridge University Press, Cambridge
 - Weatherhead PJ, Bennett GF (1991) Ecology of Red-winged Blackbird parasitism by haematozoa. *Canadian Journal of Zoology* 69: 2352-2359
 - Weatherhead, P.J. & Bennett, G.F. (1992): Ecology of parasitism of brown-headed cowbirds by haematozoa. *Canadian Journal of Zoology* 70: 1-7
 - White GC (2000) Programa “Mark and Recapture Survival Rate Estimation” versión 1.9
 - Wiehn J, Korpimäki E (1998) Resource levels, reproduction and resistance to haematozoan infections. *Proc. R. Soc. Lond. B* 265: 1197-1201
 - Wiehn J, Korpimäki E, Pen I (1999) Haematozoan infections in the Eurasian kestrel: effects of fluctuating food supply and experimental manipulation of paternal effort. *Oikos* 84: 87-98

- Williams GC (1957). Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. *Evolution* 11: 398-411
- Yamada KA, Sherman IW (1979) *Plasmodium lophurae*: composition and properties of hemozoin, the malarial pigment. *Experimental Parasitology* 48: 61-74
- Zuk M (1991) Reproductive strategies and disease susceptibility: an evolutionary viewpoint. *Parasitology Today* 6: 231-233

Conclusiones

Teniendo en cuenta los objetivos planteados en el capítulo de Introducción general, y a tenor de los resultados obtenidos, las conclusiones que podemos deducir del presente trabajo de tesis son las siguientes:

1. Los parásitos maláricos pueden tener efectos dramáticos sobre las variables demográficas de sus hospedadores, como demuestra el hecho del incremento significativo del tamaño de puesta, éxito de eclosión y éxito reproductor tras la reducción experimental de la prevalencia e intensidad de parasitismo. De hecho, existen efectos considerables de los parásitos sanguíneos en el tamaño de las poblaciones de sus hospedadores, pudiendo afectar a la contribución relativa de las diferentes poblaciones y al total del tamaño poblacional debido a diferencias en productividad de distintas poblaciones causadas por el impacto de los parásitos.

Malarial parasites can have dramatic effects on their hosts' demographic variables, as demonstrate the significant increase in clutch size, hatching success and reproductive success when the infection was experimentally reduced. Therefore, there are considerable effects of blood parasitism on the size of the post-breeding population of hosts, and this may affect the relative contribution of different populations to the overall population size of hosts across their range due to differences in population productivity.

2. La reducción experimental del parasitismo no tuvo ningún efecto en la condición corporal de los volantones, probablemente debido a un cese del efecto del tratamiento experimental anti-malárico con el tiempo o a un ajuste del esfuerzo parental al tamaño de cría.

Reduction of experimental infection has no effect on phenotypic quality of the nestlings, probably due to a drop of treatment effects on infection status, or an adjustment of parental effort to brood size

3. La producción de una respuesta inmune es costosa en términos de estrategias vitales, como demuestra el descenso en el éxito reproductor de las hembras a las que se les indujo experimentalmente una respuesta inmune

There is a life history cost of producing an immune response, as demonstrate the decrease of reproductive success in immune challenged adult females

4. Los costes de la respuesta inmune se concretaron en nuestro estudio en un retraso en el comienzo de la reproducción, una reducción en el éxito reproductor y un aumento de la infestación por parásitos. Estos costes podrían ser especialmente significativos y acusados en las estrategias vitales de poblaciones de aves que sufren un fuerte impacto de los parásitos en su éxito reproductor, como es el caso del Avión Común.

Life history costs of immunity in our study were that a challenge of the immune system of adult females caused a significant delay in start of reproduction, a reduction in overall reproductive success, and an increase in the abundance of parasites. These costs of immunity could be especially significant in a colonial passerine bird with strong impact of parasites on reproductive success, like House martin

5. No encontramos efectos provocados por la inducción experimental de una respuesta inmune sobre la calidad fenotípica de los descendientes, lo que nos sugiere que los costes de la inmunidad fueron pagados directamente por las hembras.

We did not find any effects of experimental treatment on phenotypic quality of nestlings, suggesting that the costs of immunity were paid directly by reproducing females

6. La distribución de andrógenos en las yemas de los huevos es muy costosa y constituye una inversión dependiente de la condición corporal, como demuestra la menor concentración de andrógenos en las puestas de reposición de las

hembras a las que se les indujo experimentalmente una respuesta inmune en referencia a las hembras del grupo control

Yolk androgen allocation is costly and this constitutes a condition-dependent investment, as shown the less androgen concentrated reposition clutch from experimentally immune-challenged females than control females

7. Con relación a la anterior conclusión, las hembras que realizaron una puesta de reposición tuvieron niveles de testosterona en las yemas de las primeras puestas significativamente mayores que aquellas hembras que no pudieron realizar puestas de reposición. Esta evidencia reafirma nuestra idea de la dependencia de la condición corporal de la deposición de andrógenos en la yema.

Related to previous conclusion, females who were able to lay a reposition clutch also had higher testosterone levels in their first clutches than those were not able to lay a reposition clutch. This evidence support our idea that yolk androgen deposition was a condition dependent trait

8. No hubo diferencias en la concentración de andrógenos en la yema dependiendo del sexo del embrión

There were no differences in yolk androgen concentration between sexes

9. La concentración de andrógenos en la yema se incrementó con el orden de puesta, de forma similar que se ha encontrado en estudios previos

Yolk androgen concentration increases with laying order, as previous studies shown

10. En los individuos analizados se encontraron cuatro especies de parásitos sanguíneos: *Haemoproteus*, *Trypanosoma*, *Leucocytozoon* y una microfilaria de nematodo no identificado.

We found four blood parasites genus in analysed individuals: Haemoproteus, Trypanosoma, Leucocytozoon and an unidentified nematode microfilaria

11. La especie de hemoparásito con mayor prevalencia en el Avión Común fue *Haemoproteus*, apareciendo infectados más de la mitad de los individuos de la población. En cambio, en Golondrinas Comunes la mayor infección correspondió a *Trypanosoma*, con prevalencias en torno al 20%.

The highest prevalence found in House martins was the genus Haemoproteus (more than 50 %). In contrast, the highest prevalence in barn swallows was the genus Trypanosoma (20 %)

12. La presencia de pollos y juveniles de Avión Común infectados por *Haemoproteus* y *Trypanosoma* nos indica que la transmisión de la infección puede ocurrir en su área de cría, con lo que los vectores apropiados para dicha transmisión deben encontrarse también en la localidad de cría

The findings of infected nestlings show that transmission of infection may take place in the breeding area, so suitable vectors also may be there

13. Comprobamos que la prevalencia e intensidad de infección por hemoparásitos aumenta con la edad en estas poblaciones naturales de aves estudiadas, comenzando a notarse los efectos del parasitismo a edades tempranas, siendo éste un patrón común en las dos especies de hirundínidos analizadas.

*We show that prevalence and intensity of protozoan parasites infection increases with age in natural populations are related to the expression of their hosts senescence in three natural populations of two different avian species (*Delichon urbica* and *Hirundo rustica*), These effects of parasitism start to be evident at early ages*

14. De forma similar, el sistema inmune de los individuos de las dos especies analizadas se deteriora con el envejecimiento, constatado por el descenso en el

número de leucocitos circulantes en los individuos conforme avanzan en edad, pudiendo ser la causa del aumento de la infección antes reseñado.

Similarly, immune system in both analysed species deteriorates with age, as decrease in circulating leukocytes shown. It could cause the increase in blood parasites as they grow old

15. Al estudiar comparativamente la prevalencia de infección en las poblaciones de Aviión y Golondrina en referencia a la edad exacta conocida de los individuos analizados, observamos que ésta aumentó con la edad desde el estadio juvenil hasta alcanzar un máximo en individuos de 3 años, siendo menor en individuos de edad más avanzada. Estas diferencias podrían deberse a que los individuos que alcanzaron una edad madura son aquellos que previamente no han estado expuestos a la infección, o bien han sido capaces de desarrollar un sistema inmune eficiente que les permite atenuar o anular los efectos de la infección, o incluso pudieran desarrollar una cierta inmunidad adquirida tras una exposición previa a la infección

With a comparative test of prevalence of infection among three natural populations of two different avian species we show that the most prevalence of infection happens around two years old individual, and decreases in older birds. It could be because these older birds had no exposition to infection, or because they have a strong immune system to fight against parasites

**Senescence, Parasitism,
Immunity and Breeding
success in House martin
(*Delichon urbica* Linneo 1758)**



Alfonso Marzal Reynolds

DOCTORAL THESIS November 2005

Departamento de Ciencias Morfológicas,
Biología Celular y Animal

UNIVERSITY OF EXTREMADURA

UNIVERSITY OF EXTREMADURA

FACULTY OF SCIENCES

Department of Morphological Sciences, Cellular and Animal Biology



“Senescence, Parasitism, Immunity and Breeding success in House martin (*Delichon urbica* Linneo 1758)”

reported by the graduate Mr. Alfonso Marzal Reynolds to obtain European PhD in Biological Sciences, under the doctorate program “Uso y Gestión de Recursos Faunísticos”, directed by Dr. Florentino de Lope Rebollo

VºBº Thesis Director

PhD student

Dr. Florentino de Lope Rebollo
Professor of Animal Biology

Alfonso Marzal Reynolds

To my parents and sisters

To Rocío

INDEX.

Chapter I	<i>INTRODUCTION, GENERAL METHODOLOGY AND OBJECTIVES</i>	
Introduction.....		9
General methodology.....		31
Objectives.....		33
References.....		34
Chapter II	<i>MALARIAL PARASITES DECREASE THEIR HOST'S REPRODUCTIVE SUCCESS</i>	
Abstract.....		50
Introduction.....		51
Material and methods.....		52
Results.....		54
Discussion.....		57
References.....		59
Chapter III	<i>LIFE HISTORY IMMUNE COSTS</i>	
Abstract.....		66
Introduction.....		67
Material and methods.....		69
Results.....		71
Discussion.....		77
References.....		80
Chapter IV	<i>IMMUNOLOGICAL COSTS OF YOLK ANDROGEN DEPOSITION</i>	
Abstract.....		85
Introduction.....		86
Material and methods.....		87
Results.....		88
Discussion.....		91
References.....		93

Chapter V *PARASITISM AS A SIGN OF SENESCENCE: A COMPARATIVE TEST IN
HIRUNDINES*

Abstract.....	101
Introduction.....	102
Material and methods.....	105
Results.....	106
Discussion.....	111
References.....	114

Chapter VI *CONCLUSIONES*.....123

Agradecimientos (in Spanish)

Esta historia comenzó hace ya muchos años, cuando un estudiante de Biológicas se acercó a un despacho soñando con pasar horas en el bosque estudiando el comportamiento de los animales, y acabó mirando por un microscopio y extrayendo ADN de los parásitos. O quizás comenzase antes, cuando despertó el interés por la Naturaleza en un niño. Pero lo realmente importante es que muchas personas han contribuido a que esta historia llegase a buen puerto. Vayan desde aquí de antemano mis agradecimientos y disculpas por si olvidase alguno en la cabeza, que no el corazón.

La primera persona a la que debo agradecer, y mucho, es a la que pertenecía ese despacho, mi director de Tesis, Florentino de Lope, que supo como nadie escuchar mis ideas y encauzarlas. A él le debo Jamás podré agradecerle todo lo que me ha dado. Gracias, Tinín, por la ocasión de trabajar junto a ti, por tus consejos, por tu dedicación y dirección en todos estos años.

Esta tesis se financió con los proyectos del Ministerio de Educación y Ciencia. BOS 2000-0293 y BOS 2003-01713, y una beca FPI de la Junta de Extremadura FIC 01A043. Gracias a estos organismos, y a la Universidad de Extremadura por darme la oportunidad y medios para realizar esta tesis. Quisiera también agradecer a Luis Marín y a todo el personal de la RUCAB el cuidar de los avioncitos y permitirme trabajar allí.

Gracias también a Anders Moller, que me abrió las puertas del laboratorio de la Universidad Pierre et Marie Curie de Paris, por su paciencia y ayuda. Todos estos años ha sido para mi “much more than an unofficial Director”

Otro gran culpable de que esto funcionase es Diego Gil, un burgalés “embrutesio”, gran investigador y mejor amigo. Gracias también a Helene, que siempre me escucha y se preocupa por mi vida. Y a Pablo y Oscar, por extensión.

A Maribel, simplemente porque sin tu inestimable ayuda jamás podría haber hecho nada, por tu constancia en el trabajo. Eres la mejor amiga que jamás podría tener.

A Santiago Merino, del Museo de Ciencias Naturales de Madrid, por enseñarme a examinar los frotis e identificar parásitos. No sé como lo hace, pero siempre saca tiempo para atenderme.

Quisiera agradecer a los profesores del departamento, los doctores Antonio Muñoz, Eduardo da Silva, Manuel Blasco, Ricardo Morán, Casimiro Corbacho, Carlos de la Cruz, José Luis Pérez y Juan Manuel Sánchez por su ayuda en todos estos años. A Ana, por su ayuda y disposición desde la secretaría. Y, por supuesto, a todos los

becarios José Antonio, Elena, Emilio, los dos Pacos, Pipe, Fátima, Mamen, Elsa, Berna, Chema, Noelia, Fernando y Nacho. Muy especialmente a Auxi y Bettina, por su enorme simpatía y ayuda. ¡Vosotras sois las siguientes! Y los que pasaron por aquí, Gema, Pedro, Carlos, Willy, Lola, Desi, Jesús, Pepo, Laszlo y Paola.

Muchísimas gracias también a Manolo Ramírez, Matilde Maqueda y Ana Muñoz, del laboratorio de Microbiología del Antiguo Rectorado, por prestarme vuestra ayuda y material para poner en práctica toda la parte de Biología Molecular.

A John Ewen, un simpático neozelandés que me introdujo en el mágico mundo de las PCRs. Él me enseñó a decir “hocus-pocus” cada vez que poníamos alguna a funcionar. Y, por supuesto, a todos los compañeros del Laboratoire de Ecologie Evolutive Parasitaire de Paris, que siempre me trataron como a uno más.

Gracias, Irene, por enseñarme que el azul es el color del atractivo, por abrirme los ojos al mundo e ilusionarme con mi trabajo. Y a Isabel, porque con su ayuda y simpatía las PCRs no nos derrotaron (y por esos míticos “chilaquiles”)

Mención aparte merecen todas las personas que me ayudaron “cogiendo pajaritos”. Yolanda, Carmen, Sara, Leticia, Rocío y Montse: vosotras fuisteis las primeras y juntos aprendimos el trabajo de campo. Y al equipo de ambientólogas que llegó después Ana, Puri, Marisol, María, Vicky, Iris, Antonia, Berta, Bea y Tamara. Muchísimas gracias, mis niñas, por toda vuestra ayuda en todos los días, por los madrugones, por los fines de semana que os robé, por las subidas y bajadas de la escalera.

A mis AMIGOS, así, con mayúsculas, porque son los mejores. Ellos son, junto a mi familia, los que más han sufrido mis ausencias y silencios. Gracias a Jorge, Sonia, Carlos, Inma, Ana, Luis y Gloria. Vuestro interés y ayuda durante todo este tiempo ha sido infinito. Con Javier y Ricardo, dos buenos amigos, pasé muy buenos ratos en el campo. Gracias a ti también, Ana, que durante mucho tiempo me animaste a seguir. No quiero olvidar a un gran amigo, catalán de nacimiento y extremeño de adopción y de corazón; gracias, José Luis, por tu interés y escucha.

Tampoco olvido a todos mis amigos y compañeros del colegio por su interés todos estos años. Gracias a Manolo y Clemen, Ángel y Santa, María, Pedro, Julio, Luis, Ángel, Inmaculada, Benedicto, José Antonio, Javi Rosa, Wenceslao, Jerónimo y muchos más. Dos personas merecen un apartado aparte en este capítulo. Juan, siempre dispuesto a escucharme. Y Guillermo, que me anima a seguir y me entiende como nadie; él no lo sabe, pero tuvo gran parte de culpa en mi elección por Biología. Y, por

supuesto, a todos mis alumnos de esos años, muy especialmente al curso de 1º y 2º A de esos años, que nunca los olvidaré. Gracias, Bea, por tu amistad e ilusión.

Estoy seguro que ningún trabajo se puede realizar si no hay amigos que se preocupen porque desconectes. Gracias Olmo, Sosa, José Ángel, Lolo y Gonzalo. Las almejititas son míticas en el patio de vecinos.

Gracias también a todos los Paquetes de la Uex, por dejarme divertirme con vosotros los miércoles. Gracias Javi, Antonio, Viti, Oyola, José, Juanfran, Agustín, Jesús, Javi Rivas, Julián.

A Lourdes, Gema, Maribel y Victoria, mi equipo de huroncitos, con las que viví las mejores aventuras. Juntos llegamos al fin del mundo, sufrimos los mosquitos de los bosques boreales y pasamos una noche viendo osos. Fueron mágicas esas vacaciones.

Mis padres y hermanas han sido mi apoyo fundamental todo este tiempo, siempre han estado empujándome a seguir. Gracias también a Coque, ¡uno más en la familia! Y a dos personas muy especiales, Pachuca y mi tía Lola, por su cariño incondicional.

Y, como no, gracias a ti, Rocío. Porque siempre me has querido, me escuchas y entiendes. Me has devuelto la ilusión y enseñado que los sueños se pueden cumplir.

Por último, quiero agradecer a tres buenas personas que tuvieron mucho que ver al principio. A Alfonso no le conocí pero me contaron mucho de él, al que me quise parecer desde que era niño. El segundo, Modesto, me cuidó en el campo como a un nieto. Y el tercero, Carlos. Fueron muchos días los que estuve junto a él, y mayores sus enseñanzas; todo el mundo conoce la admiración de un nieto por su abuelo.

Chapter I

Introduction, general methodology and objectives.

GENERAL INTRODUCTION

DETRIMENTAL EFFECTS OF MALARIAL PARASITES ON BREEDING SUCCESS OF THEIR HOSTS

What are parasites?

When we generally talk about parasites we usually think about going to the vet with our puppy, vaccines for travellers to exotic places or some of the diseases that affected both human and stock along the great economic damage that it may cause. The image of a disgusting worm comes quickly to our mind. In a colloquial way, could be said that parasites have a bad press. However, predators kill their preys and we conferred them human qualities such as courage or nobility, whilst in many cases parasites don't kill the individuals parasited, and yet many studies on the subject hadn't been able to demonstrate their negative effect. Therefore, this relation is much more complex than what it seems at first sight.

If we pay attention to the etymological origin of the word, parasite is an "individual that feeds himself together with another (individual)" (from Greek *para* = next to; *sita* = feed). This etymological definition is somehow very simple, when the interspecific relations that are established between parasite and their host go far beyond feeding. From the ecology point of view, parasitism is a relation between two species, one of which, the parasite, depends on the host to survive and exploit it by restricting its resources for the whole or part of its life. In other words, parasites use the host's resources to ensure its own survival and reproduction, reducing as a result the fitness of the host, exerting selective pressures over a wide range of characters of the life cycle of parasited individuals (Price 1980).

History of parasites study

Since a long time parasites attracted the attention of both doctors and naturalists, they observed how living animals were living inside the intestine or on the skin of pets and man. If we would like to carry out a historical research of the first study based on parasites we have to go back to a hieroglyphic set called “Eber’s papyrus” where two types of helminthic parasites that infected their patients were described by several Egyptian physicist (Bush *et al.* 2001). Great naturalist like Aristotle, Plinio the Eldest, Galen, Vitruvio and Columela talked about different kinds of parasites, above all the intestinal worms that affected pets and human beings. But it wasn’t until the development of modern Biology and the invention of microscope that real Parasitology history starts. Later, by discovering of haemosporidian *Plasmodium*, responsible for causing paludism by Laveran in 1880, and its transmission mechanism with the cooperation of vector insect *Anopheles* by Ross in 1897, Entomology and Parasitology took more relevance in human medicine and veterinary (Pérez-Iñigo 1976)

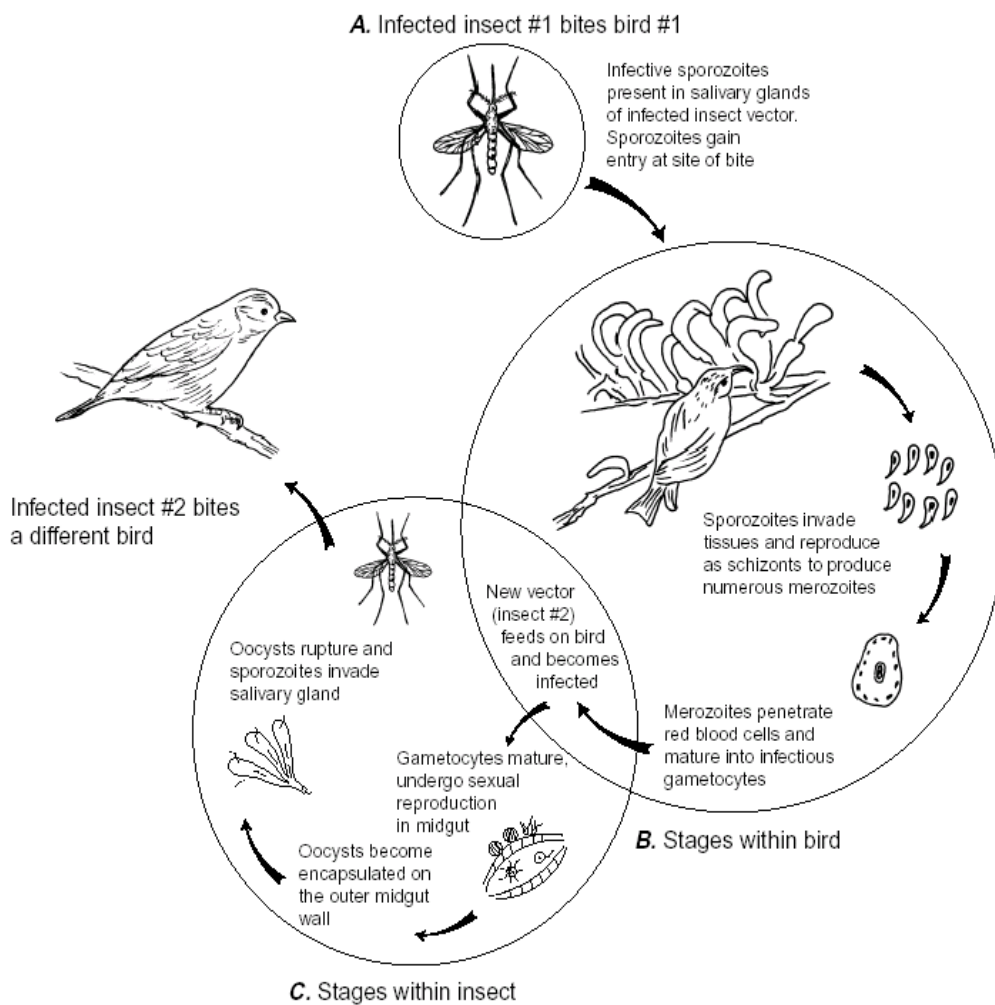
Phylum Apicomplexa: representatives and characteristics

Apicomplexa phylum representatives are intracellular parasites of reptile, birds and mammals that share some morphological and development characteristics (Levine 1985). Within this phylum we should enhance the importance of Suborder Haemosporina, consist of the following genders: *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* and *Plasmodium*. Its life cycle is quite complex (figure 1), developed in tissues and blood cells of its hosts (Garnham 1966). The transmission pattern from one host to another is carried out with the help of insects that belongs to Diptera order. Ectoparasites such as bugs (*Oeciacus*), louses (*Bruelia*), fleas (*Ceratophyllus*), flies (*Siphonaptera*) and mites (*Dermanyssus*) have also been described as potential vectors of blood parasites (Hill & Clark 1993; Clark *et al.* 1993).

The discovery of *Haemoproteus* bird parasites, the first vertebrate host in which its presence was confirmed, was carried out by Danilewsky in 1889. These initial observations only refer to the shapes of gametocytes that were observed in red corpuscles. Labbé (1894) proposed the name of *Halteridium* to this morphology, because of it’s the most frequently form seen in red blood cells parasited (Covaleda & Gállego 1950). Recently, a great advance has taken place as far as identification and

phylogeny studies of haemosporidian parasites is concern, partly thanks to the application of molecular techniques based on DNA amplification (i.e. Bensch *et al.* 2004; Pérez-Tris *et al.* 2005)

Fig. 1 Complex life cycle of haemosporidian parasite begins with (A) vector insect biting. The different development stages of infection occur separately in (B) host bird and (C) vector insect. (Taken from Atkinson 1999)



Avian haemosporidian have a widespread distribution and a great prevalence, having been identified in the 68% of bird species examined (Atkinson & van Ripper 1991). This wide distribution turns them into an excellent model for the study of host-parasite interactions. More than 450 species of different blood parasites have been described among the 4.000 bird species worldwide spread (Bishop & Bennett 1992).

Haemoproteus (figure 2) is the most common gender being identified in the 67% of the infected birds (Atkinson y van Ripper 1991).

Figure 2. Microgametocyte of *Haemoproteus* inside a red blood cell of a House martin (Photo A. Marzal)



Anyway, some families are more liable to be infected than others. The reasons for these differences are not totally studied, though could be due to weather and some other environmental factors, differences in habitats or behavioural, absence of suitable vectors or even a host specificity as a result of a host-parasite co-evolution with time. In fact, many *Haemoproteus* species have a relative host-specificity; they are restricted to close host species, even within the same family (Atkinson 1986).

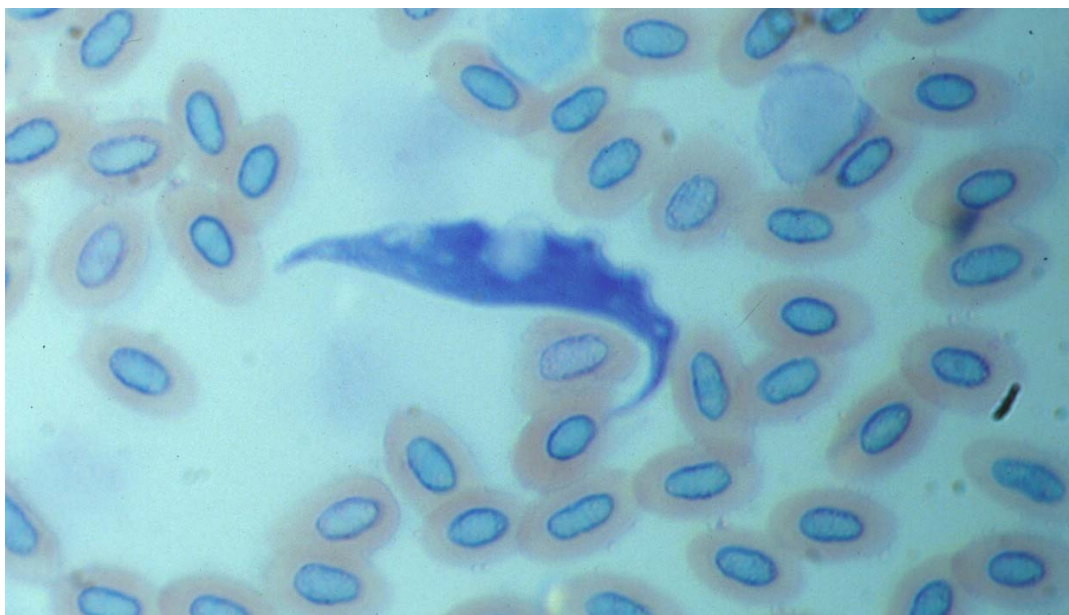
Another common parasite are those zooflagelated protozoan that belong to Zoomastigophora Class, such as *Trypanosoma* Gender (figure 3), whose representatives are present in all vertebrates blood and are responsible for illnesses like Chagas (*Trypanosoma cruzi*) and Sleeping illness (*T. brucei*). Its principal transmission pattern is by insect's bites (Hickman *et al.* 1998).

The infections caused by haemosporidian species might persist for years or even last during the whole host life (Bishop *et al.* 1938; Sergent & Sergent 1952; Ahmed & Mohammed 1978). Individuals affected can develop some kind of resistance against

infection by an counterpart stock, and very often, they slow chronicle or latent infection that are not detectable until they are reactivated by a rise of hormones level (spring relapse) or environmental or physiological stress (Atkinson & van Ripper III 1991).

Infection pathological effects by blood parasites can be correlated with his stage of development and life cycle on tissues and cells of the host's blood flow, following a characteristic pattern consisting of different clinical phases that it's shared by some genders: initial, acute, critic and latent or chronic (Atkinson & van Ripper III 1991).

Figura 3. *Trypanosoma* in the blood flow of House martin (*Photo A. Marzal*)



Parasite diversity and abundance

Parasitism is one of the most common types of interactions in nature, thus parasites can be viruses, bacteria and fungi, even metazoan organisms. Back in the past it was believed that more than 10% out of nearly 2 million species discovered follow a parasite condition. On the other hand, Peter Price Peter Price (1980) stated that parasitism is the most common way to use a resource; he also believed that more than half of this number of species are parasites. So how many parasites species really are? Undoubtly there is a great diversity and abundance parasites. As an example, it's calculated that there is between 10 and 100 times more that the 2.000 species of nematodes parasites described (Poulin 1996). It's been also revealed that parasitism is

one of the most common lifestyle followed by other worms phyla such as Platelminta. To get over doubts just to see the study of Cathy Toft (1986), who counted the number of parasite and non-parasite species among all the phyla known resulting that more than 50% of all the species are parasites.

We already know that parasites are very spread and we can find them in Five Kingdoms. But, which is the real abundance in one ecosystem? If we represent the number of parasites in the different communities in an ecosystem there is no doubt that they will be the most numerous ones, showing the classical number of individuals in the inverse trophic pyramids representation. However, what biomass do they contribute to the ecosystem? It has generally been consider that this biomass is insignificant (e.g. Polis 1999), but we should wonder whether this statement is true or not. A very illustrative study by Kevin Lafferty and Armand Kuris (see review in Hudson 2005) can give us the key. They calculated the biomass supplied by the trematodes of the gasteropod in Carpinteria salt marsh. In a very illustrative way they indicate that the biomass with which parasites contribute in that 70 Ha extensions was equivalent to that a 7 elephants herd with a high reproductive rate. If take into account that the average weight of an adult elephant varies around 3 tons, we cannot forget the idea that the impact on the ecosystem must be very important.

All this give us an idea of how important is the roll that parasites play in almost every aspect of evolutionary biology of living beings and birds in particular. Many surveys asses that bird parasites are very important in its host's ecology, but surprisingly most of the studies on ecology and evolutionary biology virtually ignored them, even when it may be the most important reason for host's death (Price 1980). Just recently Scientifics have realized the benefits of using data from parasites prevalence and intensity to give us answers about ecological, behavioural and evolutionary questions (Atkinson & van Riper III 1991). Why do we forget parasites? We could came across many reasons to explain this forget fullness. Firstly, parasites are hard to observe. They are very small (microscopically in many occasions), they live inside other organisms and ecologists don't pay attention to them when sampling ecosystems and communities. Secondly, if accidentally found, its appearance is usually disgusting to us. Something that can't be avoided when sampling is to have a revolting impression when a parasite is found inside an animal. No student has the idea of spending his time counting flat worms instead of researching about the alpha-male hierarchical behaviour in a wolf herd. Thirdly, (the most important reason for many researchers) parasites

effects can be very subtle. For instance, we could observe predation, but it would be very unlikely that we came up with the idea that the real reason why a prey is eaten by predator instead of another one is due to the difference of parasite load between them (Temple 1986; Møller & Erritzoe 2002). Or we will get to the point where interspecific competence determines plant species distribution along an environmental gradient, but we won't be able to realize that it was a fungi infection that favoured one of the species (Saikonen *et al.* 1998). As it's seen in these simple examples, the mechanisms that lead to this situation are very subtle, though have great importance on the final effect. We shouldn't forget that parasites are an essential part of ecosystems as a selective factor to regulate populations, interacting with other factors like predation (Møller & Erritzoe 2000). For all these reasons it's essential to take into account the effects that parasites have on communities and ecosystem studies

Co-evolution and Specificity

In this scene antagonism interactions are developed between hosts and its capacity to fight against parasite infection and parasite itself, which tries to make the most of its benefit (Festa-Bianchet 1989; Stearns 1992; Forbes 1993). So, hosts try to avoid costs from parasitism by developing efficient antiparasites defences, meanwhile parasites try to get over these defences mechanisms by developing more virulent weapons (Futuyma & Slatkin 1983). This co-evolutive antagonism is known as "Red Queen Hypothesis" (Van Valen 1973), which took its name after a chapter from "Alice's adventures in wonderland & Through the Looking-Glass" by Lewis Carroll (1872). According to this tale, Alice and the Red Queen have to run non-stop to stay in the same place. In a similar way, parasite and host run (evolutionarily) as fast as they can to keep themselves in the same situation avoid, therefore, the extinction of any of them

This co-evolution has given place to one of the most important parasite characteristic: specificity. When we say specificity we mean the mutual adaptation of a parasite to the host, also including the parasite restriction to one host or a group of hosts (Cheng 1986). A great level of specificity means that the host-parasite interactions are so delicate that one parasite couldn't live in other host (Noble & Noble 1976) as result of a long-time co-evolution. It implies that parasites have the risk to be extinguished if host

would do. In the other hand, a lower level of specificity could be reflected of a wide adaptative capacity (Clayton & Moore 1997).

Virulence, pathogenicity and transmission

Since parasites live inside their host's body, for many years it was thought that the most host-parasite interactions keep in balance. In these evolutionary relationships it was also thought that virulence only could progressively go down until mutualism to parasite extinction, but environmental factors could move the balance between mutualism and antagonism (Herre *et al.* 1999). So, the idea of a relatively benign parasitism has been for many years, and only recently some modern theories about severe damages caused by parasites on their host have come (May & Anderson 1979; Toft 1991; Atkinson & van Riper III 1991).

Generally, by definition, when we thought about parasites only have in mind pathogenicity. On the other hand, others researchers, think that there are an unusual dualism, a balance between good and evil, in this relationship. Parasites can generate diversity (Janzen 1970), but they also cause extinction (Cunningham & Daszk 1998); they may castrate a host, but increase its growth rate (see review in Moore 2002); they can stimulate immune response, but at the same time encourage a secondary chronic infection (Hudson 2005).

When we talk about effects of parasites it usually has focussed on in their consequences over host population, without taken into account collateral effects affecting whole ecosystems and communities (Hudson 2005). So, talking about parasites, their effects and pathogenicity, we have to refer to consequences on their host population, without forgetting the regulation of whole ecosystem. Let's see then how parasites can modify the populations of their hosts and, indirectly, the processes of ecosystems.

Theories assumes in a logical way that the transmission of most parasites can be considered density dependent. So if a virulent pathogen is introduced into a susceptible host population it will reduce density but once density is reduced, transmission will fall and the population will not be extinguished. However, parasites could lead to local extinction when transmission is frequency dependent, independent of density but dependent on the contact rate between conspecifics, such as sexually transmitted diseases (Ginsber *et al.* 1995). Similarly vector borne disease are frequency dependent

since transmission depends on being bitten by a vector then the more often a host is bitten the more likely they are of being infected, irrespective of host density (Hudson 2005). Indeed vector borne diseases often exhibit inverse density dependence since as host density decreases, due to parasite induced mortality, so the remaining vectors focus on smaller and smaller number of hosts thus increasing the likelihood of them being exposed and dying from the vector borne disease. In this instance disease could drive to extinction (Hudson 2005)

Parasites and ecosystems

But, it would really important a specie extinction? And parasite extinction? The reasons to care for diversity are completely in. It could be argued that biodiversity is a source of natural resources to make economic products like food, drugs, ... (Do parasites contribute something in this point?). Second, biodiversity could be important because ethical, aesthetic or cultural reasons (but this is not the case of parasites). Third, biodiversity may contribute to provision of ecosystem services that are of value to society, such as primary, plant pollination or climate regulation. This third reason is the one where interest on biodiversity and ecosystem grows. Could the loss of biodiversity do affect the regulation of ecosystem? It could have verticals effects along the food chain leading to extinction to many species (Mork 1996), generating a cascade of population dynamics, physical and even evolutionary effects within ecosystems (see review in Loreau *et al.* 2005). In contrast, little is known on the other effects, horizontal (genetic, taxonomic and functional diversity within trophic levels). Many of these studies were focussed on theories of coexistence among competing species, where nich theory postulates that all species differ to some extent in the resources they use. This implies functional complementarity among species, and hence increased productivity and other ecosystem process (Tilman *et al.* 1997; Loreau 1998).

Many researches have demonstrated that parasites, besides their small size, are very important in ecosystem conservation. As a result, most ecologists and conservation biologists are aware that the introduction or elimination of a parasite in an ecosystem can strongly affect the interactions between a diverse range of species in the community. This way parasites could affect biodiversity in a horizontal way through parasite-mediated competition. The transmission of a parasite from one specie to other

more vulnerable would lead to a higher mortality or a reduction in resources exploitation in the latter one (Park 1948; Bonsall & Hassell 1997). The effects could also extend to prey and predators populations vertically (see review in Thomas *et al.* 2005).

In this line, final Conclusions of the Preliminary Evaluation of Global Warming Effects in Spain refers the higher virulence of parasites as one of the main impact on animal biodiversity (Moreno 2005). This idea gives more importance to parasites impact in ecosystems.

All these wide scale effects in ecosystems are result of combination of parasites interaction on their host populations. So, we should now explain the mechanisms of parasites to regulate them.

Do parasites regulate their host populations?

Last two centuries the factors to determine population's size in animals and plants have been studied. This regulation is density-dependence since only reduced fecundity or survival under high densities can regulate populations. In spite of everything, our knowledge of population regulation is still poor despite more than a century of research (see reviews in Begon *et al.* 1996; Newton 1998), maybe because some important factors contributing to population regulation have been forgotten, such as parasites (Møller 2005). Parasites will be able to regulate their host population when they reduce fecundity or the survival of the host. In this line, models from Anderson and May (Anderson & May 1978; May & Anderson 1978) were fundamental to understand how parasites can regulate them. This regulation will occur when the growth rate of the parasites exceeds that of the host population assuming that the parasite has a harmful effect on the survival or fecundity of the host population so the growth rate of the host population is reduced through the parasite induced effect (Møller 2005).

Macro-parasites tend to generate morbidity rather than mortality in the host, reducing the condition and the ability of the host to search for resources, defend a good territory or provide food for their offspring so heavily infected individuals tend to have the lower reproductive success and increased vulnerability to secondary causes of mortality such as predation or secondary infections (Møller 2005)

Bachk in time parasites were considered as low pathogenicity organisms in natural populations (Weatherhead & Bennett 1992; Bennett *et al.* 1993; Davidar & Morton 1993) in spite they cause diseases and death in captivity birds. Other studies demonstrated subtle but important effects of hematozoan parasites on the life history of their avian hosts (Rätti *et al.* 1993; Korpimäki *et al.* 1993; Allander & Bennett 1994; Korpimäki *et al.* 1995; Dufva 1996). However, some researchers did not find any detrimental effect of these parasites (Baker 1976; Fallis & Desser 1977; Weatherhead & Bennett 1991, 1992; Kirkpatrick *et al.* 1991; Weatherhead *et al.* 1993; Seutin *et al.* 1994; Dufva & Allander 1995; Korpimäki *et al.* 1995; Wagner *et al.* 1997; Dawson & Bortolotti 2000). As we see, there are no clear conclusions about parasite pathogenicity and, in addition, about the regulation of their host populations, probably due to scarcity of experimental manipulation in these studies. We shouldn't forget that demonstration of real effects of parasites needs for experimental manipulation of infection levels (Keymer and Read 1991; Merino *et al.* 2000).

Therefore, in the second chapter we show a research about detrimental effects of blood parasites on wild birds, by experimentally reduction of infection levels and studying the effect of this reduction over breeding success of host population

COSTS OF IMMUNE RESPONSE IN LIFE HISTORIES

What are life histories?

Imagine a newborn bird decide to plan accurately all its life. An aspect that must taken into account is that resources are limited, so it should pay attention not to waste them. Its mind would be filled with many questions like “At which age and size should I begin reproduction?”, “When I reproduce, how much time and energy should I allocate to reproduction, growth or body maintenance?”, “Should I have few nestlings but with higher size and more quality, or an elevated number of nestling but lower quality and less survival possibilities?”, “Should I live fast and die young?”, “How many nestlings should be sons or daughters?”, and especially, “Should I decide this just now, or it would be better to wait for contemporary social and environmental conditions?” Too much questions without margin of error. In all theses questions we can clearly see that what really matters is the individual genetic contribution to next generations, in other words, its *fitness*. Many factors will influence its decision, like childhood and adulthood duration, the length and intensity of growth period, ageing, reproduction, dispersal and colonization. All these factors have evolutionary implications and all together form *life histories*, which after all are the answers to previous questions.

Costs and trade-offs of life histories

Life histories have been selected to reach maximum in fitness, although we can sense that the best life history at a moment depends on the circumstances, because decision variable, the attribute to maximize and restrictions due to limited resources must be taken into account. There is no ideal organism to mature shortly after it is born, quickly reproduce and have many descendents with their father’s characteristics and lives forever. Why this Darwinian demon does not exist? Because there are several trade-offs and restrictions about body functions (like present and future reproduction), growth, survival and age at maturity. These trade-offs exist because costs (changes in traits that decrease fitness) and benefits (variations in traits that increase fitness). It must be waited that organisms develop at the point where net profit is maximum. Such a point, not always achievable, is affected by different life history traits and by the

influence of environmental conditions on mortality and fecundity (see Stearns & Hoekstra 2000).

The main trade-off affecting life histories is between present fecundity and residual reproductive value. Reproductive value of an individual at a certain age consists of probability to survive until next reproductive events, and present and future fecundity (Fisher 1930). This trade-off has costs, which origin can be ecological (to allocate resources to reproduction that should be set aside to avoid environmental risks such as escaping from predation or avoiding parasites) (Magnhagen 1991) or physiological, like to use limited resources (nutrients, energy, ...) in reproductive events, so they won't be able to use in other processes such as body maintenance (Moreno 1993).

Several studies have experimentally shown the costs of reproduction related to survival (see review in Moreno 2002), like lower survival probability (Nilsson & Svensson 1996; Daan *et al.* 1996), future fecundity decline (Deerenberg *et al.* 1996; Sanz 1997) or lower phenotypic quality of nestlings (Blondel *et al.* 1998). The question must be which are the mechanisms generating these costs. Some researchers indicate that one of the foremost is the susceptibility to predation (Cushing 1985; Shaffer & Formanowicz 1996), while in other species it is thought to be physiological mechanisms after reproduction such as post-nuptial moult (Nilsson & Svensson 1996). Nowadays, the most studies focus on the immune suppression effect of reproduction (Sheldon & Verhulst 1996), given the ubiquity and impact of parasites and diseases in the natural history of organisms.

The role of parasites on their host's life history

Parasites may play an important ecological and evolutionary role beyond the effects on host life history traits and evolutionary trade-offs (Thomas *et al.* 2000), because their ability to change such traits (fecundity, timing of reproduction, body size, ...) These changes could be by directly exploiting their hosts and/or by inducing them an adaptive response. Parasitic exploitation is per se an important cause of between-individual or between-population variation in the life history traits such as fecundity, growth, or survival (Thomas *et al.* 2005). Changes in host life history traits can also be an adaptive response to parasitism in order to compensate for the negative effects of

parasitism on fitness (Minchella 1985; Michalakis & Hochberg 1994). For instance, there are several examples that show that by reproducing earlier hosts may partly compensate for the losses due to the parasite (Minchella & Loverde 1981; Polak & Starmer 1998; Adamo 1999).

Life history and the cost of immunity

Parasites also have the potential to impose selective pressures on other life history traits such as growth (Agnew *et al.* 1999), dispersal (Heeb *et al.* 1999) or reproductive effort (Moreno *et al.* 1999).

Carrying on this line, there is a recent interest on study of immune defence against infections. There is a trade-off between immune defence and other life history traits, like reproductive effort. Several studies have shown that higher reproductive effort causes lower immune response (Deerenberg *et al.* 1997; Nordling *et al.* 1998), although other researchers also have experimentally tested the other way round, by producing an immune challenge and analysing the effects on breeding success (Ilmonen *et al.* 2000; Råberg *et al.* 2000).

Immune defence has several characteristics to make it different from other life history traits. For instance, because of risk of autoimmunity, optimal immune defence is not necessarily maximum immune defence. In this context there are two important types of cost associated to immune response. First type are those paid in functional or structural components of the organism, such as the alteration of a receptor that allows the recognition of the pathogen as nonself but altered the host's ability to recognize another pathogen as nonself (see review in Zuk & Stoehr 2002). The other type of cost associated with immunity is related to the allocation of essential but limited resources, such as energy and nutrients. These costs include (1) the development of immune system, (2) maintenance of the immune system in working order, and (3) the use of immune system to thwart a parasitic invasion (Klasing 2004)

Besides many of these studies suggest such costs are common, so far it doesn't known which are the causes that determine their magnitude neither if there are differences between host species, nor the net effect for diversity of the selective pressures exerted by parasites on host life history traits, so it's necessary to be examined

more carefully, from both ecological and evolutionary perspectives (Thomas *et al.* 2005)

For instance, several comparative studies of immune responses indifferent species of hosts have indicated very large differences in the strength of immune responses among species (e. g. Møller & Erritzoe 1996; Møller *et al.* 2001; Van Nouhuys & Hanski 2002). These variations could be result of differences in probability and frequency of transmission of parasites. These findings would imply those species suffer the most from parasites attack would have larger immunity costs.

With the aim of to know how immune response could shape host life history, in the third chapter we show an experimental study to directly quantification the cost of immune response in life history of a colonial passerine that suffer the most from negative effect of parasites on reproductive success.

IMMUNE COSTS OF YOLK ANDROGEN DEPOSITION

Yolk androgen deposition can modify offspring phenotype

The individual contribution to next generations is inexorably conditioned by Natural Selection process. So that this selection would act three conditions are essential: (1) (phenotypic) traits variation between individuals, (2) heredability of these traits, and (3) those who have these traits must have more chances to match, reproduction and/or survival (Endler 1986).

A trait is result of three components: genetic o hereditary, environmental and maternal (Falconer 1989). Genetic component is DNA inherited from parents, and it codifies for a certain trait and its development. Environmental component means the influence exerted by environment on phenotype expression starting from genotype. Finally, maternal compound means all the indirect effects that maternal genotypic could have on offspring phenotypic, such as maternal care, or quantity/quality of substances in the yolk with the embryo (see Soler 2002a). This embryo enclosed within the egg membranes and the shell with all the essential nutrients to develop, like proteins, fat, minerals and vitamins (Romanoff & Romanoff 1949; White III 1991). All of theses resources are costly, and strongly influence nestling fitness and survival (Williams

1994; Nager *et al.* 2000). However, only recently researches have focused on other yolk components that can have more subtle action during embryo development, and which can decisively influence offspring phenotype: hormones (Schwabl 1993)

Kinds of hormones in eggs

The main kinds of hormones found in birds' eggs are: testosterone (T), 5 α -dihydrotestosterone (DHT), estradiol (Schwabl 1993), androstenedione (A4) (Schwabl 1997), several thyroid hormones (McNabb & Wilson, 1997), progesterone (Lipar *et al.* 1999) and corticosterone (Downing & Bryden 2002). They are produced by female and transferred into the yolk egg during last days ovulation. However, we still don't know whether this transfer is an active or a passive one (see review in Gil 2003), but the fact that they are not inherent in the yolk and have an effect in offspring may show an accurate control of this transfer (Lipar *et al.* 1999).

Beneficial effects of yolk androgens

These hormones can have beneficial effects in the development of the embryo and the nestling, and even shape the phenotype of the adult bird (see review in Gil 2003). Experimentally manipulation of androgen levels in the eggs have shown direct physiological effects on nestling growth, like shortened embryo development (Eising *et al.* 2001) and faster growth rates (Lipar & Ketterson 2000), effects on nestling begging behaviour (Schwabl 1996a) and even higher social status once the bird achieves adulthood (Schwabl 1993).

Several studies have shown that androgen allocation in the eggs could be differential and adaptative to environmental conditions. For instance, some bird species females produced higher androgens levels in the yolk when matched to attractive males (Gil *et al.* 1999; 2004; 2005b) or when subjected to higher social stress (Groothuis and Schwabl 2002; Pilz & Smith 2004; Reed and Vleck 2001).

Differential androgen allocation depending on laying order

Other researches have brought forward proofs of differential androgen allocation in the yolk depending on laying order, showing an increase with laying order (Gil *et al.* 2005a; Pilz *et al.* 2003), decrease (Gil *et al.* 1999; Schwabl *et al.* 1997), or even no effect (Whittingham & Schwabl 2002). It has been proposed that these within-clutch variation in androgen levels with respect to laying order could be a mechanism to counteract the effects of hatching asynchrony in the brood, so if yolk androgens enhances begging and development, increasing levels of androgen with increasing laying order would favour the last egg of a clutch (Schwabl 1996a). On the contrary, decreasing of androgen levels with increasing laying order would reinforce the size hierarchy established by hatching asynchrony, contributing to reduce nestling aggressiveness and leading to a brood reduction in some species (Schwabl *et al.* 1997).

Differential investment in hormones depending on brood sex

Theory predicts that parents should differentially invest in sons and daughters if the return on fitness would differ between sexes. This return can depend on several factors such as sex ratio in the population, and the cost of producing sons or daughters (specially in sexual size dimorphic species) (Charnov 1982). Maternal androgens in egg yolk may be related to sex allocation in two ways (Groothuis *et al.* 2005). First, the same amount of androgens would have qualitatively or quantitatively different effect on both sexes. This would lead to quality differences between male and female offspring. Second, maternal hormone condition, its influence in yolk hormone levels, or even the later itself, may determine the sex of the embryo. This could be possible for two reasons: first, female is heterogametic sex in birds and therefore able to determine the sex of her eggs. Second, meiosis takes place after the rapid yolking phase, just before ovulation, and thus after the deposition of hormones. (see review in Pike & Petrie 2003). Results in several studies are inconclusive, although hormones seem to have sex-specific effects that should more often take into consideration. Moreover, androgen levels differ in eggs containing male and female embryos, and they could vary under environmental conditions or even laying order (see reviews in Gil 2003; Groothuis *et al.* 2005).

Cost of egg androgen production

But all these benefits must carry some costs, as differential allocation and covariation with female quality suggest. These costs can be paid either directly for nestling, either for the females, or even both. Firstly, chicks could not stand high testosterone levels, because elevated androgens could cause inhibition of growth and decrease in survival nestling (Sockman & Schwabl 2000), induction of oxidative stress (von Schantz *et al.* 1999), immune depression (Da Silva 1999; Folstad & Karter 1992), increasing detrimental levels of sibling competition leading to a maladaptive brood reduction (Mock & Parker 1997) or higher predation risks due to the increase in begging behaviour (Haskell 1994).

These costs also could be paid for the female. The possibility of direct costs for the mother assumes that yolk androgens synthesis is related to higher androgens levels in female bloodstream (Schwabl 1996b). These higher levels could have a wide array of costs, such immune depression or delay and reduction in reproduction (Searcy 1988; Nelson 2000). However, recent studies have revealed a more complex regulation, because in some species there is neither androgen immunosuppression nor effects depending on body condition (Hasselquist *et al.* 1999; Greenman *et al.* 2005).

To date we don't have evidences of any study experimentally shown the possibility that the cost may be paid directly by the female. With this propose, in the fourth chapter an experimentally study about immune costs of female yolk androgen deposition is shown, by analysing consequences on androgen production of an immune challenge

THE ROLE OF PARASITES IN THE EXPRESSION ON THE SENESCENCE

What is senescence?

Aging is a slow, progressive and, much to our regret, irremediable process. Unfortunately, we know yet neither an everlasting youth elixir nor a portrait like Mr. Dorian Gray had. The search for miraculous potions has been very productive, even though only from literary or marketing point of view, no scientific. With the passing of

time vital functions decline, and this fact lead to death in an irremediable way. In human beings, the improvements in hygiene and nutrition habits, next with advances in Medicine, have caused a drop in infectious-disease mortality. For instance, the life span in USA increased from 47 years old in 1900 to 78 years old in 1995 (Bloom 1999). But, unfortunately, it's not possible to enlarge maximum life span (Kirkwood 1996): the oldest age a man ever lived to date is 115 years, the same age as many centuries ago (Nesse & Williams 1995).

Senescence or ageing is the body deterioration as time goes by, increasing diseases susceptibility and decreasing damage repair ability. For example, ageing results in senescence of the gut-associated lymphoid tissue, and decreasing in gastric acid secretion (Feldman *et al.* 1996). The low pH of the stomach represents an important barrier to entry of enteric pathogens, so reduction in gastric acidity can increase the susceptibility to infections by these pathogens (Morris & Potter 1997).

It has been pointed out that it is an epistasic process that implies more than 100 different genes, besides numerous mutations affecting all ageing process. All these genes regulate three different levels process: molecular, cellular and organic (Pardo 2003).

Who does senescence operate on?

Do all living creatures age? Is the senescence a common process to all? A necessary condition to evolution of senescence is the separation between germinal line (that produces sexual cells) and somatic line (the rest of cells) (Buss 1987). This is the reason why vegetative-reproduced living beings do not age; only suffer from deterioration and extrinsic mortality (depredation, diseases, accidents). This way older age classes are reduced by simple accumulative effect. There are very little probabilities that an individual reaches old age alive and could reproduce, and in the case of this could happens, such reproduction would be invisible to Natural Selection (see review in Moreno 2002). So, first evolutionary explanations about senescence suggested it had beneficial effects on populations by controlling number of individuals and by avoiding overpopulations, and older individuals make way for the younger. However, there are no clear evidences in the wild to support the idea of senescence can regulate number of individuals (the most of death happens at younger age classes by extrinsic mortality)

(Lewis *et al.* 2001) and, also, group selection is considered a weak evolutionary force compared to selection at individual level (Williams 1966).

Non-adaptive evolutionary hypotheses are based on Natural Selection operating on the whole life cycle of an individual, from fecundation to death. Selective pressures operate with more intensity on early reproductive ages, while they are ineffective at older ages, when the chance to be alive in wild is almost non-existent (Medawar 1952; Hamilton 1966). This is because evolution operates on breeding success, and it must be waited that selective pressures decrease with age and disappear in post-reproductive age individuals. Even if there wouldn't be senescence, mortality rates will increase with age by simple extrinsic mortality accumulation and so Natural Selection would favour phenotypes with the most reproductive performance at early ages with minimum possibilities to death (Soler 2002b).

Evolutionary theories about aging

Senescence theories are nearly older than civilizations. Former scientists, who really were philosophers, argued that everyone was born with a predetermined quantity of some kind of vital matter. Once this matter was extinguished as time went by, everyone died. Many of modern theories about aging emerged from this idea and other old theories (Knight 2000). Although it isn't known exact molecular mechanisms determine senescence, it has been proposed several hypotheses about it, some of them non-exclusive each other. Let's see the main ones.

Probably one of the first contemporary ideas is the *Mutation accumulation theory of aging*, proposed by Medawar (1952). He maintains that deleterious mutations are accumulating in lifetime causing mortality dependent on age, specially in long-lived species. Natural selection hardly operates because of these mutations affect at late reproductive ages, so we must wait these mutations very often in old individuals by accumulative effect.

Another theory (2nd) proposes the existence of alleles with positive effect at early stages, but detrimental effects at older ages (*pleiotropic genes*). These genes would be selected due to greater contributions of the early on fitness (Williams 1957), as examples found in *Drosophila* (Rose 1991) and the nematode *Caenorhabditis elegans* (Friedman & Johnson 1988)

The third theory, *disposable soma* (Kirkwood 1977), links studies on Gerontology to Aging General Evolutionary Theory. Its fundamentals are Natural Selection must regulate allocation of metabolic resources among growth, soma maintenance and reproduction, due to limitation of available resources. It states that there is a trade-off between longevity and reproduction, so an individual who invests the most resources on body preservation will have fewer sons than other one which main investment is reproduction (Austad 1997; see review in Soler 2002b). To reach older ages requires an investment in somatic maintenance that reduces available resources to reproduction. So, several studies have shown the cost of reproduction, since it could decrease the efficiency of immune system (Moreno *et al.* 1999; Nordling *et al.* 1998). The theory predicts that ageing will be the result of non-repaired damage accumulations in soma, and those species with higher levels of somatic maintenance and reparation would be more long-lived.

The fourth theory refers to the role of *antioxidants* to capture free radicals that cause oxidative stress in cells. The basis fundament of this theory is the damages of macromolecules caused by oxygen-derived radicals generated incidentally and uncontrollable during aerobic metabolism. This deterioration is accumulated with age and mainly affects to DNA, proteins and lipids (Rodríguez & Céspedes 1999). The principal agents in charge of neutralizing this free radicals are enzymes and antioxidants compounds like vitamins, catalase and glutation peroxidase, which concentrations and activities decrease as ageing (Sohal *et al.* 1990; Benzi & Moretti 1995). All this cause an irreversible damage that are accumulating as time goes by, resulting in a gradual loose of functional capacity of the cell (Hayflick 1985; Medveded 1990).

In last years the idea of *telomeres* may play a role in the expression of the senescence has become important. Telomeres are the regions in the end of chromosomes. They are compound by repetitive sequences of DNA that don't encode to any particular gene. One of their essential functions is to prevent the rest of chromosomes from degradation and from joining the extremes of DNA to each other by the action of a repaired enzyme. Before division cell copies its DNA, but is not able to copy telomere entirely. As a result, telomeres get shorter every replication, losing about 50 to 3200 nucleotides every cell division (Harley *et al.* 1990)

The wear of telomere with many cellular cycles avoids its protective function, so chromosomes become unstable and mitosis errors, genetic anomalies and mutations are shown. The cells that suffer from these defects can't duplicate and programmed cellular

death processes are activated. So progressive loss of parts of telomeres on every cell division leads to senescence and cell death (Harley *et al.* 1990; Reddel 1998).

The last modern theory about senescence, similar to disposable soma, is proposed by Charlton *et al.* (1998) about *Preferential amplification of mutant clones*. It's base on differences of the genetic material in all the cells of a pluricellular organism. These differences are due to inevitable errors during copy of the genetic material starting from zygote. Many of these mutations are non-viable, so cells will die; other ones are detected and destroying by mutant cell mechanisms of identification and removal, but some are able to go on splitting and to form clones. Therefore an organism is a group of slightly different cells to cooperate between themselves in order to group breeding success as a whole, because is the only way to pass its genetic material (o part of it) to the next generation. If a mutant cell would appear, it could cancel all the cellular control mechanisms and expanding rapidly into the tissue, increasing its population to the detriment of the other cells of the tissue. If the older an individual is, the more cells division he had, it could happens that the cooperation between body cells is under optimum level, causing senescence-related phenomena. Along these lines, it has been demonstrated in muscular tissues the existence of mitochondria mutant clones. The accumulation of these clones leads to a reduction in ATP production (Johns 1996). In resume, organisms die due to their inability to repair damaged DNA.

Do parasites play a role in their hosts' senescence?

As we can see in all these theories, senescence implies a physiological decline that leads to death. One of the main ways this deterioration is seen is a functionality loss of immune system, particularly by changes in T-cells as individuals grow old, causing an ability reduction to fight against parasites and to prevent the expression of diseases (see review in Miller 1996). Several studies have shown that the drop in humoral immune response is related to senescence in wild birds (Saino *et al.* 2003; Cichon *et al.* 2003). Therefore, the emerge question is: Do parasites play an important role in their host's senescence? In theory, the answer is very simple. But yet there is no evidence in wild to demonstrate, because the even better study might be the one who allows to study the evolution of the same individual all through its life or, at least, several consecutive years.

With this purpose, on the fifth and last chapter thesis is shown a comparative test of prevalence and intensity of hemoparasites (*Trypanosoma* & *Haemoproteus*) and immune system in two related hirundines species (*Delichon urbica* e *Hirundo rustica*) referring to senescence, by capturing the same individual for several years.

GENERAL METHODOLOGY

HOUSE MARTIN, OUR STUDY BIRD

House martin (*Delichon urbica* Linneo 1758) is a colonial passerine bound to human environments. Its body mass varies between 16 and 20 g. House martin live on insects captured by flying. Its match system is monogamous, but extra-pairs copulations are frequently. Parental care is performed by both sexes. They usually build their nest in towns, specially on eaves, but also occasionally in rocks close to waters, mountain ranges, bridges or dams. It's worldwide distribution specie, occupying nearly all the Palaeartic, from Eurasia, Siberia, Central Asia to Formosa and Japan, and Northwester Africa. They breed in almost all regions in Iberian Peninsula, being the most frequent colonial hirundine in the Southwest. Breeding populations in Spain is nearly 2.150.000 pairs (de Lope 1997).

In Extremadura breeding season begins in March, and it ends in middle July (Pajuelo *et al.* 1992), while it lasts from May to October in northern localities (Lind 1960; Balat 1974; Møller 1974; Hund 1976; Kondelka 1978; Bryant 1979). Clutch sizes in Extremadura vary from 1 to 7 eggs, decreasing from first to third clutch. The most common clutch is 5 eggs on first clutch, 4 eggs on second clutch and 3 eggs on third clutch (Pajuelo *et al.* 1992). It might point out that this is the only one place in Europe where a pair could breed three times in the same breeding season (Pajuelo *et al.* 1992). The nests are an earthenware mud with a little gate. Many of the nests are over striking. Southwesterly individuals leave for their winter quarters (mainly Africans) in August-September, and those from North and central Europe in September-October (Bernis 1971; Ulfstrand *et al.* 1974), coming back from February on. Its phenology is related to environmental conditions.

One of the peculiarities of this specie is phylopatry (Creutz 1939; Gunten 1963; Rheinwald & Gutscher 1969; Hund & Prizinger 1979; de Lope & da Silva 1988). This fidelity to born and breeding places allow to this kind of long-term studies. In spite of this characteristic, these kinds of researches are very difficult because of recapturing the same individual consecutive years in wild. Many individuals die during migrations, about 57 per cent of adults (Bryant 1979). To be precise, in one of our studied colonies birthplace returns vary between 6.1 in second calendar year to 0.5 in fourth calendar year. Breeding returns also decrease between 27.3 in the second calendar year to 0.5 in the sixth calendar year (de Lope & da Silva 1988).

STUDY AREA

The study took place in a colony located in the Residencia Universitaria Caja de Ahorros de Badajoz (RUCAB) (38°52'N, 7°05'W) close to University Campus. This colony is studied from 1985 (Pajuelo *et al.* 1992). The number of house martin's nest is about 900, with nearly 600 breeding pairs that build their nest on eaves and building columns. The most of nests are naturally built, but very few are artificial, built according to Hund & Prizinger (1979). In Badajoz city more than 5.000 house martin's nest are estimated (de Lope 1983), being our study colony the bigger one.

Figure 4. Study area. Nest of *Delichon urbica* on the top of columns are shown.



OBJECTIVES

The main aims of this research study are:

- ✓ To experimentally test the pathogenicity of blood parasites in natural populations of birds, by analysing the effects on their host's fitness.
- ✓ To discover if overall breeding success of hosts is affected by detrimental effects of hemoparasites at first stages of their reproductive cycle
- ✓ To identify the costs of production an immune response in different life history traits
- ✓ To determine if the allocation of androgens in the yolk depends on female body condition
- ✓ To know the percentage of infected birds with blood parasites in hirundines natural populations, by testing the prevalence and intensity of infection in different age classes
- ✓ To check if there is a trade-off between the production of an immune response and androgen deposition in the yolk
- ✓ To analyse if immune system declines with age in natural populations of birds
- ✓ To confirm the role of hemoparasites in the expression of the senescence of their hosts, by analysing the infection in different hirundines species as time goes by

REFERENCES

- Adamo SA (1999). Evidence for adaptive changes in egg laying in crickets exposed to bacteria and parasites. *Animal Behaviour* 57: 117-124
- Agnew P, Bedhomme S, Haussy C, Michalakis & (1999). Age and size at maturity of the mosquito *Culex pipiens* infected by the microsporidian parasite *Vavraia culicis*. *Proc. Roy. Soc. London B* 266: 947-952
- Ahmed FE, Mohammed AHH (1978): *Haemoproteus columbae*: course of infection, relapse and immunity to reinfection in the pigeon. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 57: 229-236.
- Allander K, Bennett GF (1994). Prevalence and intensity of hematozoan infections in a population of Great Tits *Parus major* from Gotland, Sweden. *Journal of Avian Biology* 25: 69-74
- Anderson RM, May R (1978). Regulation and stability of host-parasite population interactions. I. Regulatory mechanisms. *Journal of Animal Ecology* 47: 219-247
- Atkinson CT (1986): Host specificity and morphometric variation of *Haemoproteus meleagridis* Levine, 1961 (Protozoa: Haemosporina) in gallinaceous birds. *Canadian Journal of Zoology* 64: 2634-2638
- Atkinson CT (1999): Hemosporidiosis. En *Field Manual of Wildlife Diseases. General Field Procedures and Diseases of Birds* (M. Friend & JC Franson eds.) Supersedes U.S. Fish and Wildlife Service Resources Publication. Madison, USA
- Atkinson CT, Van Riper III C (1991): Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon* and *Haemoproteus*. En *Bird-Parasite interactions* (Loyle & Zuk eds.) Oxford University Press. Oxford pp. 19-48
- Austad SN (1997). Why we age: what science is discovering about the body's journey throughout life? J. Wiley & Sons, New York
- Baker RR (1976): Biology of the trypanosomes of birds. I Lumsden WHR, Evans DA (ed.) *Biology of the Kinetoplastida*, vol. 1 Academic, New York.
- Balat F (1974): Gelegegröße, Höne der Brutverluste und Bruterfolg bei der Mehlschwalbe, *Delichon urbica* (L.). *Zoologické Listy* 2: 343-356.
- Begon M, Harper JL, Townsend CR (1996). *Ecology*. Blackwell, Oxford.

-
- Bensch S, Pérez-Tris J, Waldenström J, Hellgren O (2004): Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences in avian malaria parasites: multiple cases of cryptic speciation?. *Evolution* 58: 1617–1621
 - Bennett GF, Peirce MA, Ashford RW (1993): Avian Haematozoa: mortality and pathogenicity. *J. Nat. Hist. Lond.* 26: 993-1001.
 - Benzi G, Moretti A (1995). Age-and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the Glutathione System. *Free Rad Biol Med* 19: 77-101
 - Bernis F (1971): *Aves Migradoras Ibéricas. Fasc 7. S.E.O. Madrid*
 - Bishop A, Tate P, Thorpe M (1938): The duration of *Plasmodium relictum* infections in canaries. *Parasitology* 30: 388-391
 - Bishop MA, Bennett GF (1992): Host-parasite catalogue of the avian haematozoa. Suppl. 1 and Bibliography of the avian blood-inhabiting haematozoa, Suppl.2 *Occas. Pap. Biol.* 15
 - Blondel J, Maistre M, Perret P, Hurtrezboussets S, Lambrechts MM (1998). Is the small clutch size of a Corsican blue tit population optimal? *Oecologia* 117: 80-89
 - Bloom PB (1999). The future of public health. *Nature* 402: c63-c64
 - Bonsall MB, Hansell MP (1998). Apparent competition structures ecological assemblages. *Nature* 388: 371-373
 - Bryant DM (1979): Reproductive cost in the house martin *Delichon urbica*. *Journal of Animal Ecology* 52: 905-925
 - Bush AO, Fernández JC, Esch GW, Seed JR (2001): Parasitism. The diversity and ecology of animal parasites. Cambridge University Press. Cambridge, UK
 - Buss LW (1987). The evolution of individuality. Princeton University Press, Princeton.
 - Carroll L (2000). Alice's adventures in wonderland & Throgh the Looking-Glass. Signet Classic, Penguin Books Ltd. New American Library, New York
 - Charlton BG, Brierly ES, Turnbull DM (1998). Preferential amplification of mutant clones as a mechanism of ageing. *QJM*; 91: 865-6
 - Charnov EL (1982). The theory of sex allocation. Princeton, NJ: Princeton University Press.
 - Cheng TC (1986): General parasitology (2nd edition). Academic Press, New York

-
- Cichon M, Sendecka J, Gustafsson L (2003). Age-related decline in humoral immune function in Collared Flycatchers. *Journal of Evolutionary Biology* 16: 1205-1210
 - Clark F, McNeil DAC, Hill LA(1993): Studies of the dispersal of the three congeneric species of flea monoxenous to the house martin (*Delichon urbica* L.). *The Entomologist* 112: 85-94.
 - Clayton DH, Moore J (1997): *Host-Parasite Evolution: General Principles and Avian Models*. Oxford University Press, New York
 - Covalada Ortega J, Gállego Berenguer (1950). Hemoproteus aviares. *Revista Ibérica de Parasitología* 2: 142-185
 - Creutz G (1939): Nachtrag zu “Ratschläge zur Schwalben beringung und Ergebnisse.” *Vogelring* 11(2): 77-92.
 - Cunningham AA, Daszak P (1998). Extinction of a species of land snail due to infection with microsporidian parasite. *Conservation Biology* 12: 1139-1144
 - Cushing BS (1985). Estrous mice and vulnerability to weasel predation. *Ecology* 66: 1976-1978
 - Da Silva JAP (1999). Sex hormones and glucocorticoids: interactions with the immune system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 876: 102-118.
 - Daan S, Deerenberg C, Dijkstra C (1996). Increased daily work precipitates natural death in the kestrel. *J. Anim. Ecol.* 65: 539-544
 - Davidar P, Morton ES (1993): Living with parasites: prevalence of a blood parasite and its effect on survivorship in the Purple Martin. *The Auk* 110(1): 109-116
 - Dawson RD, Bortolotti GR (2000). Effects of hematozoan parasites on condition and return rates of American kestrels. *The Auk* 117(2): 373-380.
 - de Lope, F (1983): La reproducción d’*Hirundo rustica* en Extremadura (España). *Alauda* 51(2): 89-91
 - de Lope, F (1997): Avión común. En *Atlas de las Aves de España (1975-1995)* (F.J. Curroy coord.), Ed. Lynx, Barcelona.
 - de Lope, F, da Silva, E (1988): La fidelidad al lugar de nidificación o de nacimiento en el avión común (*Delichon urbica urbica* L.) en Badajoz, España. *Ardeola*, 35 (1): 51-58
 - Deerenberg C, Dekogel CH, Overkamp GFJ (1996). Cost of reproduction in the Zebra Finch *Taeniopygia guttata*: manipulation of brood size in the laboratory. *J. Avian. Biol.* 27: 321-326

-
- Deerenberg C, Apanius V, Daan S, Bos N (1997). Reproductive effort decrease antibody responsiveness. *Proc. Roy. Soc. London B* 264: 1021-1029
 - Downing JA, Bryden WL (2002). A non invasive test of stress in laying hens. RIRDC 01/143 report. RIRDC. Camden
 - Dufva R, Allander K (1995). Intraspecific variation in plumage coloration reflects immune response in Great tit (*Parus major*) males. *Functional Ecology* 9: 785-789
 - Dufva R (1996). Blood parasitism, health, reproductive success, and egg volume in female great tits *Parus major*. *Journal of Avian Biology* 27: 83-87.
 - Eising CM, Eikenaar C, Schwabl H, Groothuis TGG (2001). Maternal androgens in blackheaded gull (*Larus ridibundus*) eggs: consequences for chick development. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 268: 839-846.
 - Endler JA (1986). *Natural selection in the wild*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
 - Falconer DS (1989). *Introduction to quantitative genetics*. Longman Scientific, New York.
 - Fallis AM, Desser SS (1977). On species of *Leucocytozoon*, *Haemoproteus*, and *Hepatocystis*. En *Parasitic protozoa* (ed. J.P. Kreier), pp. 239-266. Academic Press. New York.
 - Feldman M, Cryer B, McArthur Ke, Huet BA, Lee E (1996). Effects on aging gastritis on gastric acid and pepsin secretion in humans: a prospective study. *Gastroenterology* 110: 1043-1052
 - Festa-Bianchet M (1989): Individual differences, parasites, and the cost of reproduction in bighorn ewes (*Ovis canadensis*). *Journal of Animal Ecology* 58: 785-795
 - Finch CE (1990): *Longevity, Senescence and the Genome*. University of Chicago Press, Chicago.
 - Fisher RA (1930): *The Genetical Theory of Natural Selection*. Clarendon Press, Oxford.
 - Forbes ML (1993): Parasitism and host reproductive effort. *Oikos* 67: 444-450.
 - Folstad I, Karter AJ (1992). Parasites, bright males, and the immunocompetence handicap. *American Naturalist*, 139: 603-622.
 - Friedman DB, Johnson TE (1988). A mutation in the age-1 gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphroditic fertility. *Genetics* 118: 75-86

-
- Futuyma DJ, Slatkin M (ed) (1983): *Coevolution*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts
 - Garnham PCC (1966): *Malaria parasites and other haemosporidia*. Blackwell Scientific Publishers, Oxford.
 - Gil D (2003). Golden eggs: maternal manipulation of offspring phenotype by egg androgen in birds. *Ardeola* 50, 281–294.
 - Gil D, Graves J, Hazon N, Wells A (1999). Male attractiveness and differential testosterone investment in zebra finch eggs. *Science* 286, 126–128.
 - Gil D, Leboucher G, Lacroix A, Cue R, Kreutzer M (2004). Female canaries produce eggs with greater amounts of testosterone when exposed to preferred male song. *Horm. Behav.* 45, 64–70.
 - Gil D, Marzal A, de Lope F, Puerta M, Moller AP (2005). Immune costs of yolk androgen deposition in female house martins (*Delichon urbica*). *Ecol. Lett (enviado)*
 - Ginsberg JR, Mace GM, Albon S (1995) Local extinction in a small and declining population: wild dogs in the Serengeti. *Proc Biol Sci.* 262:221-228.
 - Greenman CG, Martin II LB, Hau M (2005): Reproductive state, but not Testosterone, reduces Immune Function in male House sparrows (*Passer domesticus*). *Physiological and Biochemical Zoology* 78(1):60–68. 2005.
 - Groothuis TG, Schwabl H (2002). Determinants of within- and among clutch variation in levels of maternal hormones in black-headed gull eggs. *Funct. Ecol.* 16, 281–289.
 - Groothuis TG, Müller W, Von Engelhardt N, Carere C, Eising C (2005): Maternal hormones as a tool to adjust offspring phenotype in avian species. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29: 329 – 352
 - Gunten KV (1963): Untersuchungen an einer Dorfmeinschaft von mehlschalbe, *Delichon urbica*. *Ornt. Beobach.* 60(1): 1-11
 - Hamilton WD (1966). The moulding of senescence by natural selection. *J. Theor. Biol.* 12: 12-45
 - Harley CB, Fitcher AB, Greider CW (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345: 458-460.
 - Hasselquist D, Marsh JA, Sherman PW, Wingfield JC (1999) Is avian humoral immunocompetence suppressed by testosterone? *Behav Ecol Sociobiol* 45:167–175.

-
- Haskell D (1994). Experimental evidence that nestling begging behaviour incurs a cost due to nest predation. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 257: 161-164.
 - Hayflick L (1985). Theories of biological aging. *Exp Gerontol* 20:145-159
 - Heeb P, Werner I, Mateman AC, Kolliker M, Brinhof MWG, Lessels CM, Richner H (1999). Ectoparasites infestation and sex-biased local recruitment of hosts. *Nature* 400: 63-65
 - Herre EA, Knowlton N, Mueller UG, Rehner SA (1999). Laws governing species interactions? Encouragement and caution from figs and their associates. En *Levels of selection in evolution* (ed. L. Keller) Princeton University Press, Princeton, New Jersey
 - Hickman CP, Roberts LS, Parson A (1998): Principios integrales de Zoología. McGraw-Hill, Madrid.
 - Hill LA, Clark F (1993): Ectoparasites of Portuguese house martin *Delichon urbica*. *Airo* 4: 7-11
 - Hudson P (2005): Parasites, diversity, and the ecosystem. En *Parasitism & Ecosystem* (ed. F Thomas, F Renaud & JF Guégan). Oxford University Press, New York
 - Hund K (1976): Beobachtungen, insbesondere zur Brutbiologie, an oberrschwäbischen Populationen der Mehlschwalbe, *Delichon urbica*. *Ornithologie Mitteilungen* 28: 169-178.
 - Hund K, Prinzinger R (1979): Untersuchungen zur Ortstreue, Paartreue und Überlebensrate nestjunger Vögel bei der Mehlschwalbe (*Delichon urbica*) in Oberschwalben. *Volgelwarte* 30(2): 107-117.
 - Ilmonen P, Taarna T, Hasselquist D (2000). Experimentally activated immune defence in female pied flycatchers results in reduced breeding success. *Proceedings of the Royal Society of London series B*. 267:665-670
 - Janzen DH (1970): Herbivores and the number of tree species in tropical forests. *American Naturalist* 104: 501-528
 - Johns DR (1996). The other human genome: mitochondrial DNA and disease. *Nat Med* 1065-1058
 - Keymer AE, Read AF (1991). Behavioural ecology: the impact of parasitism. En *Parasite-host associations: coexistence or conflict* (ed. CA Toft, A Aeschlimann & L Boils). Oxford University Press, Oxford

-
- Kirkpatrick CE, Robinson S, Kirton UD (1991). Phenotypic correlates of blood parasitism in the common grackle. En *Bird-Parasite interactions* (Loyle & Zuk eds.) Oxford University Press. Oxford pp. 344-358
 - Kirkwood TBL (1977). Evolution of ageing. *Nature* 270: 301-304
 - Kirkwood TBL (1996). Human senescence. *BioEssay* 18: 1009-1016
 - Klasing KC (2004): The cost of immunity. *Acta Zoologica Sinica* 50 (6): 961 – 964
 - Knight JA (2000). The Biochemistry of aging. *Adv. Clin. Chem.* 35: 1-62
 - Kondelka D (1978): Die Brutbiologie der Mehlschwalbe (*Delichon urbica*) im Becken Ostrava. *Folia Zoologica* 27: 37-45
 - Korpimäki E, Hakkarainen H, Bennett GF (1993): Blood parasites and reproductive success of Tengmalm's owl: detrimental effects on females but not on males? *Funct. Ecol.* 7: 420-423.
 - Korpimäki E, Tolonen P, Bennett GF (1995): Blood parasites, sexual selection and reproductive success of European kestrels. *Ecoscience* 2: 335-343.
 - Labbé (1894): Recherches zoologiques et biologiques sur les parasites endoglobulaires du sang des vertébrés. *Arch. de Zool. Exp. et Comparée.* II: 55
 - Levine ND (1985): Phylum Apicomplexa. En *Illustrated guide to the protozoa* (ed. J.J.Lee, S.H. Hunter & E.C. Bovee), pp: 322-374. Society of Protozoology. Lawrence, Kansas.
 - Lewis S, Sherratt Tn, Hamer Kc, Wanless S (2001). Evidence of intra-specific competition for food in a pelagic seabird. *Nature* 412: 816-819
 - Lind EA (1960): Zur Ethologie und Ökologie der Mehlschwalbe, *Delichon urbica*. *Annles Zoologici Societatis Zoologicae-Botanicae Fennicae Vannamo* 21: 1-123.
 - Lipar JL, Ketterson ED, Nolan V, Casto JM (1999). Egg yolk layers vary in the concentration of steroid hormones in two avian species. *General and Comparative Endocrinology*, 115: 220-227.
 - Lipar JL, Ketterson ED (2000). Maternally derived yolk testosterone enhances the development of the hatching muscle in the red-winged blackbird *Agelaius phoeniceus*. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 267: 2005 - 2010.
 - Loureau M (1998). Biodiversity and ecosystem functioning: a mechanistic model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95: 5632-5636

-
- Loureau M, Roy J, Tilman D (2005). Linking ecosystem and parasite ecology. En *Parasitism & Ecosystem* (ed. F Thomas, F Renaud & JF Guégan). Oxford University Press, New York
 - Magnhagen C (1991): Predation risk as a cost of reproduction. *Tr. Ecol. Evol.* 6: 183-186.
 - May R, Anderson RM (1978). Regulation and stability of host-parasite population interactions. II. Destabilising processes. *Journal of Animal Ecology* 47: 249-267
 - May R, Anderson RM (1979). Population Biology of Infectious Diseases. Part II. *Nature* 280: 455-461
 - McNabb FMA, Wilson CM (1997). Thyroid hormone deposition in avian eggs and effects on embryonic development. *American Zoologist*, 37: 553-560
 - Medawar PB (1952). An unsolved problem of biology. H. K. Lewis, London
 - Medveded Z (1990). An attempt at a rational classification of theories of aging. *Biol Rev* 65:375-398.
 - Merino S, Moreno J, Sanz JJ, Arriero E (2000): Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). *Proc. R. Soc. Lond. B* 267: 2507-2510
 - Michalakis Y, Hochberg ME (1994). Parasitic effects on host life-history traits: a review. *Parasite* 1: 191-294
 - Miller RA (1996): The aging immune system. Primer and prospectus. *Science* 273: 70-74
 - Minchella DJ (1985). Host life-history variation in response to parasitism. *Parasitology* 90: 205-216
 - Minchella DJ, Loverde PT (1981). A cost of increased early reproductive effort in the snail *Biomphalaria glabrata*. *American Naturalist* 118: 876-881
 - Mock DW, Parker GA (1997). The Evolution of Sibling Rivalry. Oxford University Press. Oxford.
 - Møller AP (1974): Tre ars under sogeser I kolonier af Bysalve *Delichon urbica*. *Flora og Fauna* 80: 74-80.
 - Møller AP, Erritzoe J (1996). Parasite virulence and host immune defense: Host immune response is related to nest re-use in birds. *Evolution* 50: 2066-2072.
 - Møller AP, de Lope F (1999): Senescence in a short-lived migratory bird: age-dependent morphology, migration, reproduction and parasitism. *Journal of Animal Ecology* 68: 163-171

-
- Møller AP, Erritzoe J (2000). Predation against birds with low immunocompetence. *Oecologia* 122, 500–504.
 - Møller AP, Merino S, Brown CR, Robertson RJ (2001) Immune defense and host sociality: A comparative study of swallows and martins. *Am. Nat.* 158:136 - 145
 - Møller AP, Erritzoe J (2002): Coevolution of host immune defence and parasite-mediated mortality: relative spleen size and mortality in altricial birds. *Oikos* 99: 95-100
 - Møller AP (2005). Parasitism and the regulation of host populations. En *Parasitism & Ecosystem* (ed. F Thomas, F Renaud & JF Guégan). Oxford University Press, New York
 - Moore J (2002): Parasites and the behaviour of animals. Oxford University Press, New York
 - Moreno J (1993). Physiological mechanism underlying reproductive trade-offs. *Etología* 3: 41-56
 - Moreno J, Sanz JJ, Arriero E (1999). Reproductive effort and T-lymphocyte cell-mediated immunocompetence in female pied flycatcher *Ficedula hypoleuca*. *Proc. Roy. Soc. London B* 266: 1105-1109
 - Moreno J (2002). La evolución de las estrategias vitales. En *Evolución: la base de la Biología* (ed. M. Soler). Proyecto Sur de ediciones, S.L. Granada
 - Moreno JM (2005) Evaluación Preliminar de los Impactos en España por Efecto del Cambio Climático. Centro de Publicaciones Ministerio de Medio Ambiente
 - Mork M (1996): The effect of kelp in wave damping. *Sarsia* 80: 323-327
 - Morris JG, Potter M (1997). Emergence of new pathogens as a function of changes in host susceptibility. *Emerging Infection Diseases* 3: 435-441
 - Nager RG, Monaghan P, Houston DC (2000). Within-clutch trade-offs between the number and quality of eggs: experimental manipulations in gulls. *Ecology*, 81: 1339-1350
 - Nelson RJ (2000). An Introduction to Behavioral Endocrinology. Sinauer. Sunderland.
 - Nesse RM, Williams GC (1995). Why we get sick: the new science of Darwinian medicine. Times Book, New York.
 - Newton I (1998). Population limitation in birds. Academic Press, London

-
- Nilsson JA, Svensson E (1996). The cost of reproduction: a new link between current reproductive effort and future reproductive success. Proc. R. Soc. Lond. B 263: 711-714
 - Noble ER, Noble GA (1976) Parasitology. Philadelphia: Lea and Febiger
 - Nordling D, Andersson M, Zohari S, Gustafsson L (1998). Reproductive effort reduces specific immune response and parasite resistance. Proc. R. Soc. London B 263: 711-714
 - Pajuelo L, de Lope F, da Silva E. (1992): Biología de la reproducción del avión común (*Delichon urbica*) en Badajoz, España. Ardeola 39: 15-23
 - Pardo G (2003). Consideraciones generales sobre algunas teorías del envejecimiento. Rev. Cubana Invest. Biomed. 22: 58-67
 - Park T (1948). Experimental studies of interspecies competition. I. Competition between populations of the flour beetles, *Trifolium confosum* Duval and *Tribolium castaneum* Herbst. Ecological Monographs 18: 265-308
 - Pérez-Iñigo C (1976): Parasitología. Ed. Blume. Barcelona
 - Perez-Tris J, Hasselquist D, Hellgren O, Krizanauskiene A, Waldenstrom J, Bensch S (2005): What are malarial parasites? Trends in Parasitology 21: 209-211
 - Pike TW, Petrie M (2003). Potential mechanisms of avian sex manipulation. Biol Rev 78:553–74
 - Pilz KM, Smith HG (2004). Egg yolk androgen levels increase with breeding density in the European starling, *Sturnus vulgaris*. Functional Ecology 18:58-66
 - Polak M, Starmer WT (1998). Parasite-induced risk of mortality elevates reproductive effort in male *Drosophila*. Proc. Roy. Soc. London B 265: 197-201
 - Polis GA (1999): Why are parts of the world green? Multiple factors control productivity and the distribution of biomass. Oikos 86: 3-15
 - Poulin R (1996): How many parasite species are there: are we close to answers? International Journal for Parasitology 26: 1127-1129
 - Price P (1980): Evolutionary biology of parasites. Princeton University Press, Princeton.
 - Råberg L, Nilsson Ja, Ilmonen P, Stjernman M, Hasselquist D (2000). The cost of an immune response: vaccination reduces parental effort. Ecol. Lett. 3: 382 - 386.
 - Rätti O, Dufva R, Alatalo RV (1993). Blood parasites and male fitness in the pied flycatcher. Oecologia 96: 410-414

-
- Reddel RR (1998). A reassessment of the telomere hypothesis of senescence. *BioEssays* 20: 977-984
 - Reed WL, Vleck CM (2001). Functional significance of variation in egg yolk androgens in the American coot. *Oecologia* 128, 164– 171.
 - Rheinwald G, Gutscher H (1969): Dispersion und Ortstreue der Mehlschwalbe (*Delichon urbica*). *Vogelwelt* 90(4): 121-140
 - Ricklefs RE (2000): Intrinsic aging-related mortality in birds. *Journal of Avian Biology* 31: 103-111
 - Rodríguez K, Céspedes E (1999). Estrés oxidativo & envejecimiento. *Rev Cubana Invest Biomed* 18:67-76
 - Romanoff AL, Romanoff AJ (1949). *The Avian Egg*. Academic Press. New York.
 - Rose MR (1991). *Evolutionary biology of aging*. Oxford University Press, Oxford.
 - Saikkonen K, Faeth SH, Helander M, Sullivan TJ (1998): Fungal endophytes: A Continuum of Interactions with Host Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 319-343
 - Saino N, Ferrari RP, Romano M, Rubolini D, Møller AP (2003). Humoral immune response in relation to senescence, sex and sexual ornamentation in the barn swallow (*Hirundo rustica*). *J Evol Biol* 16: 1127-1134
 - Sanz JJ (1997). Clutch size manipulation in the Pied Flycatcher: effects on nestling growth, parental care and moult. *J. Avian Biol.* 28: 157-162
 - Schwabl H (1993). Yolk is a source of maternal testosterone for developing birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 90: 11446 - 11450.
 - Schwabl H (1996a). Maternal testosterone in the avian egg enhances postnatal growth. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 114A: 271-276.
 - Schwabl H (1996b). Environment modifies the testosterone levels of a female bird and its eggs. *Journal of Experimental Zoology*, 276: 157-163.
 - Schwabl H (1997). Maternal steroid hormones in the egg. En S. Harvey & R. J. Etches (Eds): *Perspectives in Avian Endocrinology*, pp. 3-13. *Journal of Endocrinology*. Bristol.
 - Schwabl H, Mock, DW, Gieg JA (1997) A hormonal mechanism for parental favouritism. *Nature* 386: 231.
 - Searcy WA (1988). Do female red-winged blackbirds limit their own breeding densities? *Ecology*, 69: 85-95.

-
- Sergent ED, Sergent ET (1952): Recherches experimentales sur l'infection latente et la prémunition dans le paludisme. Archives de l'Institut Pasteur d'Argelie 30: 203-239
 - Seutin G (1994). Plumage redness in redpoll finches does not reflect hemoparasitic infection. Oikos, 70: 280-286.
 - Shaffer LR, Formanowicz DR (1996). A cost of viviparity and parental care in scorpions: Reduced sprint speed and behavioural compensation. Anim. Behav. 51: 1017-1023
 - Sheldon B, Verhulst S (1996). Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. Trends. Ecol. Evol. 11: 317-321
 - Sockman KW, Schwabl H (2000). Yolk androgens reduce offspring survival. Proceedings of the Royal Society of London, Series B, 267: 1451- 1456.
 - Sohal RS, Arnold LA, Sohal BH (1990). Aged-related changes in antioxidants enzymes and pro-oxidant generation in tissues of the rat with special reference to parameters in two insect species. Free Rad Biol Med 10: 495-500
 - Soler JJ (2002a). Selección natural & adaptación. En *Evolución: la base de la biología* (Soler, M. Ed.). Proyecto Sur, Granada, pp: 127-157.
 - Soler JJ (2002b). La Teoría evolutiva & la medicina. En *Evolución: la base de la biología* (Soler, M. Ed.). Proyecto Sur, Granada, pp: 389-405
 - Stearns SC (1992). The evolution of life histories. Oxford University Press, Oxford.
 - Stearns SC, Hoekstra RF (2000). Evolution: an introduction. Oxford University Press, New York
 - Temple SA (1986). Do predators always capture substandard individuals disproportionately from prey populations? Ecology 68: 669-674
 - Tilman D, Knops J, Wedin D, Reich P, Ritchie M, Siemann E (1997). The influence of functional diversity and composition on ecosystem processes. Science 277: 1300-1302
 - Thomas F, Guégan Jf, Michalakis Y, Renaud F (2000). Parasites and host life-history traits: implications for community ecology and species co-existence. International Journal for Parasitology 30: 669-674
 - Thomas F, Bonsall MB, Dobson AP (2005). Parasitism, biodiversity and conservation. En *Parasitism & Ecosystem* (ed. F Thomas, F Renaud & JF Guégan). Oxford University Press, New York

-
- Toft CA (1986) Communities of parasites with parasitic life-styles. En *Community Ecology* (ed. JM Diamond & TJ Case). Harper & Row, New York
 - Ulfstrand S, Ross G, Alerstam T (1974): Visible bird migration at Falsterbo, Sweeden. Var Fagelvárd suppl. 8: 1-245
 - Van Nouhuys S, Hanski I (2002). Colonization rates and distances of a host butterfly and two specific parasitoids in a fragmented landscape. *Journal of Animal Ecology* 71: 639-650
 - Van Valen L (1973). A new evolutionary law. *Evol. Theory* 1:1–30.
 - Von Schantz T, Bensch S, Grahn M, Hasselquist D, Wittzell H (1999). Good genes, oxidative stress and condition-dependent sexual signals. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 266: 1-12.
 - Wagner R, Davidar P, Schug M, Morton E (1997): Do blood parasites affect paternity, provisioning and mate-guarding in Purple martins?. *The Condor* 99: 520-523
 - Weatherhead PJ, Bennett GF (1991). Ecology of Red-winged Blackbird parasitism by haematozoa. *Canadian Journal of Zoology* 69: 2352-2359.
 - Weatherhead PJ, Bennett, GF (1992). Ecology of parasitism of brown-headed cowbirds by haematozoa. *Canadian Journal of Zoology* 70: 1-7
 - Weatherhead PJ, Metz KJ, Bennett GF, Irwin R (1993). Parasite fauna, testosterone and asecondary sexual traits in male red-winged blackbirds. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 33: 13-23
 - White III HB (1991). Maternal diet, maternal proteins and egg quality. En D. C. Deeming & M. W. J. Ferguson (Eds.): *Egg incubation: its effects on embryonic development in birds and reptiles*, pp. 1-15. Cambridge University Press. Cambridge.
 - Williams GC (1957): Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. *Evolution* 11: 398-411
 - Williams GC (1966). *Adaptation and natural selection*. Princeton Univeristy Press, Princeton.
 - Williams TD (1994). Intraspecific variation in egg size and egg composition in birds: effects on offspring fitness. *Biological Reviews*, 68: 35-59.
 - Zuk M, Stoehr AM (2002): Immune defence and host life history. *The American Naturalist* 160: S09-S22 *et al.*

Chapter II

How malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study

MALARIAL PARASITES DECREASE
REPRODUCTIVE SUCCESS: AN
EXPERIMENTAL STUDY IN A
PASSERINE BIRD.

Oecología (2005) 142: 541-545

Abstract

Malarial parasites are supposed to have strong negative fitness consequences for their hosts, but relatively little evidence supports this claim due to difficulty of making experimental tests. We experimentally reduced levels of infection with the blood parasite *Haemoproteus prognei* in its host the house martin *Delichon urbica*, by randomly treating adults with primaquine or a control treatment. Treated birds had significantly fewer parasites than controls. The experiment increased clutch size by 18%, and this difference increased to 39% at hatching and 42% at fledging. There were no effects of treatment on quality of offspring measured in terms of tarsus length, body mass, haematocrit or T-cell mediated immune response. These findings demonstrate that malarial parasites can have dramatic effects on clutch size and other demographic variables, potentially influencing the evolution of clutch size, but also the population dynamics of heavily infected populations of birds.

INTRODUCTION

Parasites are ubiquitous and have drastic effects on their hosts due to their exploitation of resources that could otherwise be used by the hosts (Noble and Noble 1976; Price 1980; Combes 2001). It is thus not surprising that most aspects of the life history of hosts such as age when reaching maturity, clutch size and offspring size are believed to be affected by parasites (Hochberg *et al.* 1992; Lehmann 1993; Møller 1997). Results consistent with these ideas have begun to emerge during the last decades but our knowledge of causal relationships is still rudimentary due to a scarcity of experimental manipulation.

Malaria is a major cause of death in humans (Miller *et al.* 2002), but presumably also in many other organisms (Atkinson and Van Riper 1991; Bennett *et al.* 1993). Malaria is supposed to have strong negative effects on host fitness because the group of intra-cellular parasites involved causes dramatic effects on the efficiency of metabolism (Chen *et al.* 2001). Malarial parasites are also some of the most widespread parasites, with prevalence often reaching 100%, and infections being chronic (Atkinson and Van Riper 1991). However, the fitness consequences of malarial infections are poorly known. Several studies have shown that an experimental increase in parental investment causes an increase in levels of infection (Oppliger *et al.* 1996; Merino *et al.* 1996; Allander 1997; Merilä and Andersson 1999; Wiehn *et al.* 1999). Likewise several studies have suggested that malarial parasites lead to a reduction in a range of different fitness components, but the results are mixed in terms of magnitude of effect (Korpimäki *et al.* 1995; Sundberg 1995; Oppliger *et al.* 1997; Bennett *et al.* 1988; Dawson and Bortolotti 2000; Sanz *et al.* 2001). Most studies have revealed weak effects explaining at most a few percent of the variance. The main problem with all these studies is the lack of experimentation. So far only a single study has experimentally treated malarial infection in birds. Merino *et al.* (2000) treated blue tits *Parus caeruleus* with primaquine after the start of laying, causing a significant decrease in the level of infection and an increase in reproductive success. Thus, there is evidence of a direct effect of avian malaria on reproductive output.

The objective of this study was to investigate how malaria infection affected clutch size, using an experimental manipulation of infection status with the antimalarial agent, primaquine. Experiments of this type are important because they can be used to

assess whether effects of malarial infection early during the reproductive cycle have disproportionately large effects on seasonal reproductive success. This requires treatment of adults well before the start of reproduction. At the start of reproduction and the production of sex hormones, individuals with chronic infections of malarial parasites show dramatic relapses (e.g. Chernin 1952; Applegate and Beaudoin 1970; Allander and Sundberg 1997). Thus early treatment of individual hosts is expected to reduce or maintain levels of infection at a time in the reproductive cycle when infections are normally increasing rapidly. We experimentally treated house martins *Delichon urbica*, a colonial passerine migratory bird with high levels of prevalence of the parasite *Haemoproteus prognei*.

MATERIALS AND METHODS

In March–May 2002, 49 pairs of house martins were chosen before they had laid eggs and were randomly assigned to one of two treatments. Treatment occurred on average 9.37 days (SD=1.97) before egg laying started. We treated 52 adults from 26 nests while keeping 46 adults from 23 nests as controls. Poor weather caused considerable levels of desertion that resulted in 32 treated adults and 28 controls being assessed for effects of treatment on reproduction. There were no significant differences in capture date (Mann–Whitney U-test, $z = -0.18$, $P = 0.87$), body mass (Mann–Whitney U-test, $z = -0.44$, $P = 0.68$), wing length (Mann–Whitney U-test, $z = -1.27$, $P = 0.22$), tarsus length (Mann–Whitney U-test, $z = -0.45$, $P = 0.65$) and haematocrit (Mann–Whitney U-test, $z = -0.19$, $P = 0.85$) between treated individuals and controls among the birds that had deserted. Since only half of all pairs (56%) lay second clutches (Pajuelo *et al.* 1992), only data from first clutches were recorded. Individuals were captured at dawn in their nest and injected sub-cutaneously with either 0.01 mg primaquine (Sigma, St. Louis, Mo.) in 0.1 ml saline solution or the same quantity of pure saline solution (controls), following the procedure reported by Merino *et al.* (2000). Primaquine is an anti-malarial chemical compound used in different treatments to reduce the level of parasitaemia in birds (Redig *et al.* 1993). It results in dosedependent effects, such as gastrointestinal disturbances and development of met-haemoglobinaemia and haemolytic anaemia (Mayorga *et al.* 1997). Thus, in order to minimize these effects we

reduced treatment to a low-concentration single dose. In any case, the toxicity of primaquine rules out the possibility of beneficial side-effects of medication, other than a reduction in blood parasitism (see Merino *et al.* 2000). Blood samples for haematological measurements were taken from the brachial vein immediately before treatment. For identification of blood parasites, a drop of blood was smeared on a microscope slide and air-dried.

All birds were individually identified with numbered metal rings. Nests were inspected every day to obtain information on laying date, clutch size, hatching date and brood size (day 1=10 March).

When nestlings were 12 days old, we recaptured parents and took a second blood sample to check for the effect of treatment on parasite intensities and prevalence. Blood samples were fixed in absolute methanol and stained with Giemsa. Half of each smear was examined under 200 \times magnification in search of large extraerythrocytic Haematozoa (i.e. *Trypanosoma*), and in the other half of the smear 20 fields were scanned under 400 \times magnification for intra-erythrocytic haematozoa (i.e. *Haemoproteus*). The intensity of extra-erythrocytic parasites was quantified as number of parasites per 100 fields, and number of parasites per 2,000 erythrocytes for intraerythrocytic parasites under 1,000 \times magnification with oil immersion (Merino *et al.* 1997). As a measure of immune response, we used the T-cell-mediated immune response to a challenge with phytohaemagglutinin (PHA). This is a standard estimate from the poultry literature of the ability to produce a T-cell-mediated immune response (Goto *et al.* 1978; Parmentier *et al.* 1993). Injection with PHA results in local activation and proliferation of T-cells, followed by local recruitment of inflammatory cells and increased expression of major histocompatibility complex molecules (Goto *et al.* 1978; Abbas *et al.* 1994). Fifteen-day-old nestlings were injected with 0.05 ml of 0.2 mg PHA-P in one wing web (Smits *et al.* 1999). All individuals were injected in the afternoon between 1600 and 1800 hours. The dose of PHA used in this study is similar to that used in numerous other studies of free-living or captive birds (Saino *et al.* 1997; Christe *et al.* 1998, 2000; Birkhead *et al.* 1999; Gonza'lez *et al.* 1999; H'orak *et al.* 1999; Soler *et al.* 1999; Merino *et al.* 2000; Navarro *et al.* 2003). We measured the thickness of the patagium (an expandable membranous fold of skin between the wing and body of a bird) injected with PHA after 24 h, using a pressure-sensitive spessimeter (Digimatic Indicator ID-C, Mitutoyo Absolute 547-301, Japan) with an accuracy of 0.01 mm. In the subsequent analyses we used the increase in wing thickness as a measure of

the intensity of the PHA-induced immune response (hereafter T-cell response). On the first capture, we measured body mass with a Pesola spring balance to the nearest 0.1 g, and tarsus length with a digital calliper to the nearest 0.01 mm. Micro-capillary tubes were centrifuged for 10 min at 14,000 r.p.m. to estimate haematocrit (the proportion of blood volume occupied by red blood cells).

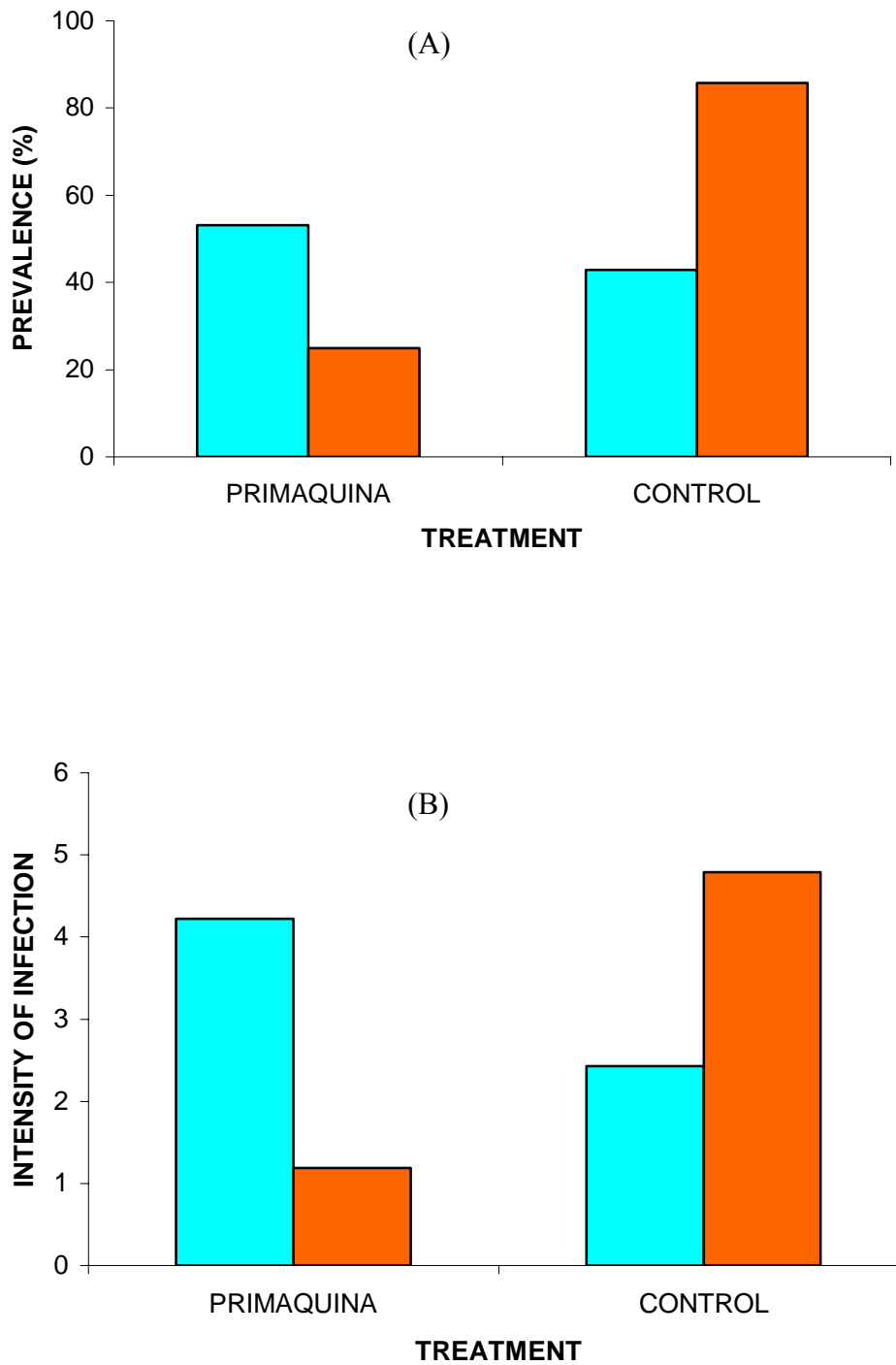
RESULTS

At the start of the breeding season, 48.3% of adults (n=60) were infected with *Haemoproteus*, the only common parasite in the population of house martins.

Before treatment with primaquine no significant difference in prevalence ($\chi^2 = 0.63$, $P = 0.43$) or intensity of parasitism between groups was observed (Mann–Whitney U-test, $z = -1.33$, $P = 0.18$; 32 treated and 28 controls). As expected from the anti-malarial treatment, there was a significant decrease in prevalence (McNemar $\chi^2 = 3.77$, $P = 0.049$; Fig. 1a) and in intensity of parasitism (Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test, $z = -3.29$, $P = 0.001$; Fig. 1b), while for controls there was a significant increase in the proportion of individuals that became infected (McNemar $\chi^2 = 8.64$, $P = 0.002$; Fig. 1a), and in the intensity of parasitism (Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test, $z = -2.43$, $P = 0.015$; Fig. 1b). In addition, more individuals remained uninfected in the treated group (34.4%) than among controls (10.7%) ($\chi^2=9.314$, $P=0.002$).

Clutch size, brood size at hatching and brood size at fledging all differed significantly between groups (Table 1). Clutch size was on average 18% larger in treated birds, while the difference increased to 39% at hatching and 42% at fledging. Hatching success was significantly greater in the treated birds, suggesting that egg quality and/or incubation behaviour was affected by the treatment (Table 1). In contrast, there was no significant difference for fledging success or overall breeding success (Table 1)

Fig. 1. (A) Prevalence (%) and (B) intensity of infection with *Haemoproteus prognei* in adults House martin before (blue) and after (orange) primaquine treatment. Sample sizes are 16 treated pairs and 14 untreated controls.



The difference in clutch size between treatment group was small and did not reach significance, using final *Haemoproteus* infection intensity as a covariate in an analysis of covariance ($F_{1,57} = 3.52$, $P = 0.07$). The quality of offspring measured in terms of body mass, tarsus length, haematocrit or T-cell-mediated immune response did not differ significantly between groups (Table 1).

Table 1. Mean (SD) reproductive success and nestling quality of treated ($n = 16$) and control nests ($n = 14$). The number of nestlings in treated nests was 45 and in controls 22. Differences for nestlings were tested by using brood means.

TABLE 1	TREATMENT	CONTROL	Z (Mann-Whitney U-test)	P
Clutch size	4.44 (0.62)	3.64 (0.93)	-2.466	0.02
Brood size at hatching	3.37 (1.25)	2.07 (0.83)	-3.352	0.001
Brood size at fledging	2.81 (1.11)	1.64 (0.63)	-3.350	0.001
Hatching success	0.75 (0.27)	0.58 (0.26)	-2.233	0.03
Fledging success	0.85 (0.16)	0.82 (0.20)	-0.496	0.65
Breeding success	0.63 (0.26)	0.48 (0.27)	-1.842	0.07
Haematocrit (%)	45.52 (2.76)	46.53 (3.18)	-0.831	0.413
Body mass (g)	17.69 (1.16)	17.40 (1.15)	-0.577	0.586
Tarsus length (mm)	10.29 (0.32)	10.31 (0.34)	-0.438	0.683
T-cell response (mm)	1.49 (0.43)	1.35 (0.18)	-0.30	0.786

DISCUSSION

Clutch size increased by 18% as a consequence of primaquine treatment (Table 1). Numerous hypotheses have been put forward to explain optimal clutch size (review in Roff 2001). The importance of parasitism for clutch size evolution has not usually been appreciated, and only very few studies have addressed this question despite the ubiquitous presence of parasites in all hosts (Møller 1991; Richner and Heeb 1995; Martin *et al.* 2001). One of the hypotheses addressing the evolution of optimal clutch size relates directly to the impact of parasites on host reproductive success, when individuals within a large clutch suffer disproportionately from the negative effects of parasitism (Møller 1991). Such an effect occurs when parasite populations grow particularly rapidly in large broods of hosts, or when the fitness consequences of parasitism are particularly severe in large broods, because more nestlings are negatively affected by parasitism (Møller 1991). Our present study is the first to demonstrate that there is indeed an improvement in clutch size as a response to a reduction in the number of parasites. We can only speculate about possible mechanisms generating this effect because we did not assess them directly. Firstly, malarial parasites may directly impact foraging ability and therefore rate of level of resource acquisition necessary for production of eggs. Secondly, components used by the immune system for fighting serious infections may also play a role in egg formation. Blount *et al.* (2004) have recently shown that carotenoid availability limits egg production in birds, and Saino *et al.* (2003) have shown that carotenoids limit the T-cell-mediated immune response implicated in anti-malarial immune defence (Wakelin 1996). Finally, by definition, parasites drain energy from their hosts because they extract nutrients that could otherwise have been used by the host (Price 1980), and immune function requires resources that might otherwise have been used for other functions (Sheldon and Verhulst 1996).

While the difference in clutch size between groups was on average 18%, the difference in hatching was 39%, due to a significant effect of treatment on hatching success, and the difference in fledging was 42% (Table 1). The effect of treatment on hatching success may either be due to an effect of treatment on egg quality or on incubation behaviour. If there is a trade-off between use of carotenoids and other antioxidants for egg production and immunity, as suggested above (Blount *et al.* 2004;

Saino *et al.* 2003), we speculate that control females laid eggs with reduced levels of yolk anti-oxidants. This could directly lead to reduced hatching success (Surai 2003). Alternatively, adult house martins may have been affected by malarial infections, causing a reduction in the efficiency of incubation and provisioning for offspring. The latter hypothesis seems less likely since parental effort during the nestling period is considerably greater than during incubation. We should therefore expect much greater effects on fledging success than on hatching success, while in reality the opposite pattern was observed. We suggest two alternative explanations for this result. First, a month passed from treatment to time of fledging, potentially obscuring any effects of treatment on infection status. Second, parents may adjust their parental effort to brood size (see Sheldon and Verhulst 1996).

While parasites can have strong effects on demographic parameters of their hosts, it is less well known whether this has consequences for population dynamics. We can make preliminary estimates of the effects of malarial parasites on the population size of house martins in Spain and Denmark, using the estimated magnitude of effect from the present study. Annual reproductive success of house martins in Spain is on average 4.3 eggs in the first clutch and 3.7 eggs in the second clutch. These 8.0 eggs give rise to, on average, 6.8 fledglings. *Haemoproteus* parasites have a prevalence of 48% in house martins in Spain. In these 48% of house martins, reproductive success where blood parasites are reduced increases by 42%. Therefore, overall production of fledglings is depressed by 40% in the presence of blood parasites. In Denmark, house martins lay on average 4.08 eggs in the first clutch and 67.7% of the birds lay a second clutch with on average 3.36 eggs (Møller 1974). These eggs give rise to on average 5.87 fledglings. Since the prevalence of *Haemoproteus* in Denmark is 0% (n = 55 adults, A. P. Møller unpublished data), there is no suppression of reproductive blood parasites. Thus, malarial parasites depress the annual output of fledglings by 40% in the Spanish population, but do not depress it in the Danish population. Therefore, there are considerable effects of blood parasitism on the size of the post-breeding population of hosts, and this may affect the relative contribution of different populations to the overall population size of hosts across their range due to differences in population productivity.

REFERENCES

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (1994) Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia, W. B. Saunders Co.
- Allander K (1997) Reproductive investment and parasite susceptibility in the great tit. *Funct. Ecol.* 11: 358-364.
- Allander K, Sundberg J (1997) Temporal variation and reliability of blood parasite levels in captive yellowhammer males *Emberiza citrinella*. *J. Avian Biol.* 28: 325-330.
- Applegate JE, Beaudoin RL (1970) Mechanism of spring relapse in avian malaria: effect of gonadotropin and corticosterone. *J. Wildl. Dis.* 6: 443-447.
- Atkinson C, Van Riper III C (1991) Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon* and *Haemoproteus*. In: Loye JE, Zuk M (eds) Bird-Parasite interactions, Oxford University Press, Oxford, pp 19-48.
- Bennett GF, Caines JR, Bishop MA (1988) Influence of blood parasites on the body mass of Passeriform birds. *J. Wildl. Dis.* 24: 339-343.
- Bennett GF, Peirce MA, Ashford RW (1993) Avian Haematozoa: mortality and pathogenicity. *J. Nat. Hist. Lond.* 26: 993-1001.
- Birkhead TR, Fletcher F, Pellatt EJ (1999) Nestling diet, secondary sexual traits and fitness in the zebra finch. *Proc. R. Soc. Lond. B* 266: 385-390.
- Blount JD, Houston DC, Surai PF, Møller AP (2004) Egg-laying capacity is limited by carotenoid pigment availability in wild gulls *Larus fuscus*. *Proc. R. Soc. Lond. B* [Suppl]: s79 – s81.
- Chen M, Shi L, Sullivan Jr.D (2001) *Haemoproteus* and *Schistosoma* synthesize heme polymers similar to *Plasmodium* hemozoin and β - hemozoin. *Molec. Biochem. Parasitol.* 113: 1-8.
- Chernin E (1952) The relapse phenomenon in *Leucocytozoon* infections of the domestic duck. *Am. J. Hygiene* 56: 101-118.
- Christe P, Møller AP, de Lope F (1998) Immunocompetence and nestling survival in the house martin: “The tasty chick hypothesis”. *Oikos* 83: 175-179.
- Christe P, Møller AP, Saino N, de Lope F (2000) Genetic and environmental components of phenotypic variation in immune response and body size of a colonial bird, the house martin *Delichon urbica*. *Heredity* 85: 75-83.

-
- Combes C (2001) Parasitism. University of Chicago Press. Chicago, I 11.
 - Dawson RD, Bortolotti GR (2000) Effects of hematozoan parasites on condition and return rates of American kestrels. *Auk* 117: 373-380.
 - González G, Sorci G, de Lope F (1999) Seasonal variation in the relationship between cellular immune response and badge size in male house sparrows (*Passer domesticus*). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 46: 117-122.
 - Goto N, Kodama H, Okada K, Fujimoto Y (1978) Suppression of phytohaemagglutinin skin response in thymectomized chickens. *Poultry Sci.* 52: 246-250.
 - Hochberg ME, Michalakis Y, de Meeus T (1992) Parasitism as a constraint on the rate of life-history evolution. *J. Evol. Biol.* 5: 491-504.
 - Hõrak P, Tegelmann L, Ots I, Møller AP (1999) Immune function and survival of great tit nestlings in relation to growth conditions. *Oecologia* 121: 316-322.
 - Korpimäki E, Tolonen P, Bennett GF (1995) Blood parasites, sexual selection and reproductive success of European kestrels. *Ecoscience* 2: 335-343.
 - Lehmann T (1993) Ectoparasites: Direct impact on host fitness. *Parasitol. Today* 9: 8-13.
 - Martin T, Møller AP, Merino S, Clobert J (2001) Does clutch size evolve in response to parasites and immunocompetence? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 2071-2076.
 - Mayorga P, Deharo E, Landay I, Couarraze G (1997) Preliminary evaluation of primaquine activity on rodent malaria model after transdermal administration. *Parasite* 4: 87-90.
 - Merilä J, Andersson M (1999) Reproductive effort and success are related to hematozoan infection in blue tits. *Ecoscience* 6: 421-428.
 - Merino S, Potti J, Moreno J (1996) Maternal effort mediates the prevalence of trypanosomes in the offspring of a passerine bird. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5726-5730.
 - Merino S, Potti J, Fargallo JA (1997) Blood parasites of some passerine birds from Central Spain. *J. Wildl. Dis.* 33: 638-641.
 - Merino S, Moreno J, Sanz JJ, Arriero E (2000) Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). *Proc. R. Soc. Lond. B* 267: 2507-2510.

-
- Miller LH, Baruch DR, Marsh K, Doumbo OK (2002) The pathogenic basis of malaria. *Nature* 415: 673-679.
 - Møller AP (1974) A three-year study in colonies of house martins (*Delichon urbica*) by means of artificial nests. *Flora Fauna* 80: 74-80.
 - Møller AP (1991) Ectoparasite loads affect optimal clutch size in swallows. *Funct. Ecol.* 5: 351-359.
 - Møller AP (1997) Parasitism and the evolution of host life history. In: Clayton DH, Moore J (eds) *Host-parasite evolution: General principles and avian models*. Oxford University Press, Oxford, pp 105-127.
 - Navarro C, Marzal A, de Lope F, Møller AP (2003) Dynamics of an immune response in house sparrow *Passer domesticus* in relation to time of day, body condition and blood parasite infection. *Oikos* 101: 291-298.
 - Noble ER, Noble GA (1976) *Parasitology*. Philadelphia: Lea and Febiger
 - Oppliger A, Christe P, Richner H (1996) Clutch size and malaria resistance. *Nature* 381: 565
 - Oppliger A, Christe P, Richner H (1997) Clutch size and malarial parasites in female great tits. *Behav. Ecol.* 8: 148-152.
 - Pajuelo L, de Lope F, da Silva E (1992) Biología de la reproducción del avión común (*Delichon urbica*) en Badajoz, España. *Ardeola* 39: 15-23.
 - Parmentier HK, Scharma JW, Meijer F, Nieuwland MGB (1993) Cutaneous hypersensitivity responses in chickens divergently selected for antibody responses to sheep red blood cells. *Poultry Sci.* 72: 1679-1692.
 - Price PV (1980) *Evolutionary biology of parasites*. Princeton: Princeton University Press.
 - Redig PT, Talbot B, Guamera T (1993) Avian malaria. *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians, 1993*. Lake Worth, Florida: AAV; 173-181.
 - Richner H, P Heeb (1995) Are clutch and brood size patterns in birds shaped by ectoparasites? *Oikos* 73: 435-441.
 - Roff DA (2001) *Life history evolution*. Sunderland, MA: Sinauer Associates Inc.
 - Saino N, Calza S, Møller AP (1997) Immunocompetence of nestling barn swallows in relation to brood size and parental effort. *J. Anim. Ecol.* 66: 827-836.

-
- Saino N, Ferrari R, Romano M, Martinelli R, Møller AP (2003) Experimental manipulation of egg quality affects immunity of barn swallow nestlings. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270: 2485 - 2489.
 - Sanz JJ, Arriero E, Moreno J, Merino S (2001) Interactions between hemoparasite status and female age in the primary reproductive output of pied flycatchers. *Oecologia* 126: 339-344.
 - Sheldon BC, Verhulst S (1996) Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends Ecol Evol* 11: 317-321.
 - Smits J, Bortolotti G, Tella J (1999) Simplifying the phytohemagglutinin skin-testing technique in studies of avian immunocompetence. *Funct. Ecol.* 13: 567–572.
 - Soler M, Martín-Vivaldi M, Marín JM, Møller AP (1999) Weight lifting and health status in the black wheatear. *Behav. Ecol.* 10: 281-286.
 - Sundberg J (1995) Parasites, plumage coloration and reproductive success in the yellowhammer, *Emberiza citrinella*. *Oikos* 74: 331-339.
 - Surai PF (2003) Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction. Nottingham University Press, Nottingham
 - Wakelin D (1996) Immunity to parasites: How parasitic infections are controlled. Cambridge University Press, Cambridge
 - Wendeln H, Becker PH (1996): Body mass change in breeding Common Terns *Sterna hirundo*. *Bird Study* 43: 85-95
 - Wiehn J, Korpimäki E, Pen I (1999) Haematozoan infections in the Eurasian kestrel: effects of fluctuating food supply and experimental manipulation of paternal effort. *Oikos* 84: 87-98.

Chapter III

Life history costs of an immune response

LIFE HISTORY COSTS OF AN IMMUNE
RESPONSE

Oecología (2005) in review

Abstract

Immune responses constitute a major way for hosts to defend themselves against parasites. Since hosts do not habitually produce strong responses all the time, immune responses must be costly to maintain or produce. We tested experimentally if the production of a response to a challenge with a novel antigen resulted in a cost in terms of life history, using the highly colonial house martin *Delichon urbica* as a model system. We injected adult breeding birds during laying of the first clutch with Newcastle disease virus (NDV) or a control injection, and the clutch was subsequently removed to induce re-laying. NDV stimulates the non-specific immune system, causing production of antibodies during a period of more than two weeks. Accordingly, we found a change in leukocyte counts in experimental birds compared to controls. Experimental treatment reduced the frequency of re-laying, caused a delay in timing of re-laying and a reduction in clutch size. Quality of nestlings in terms of body size, body mass and T-cell mediated immune response did not differ significantly between treatments. Therefore, seasonal reproductive success differed significantly between treatments, showing that the production of an immune response is costly in terms of future fecundity.

INTRODUCTION

Parasitism is major cause of reduced fecundity and viability in free-living and domesticated animals and plants. Therefore, hosts have evolved many different defences to cope with the fitness costs of parasitism. These include means of avoiding infection in the first place, and ways of eliminating or reducing the effects of parasitism once infected (e. g. Hart 1997). The immune system has evolved as a major way of reducing and controlling the effects of parasitism, due to its ability to distinguish between self and non-self (e. g. Roitt *et al.* 1996). General and specific immune responses allow the host to respond efficiently to parasite challenge, causing reductions in viability and fecundity of parasites. Strong immune responses are supposed to be beneficial because they prevent or reduce the effects of parasites on host fecundity or viability. This raises the question why hosts not generally maintain strong immune defences if these are generally beneficial. Since that is not the case, because immune responses are mainly or only produced when hosts are challenged by parasite attacks, this suggests that there are significant costs associated with production of immune responses.

The costs of immunity arise from development of the immune system, maintenance and active use (Klasing 2004). These costs can be measured in terms of energetics, auto-immune responses, or effects on life history (e. g. Råberg *et al.* 1998; Lochmiller and Deerenberg 2000; Jacot *et al.* 2004). For example, Ots *et al.* (2001) investigated energetic costs of an immune response in great tits *Parus major* during winter. A second study of the energetic cost of immunity in white cabbage butterfly *Pieris rapae* showed elevated metabolic costs in experimental animals compared to controls (Freitak *et al.* 2003). A second kind of cost of immunity is based on the assumption that a strong immune system may turn itself against the host, causing health problems in terms of auto-immune diseases (Råberg *et al.* 1998). While several examples of such diseases in humans are consistent with this idea (review in Råberg *et al.* 1998), there are to the best of our knowledge no studies of this mechanism in free-living organisms. Finally, immune responses may be costly in terms of future fecundity or viability because the costs of maintenance and production of immunity are traded against other life history characters. This kind of cost has been a major focus of research in ecological immunology during the last five years. Studies of life history costs of immunity include reduced viability in bumble bees *Bombus terrestris* (Baer and

Schmid-Hempel 1999), reduced parental effort in pied flycatchers *Ficedula hypoleuca* with activated immunity (Råberg *et al.* 2000), and longer duration of nestling periods in species of birds with strong immune responses (Møller *et al.* 2001).

While these studies suggest that such costs are common, it still remains unknown what determines their magnitude, and whether there are significant differences among species of hosts. For example, comparative studies of immune responses in different species of hosts have indicated very large differences in the strength of immune responses among species. These differences are accounted for by the probability and frequency of transmission of parasites (e. g. Møller & Erritzøe 1996; Møller *et al.* 2001; van Nouhuys and Hanski 2002). These findings would imply that the costs of immunity would be particularly large in host species that suffer the most from attacks by virulent parasites. Consistent with this prediction, a comparative study of members of the swallow family suggested that species that produced strong immune responses had relatively long developmental periods for their body size (Møller *et al.* 2001). Here we extend these studies by directly quantifying the life history costs of an immune response, using a highly social avian species of host with strong negative impact of parasites on reproductive success. A high degree of coloniality in birds is associated with food that occurs unpredictably in time and space, potentially making costs of immune responses particularly severe in species with such a life history.

The aims of this study were to quantify the life history costs of production of an immune response, by injecting reproducing adults with a novel antigen while keeping a second group of adults as injected controls. We used the house martin *Delichon urbica* as a model system for this experiment because the highly social life of this species should make it particularly affected by virulent parasites that are readily horizontally transmitted among adults in the large breeding colonies. The life history costs of immunity were assessed by removal of the first clutch upon injection, after which we recorded the frequency and timing of relaying and the success of the replacement clutch. If the injection with a novel antigen is costly in terms of life history, we would predict that fewer adult females in the treatment group laid a replacement clutch, did so on a later date and laid fewer eggs than control females. The magnitude of the cost would be directly proportional to the magnitude of the effects of treatment on reproductive variables in the replacement clutch.

The house martin is a highly colonial, insectivorous passerine that breed in colonies with a maximum size of more than 1000 pairs. This migratory species arrives

from the winter quarters in early spring, and both males and females build a new nest or refurbish an old one. A first clutch of 3-6 eggs is laid some weeks later, incubated for ca. 15 days, after which the nestlings are fed for three-four weeks. Most pairs lay a second clutch. The large colonies facilitate transmission of many different species of specialist and generalist parasites that impose important fitness costs on the hosts in terms of reduced reproductive success (de Lope *et al.* 1993; Christe *et al.* 1998; Marzal *et al.* 2005). Previous studies have shown that house martins produce strong T-cell responses compared to other species of hirundines (Møller *et al.* 2001), and that immune responses are affected by environmental and genetic components (Christe *et al.* 2000).

MATERIALS AND METHODS

Study area and general methods

The study was carried out in a colony of house martins in the surroundings of Badajoz (38°50'N, 6°59'W), southwest Spain during the breeding season of 2004.

Nests were inspected every second day to determine start of laying. When the first clutch was finished, as shown by no more eggs being added to the clutch, females were captured in their nest at dawn. They were then randomly assigned to one of two treatments: (1) treatment group that was injected with 40 µl Newcastle Disease Virus (NDV, n = 17; avian reovirus, infectious bronchitis, gumboro and Newcastle disease vaccine, NOBILIS®); or (2) a control group injected with 40 µl physiological water that was used to quantify the effects of treatment per se on females (PBS, n = 14).

Before treatment of adult females we recorded wing length, tail length and wingspan with a ruler to the nearest mm, beak length, tarsus length and keel length with a digital calliper to the nearest 0.01 mm, and body mass with a Pesola spring balance to the nearest 0.5 g. Feathers were inspected for the presence of growth bars, chewing lice and feather mites by holding the extended wing and tail against the light and counting bars and parasites. See Christe *et al.* (2002) for detailed information. A blood sample was taken in a capillary from the brachial vein and a blood smear was made to allow quantification of leukocytes and blood parasites at the start of the experiment.

Following injection, the first clutch was removed in order to induce relaying. Nests were subsequently checked for relaying two days, and presence of a replacement clutch, time of start of relaying and size of the replacement clutch was recorded.

When the nestlings were 9 days old we recaptured females and took a second blood sample to allow quantification of blood parasites and leukocytes following treatment. In addition, we recorded body mass and the abundance of chewing lice and feather mites, as described above.

Blood samples were fixed in absolute methanol and stained with Giemsa. Half of each smear was examined under 200x magnification in search of large extra-erythrocytic Haematozoa (i.e. Trypanosoma), and in the other half of the smear 20 fields were scanned under 400x magnification for intra-erythrocytic Haematozoa (i.e. Haemoproteus). The intensity of extra-erythrocytic parasites was quantified as number of parasites per 100 fields, and number of parasites per 2,000 erythrocytes for intra-erythrocytic parasites under 1,000x magnification with oil immersion (Merino *et al.* 1997).

Finally, when nestlings were 14 days old we measured tarsus length to the nearest 0.01 mm, body mass to the nearest 0.5 g, and took a blood sample in a capillary tube for measurement of hematocrit and made a blood smear, as described above. Nestlings were tested for T-cell mediated immune response to an intra-dermal injection in the patagium with 0.04 mg phytohemagglutinin (PHA) in 0.1 ml PBS. The thickness of the patagium was measured with a pressure-sensitive calliper (Digimatic Indicator ID-C Mitutoyo Absolute cod. 547-301 Japan) to the nearest 0.01 mm, and the thickness was subsequently re-measured after 24 hours. T-cell response was expressed as the difference in thickness at the end of the 24 hours period minus thickness at the beginning of this period. See Christe *et al.* (2001) and Smits *et al.* (1999) for further details.

Statistical methods

We tested if variables were normally distributed, and we used parametric or non-parametric tests accordingly to determine if differences between groups were statistically significant. We used repeated-measures analysis of variance to test for changes in reproductive variables between first and replacement clutches, while taking the dependence of the measurements into account. Finally, we used analysis of

covariance to test for treatment effects while simultaneously controlling for potentially confounding continuous variables.

All values reported are means \pm SE.

RESULTS

Females of the two groups did not differ significantly in any phenotypic measure, laying date or clutch size before treatment (all $P > 0.05$; Table 1), implying that there was no unintentional bias in composition of samples. Thus, we assume in the following that treatments were effectively randomised by our procedures. However, we used pre-treatment values of phenotype in the repeated-measures analysis of variance to control for any pre-treatment variation among groups.

Table 1. Mean (SD) of phenotypic and other variables of treatment and control females before treatment, first clutch date (day 1 = 1 March) and size of first clutch

TABLE 1	Treatment	Control	Z (Mann-Witney U test)	P
Wing length	105.59 (2.24)	105.52 (2.07)	- 0.052	0.958
Rectriz length	60.00 (2.29)	59.64 (2.52)	- 0.556	0.579
Envergadura	282.90 (5.41)	283.02 (5.20)	- 0.211	0.833
Bill length	6.44 (0.35)	6.46 (0.44)	- 0.026	0.979
Tarsus length	11.12 (0.27)	11.14 (0.39)	- 0.813	0.416
Keel length	18.034 (0.695)	18.33 (0.84)	- 1.289	0.197
Body mass	16.00 (1.30)	16.39 (1.09)	- 0.807	0.444
Growth bars	19.22 (2.46)	19.02 (2.17)	- 0.165	0.869
Haematocrit (%)	49.412 (3.606)	50.071 (3.626)	- 0.599	0.570
Firts clutch size	4.706 (0.686)	4.857 (0.363)	- 0.675	0.625
Date of clutch	73.81 (26.99)	60.35 (13.10)	- 0.507	0.612

Experimental females injected with NDV took significantly longer to lay their replacement clutch than control females, the mean difference between treatment and control females being ca. 5 days or almost two standard deviations (Fig. 1A; Table 2).

Table 2. Mean (SE) reproductive variables for NDV injected and control adult female house martins.

TABLE 2	Treatment (NDV)	Control	Z (Mann-Witney U test)	P
Days between clutches	19.36 (2.78)	14.64 (3.30)	- 3.814	0.001
Brood size at fledging	2.41 (1.46)	3.36 (0.93)	-2.182	0.029
Breeding success	0.56 (0.30)	0.83 (0.20)	-2.712	0.007

Fig 1A. Box plots for NDV injected and control female house martins for time until start of relaying (days). Values are means, standard deviations and extreme observations. Sample sizes are 17 and 14 females, respectively.

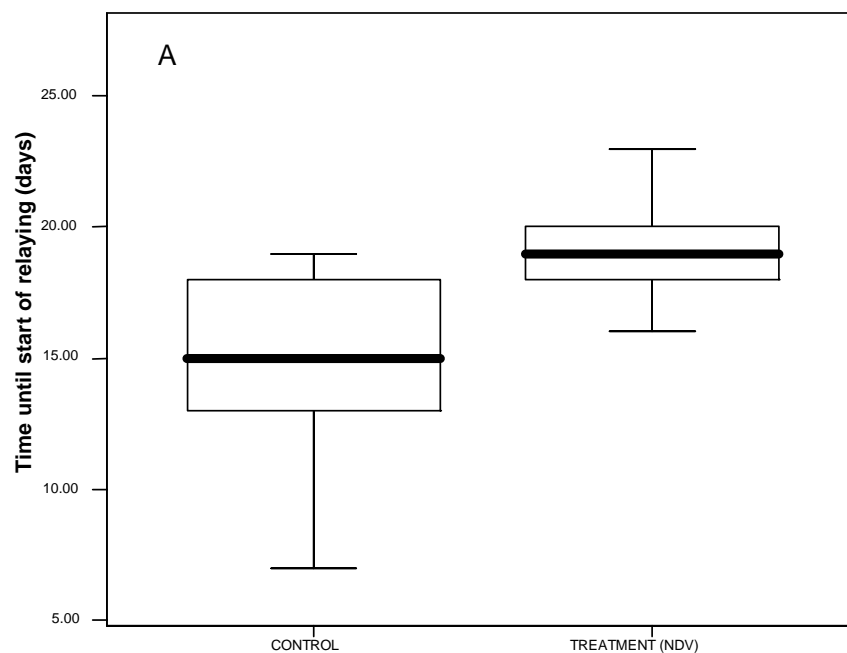
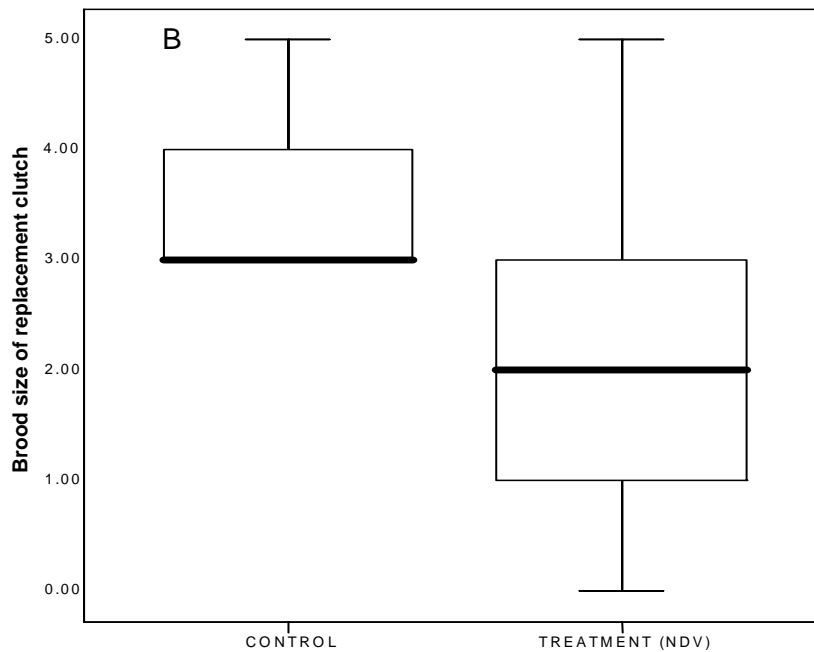


Fig 1B. Box plots for NDV injected and control female house martins for brood size of replacement clutch. Values are means, standard deviations and extreme observations. Sample sizes are 17 and 14 females, respectively.



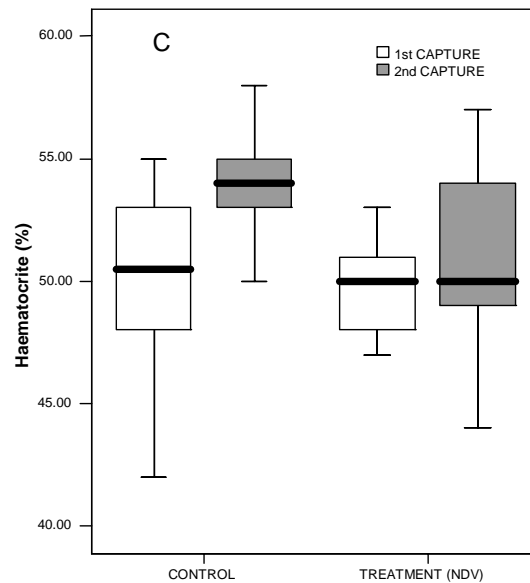
Size of replacement clutches was significantly smaller than the size of the first clutch in both treatment groups (Table 3), although the difference between treatments was not statistically significant. However, control females had significantly more nestlings than treated females, with the two mean values differing by almost one nestling or one standard deviation (Fig. 1B; Table 2). Therefore, reproductive success estimated as the number of fledglings divided by clutch size was on average 83% and significantly higher in control females compared to a mean of 56% in treated females (Table 2).

Control females that had larger brood size also had significantly higher haematocrit at the second capture than at first capture, while that was not the case for treated females (Fig. 1C; Table 3). Body mass of adult females decreased significantly from first to second capture in controls, but did not decrease in the treatment group (Table 3). There was no significant difference in the number of feather mites and the intensity of infection with *Haemoproteus* between captures or treatments (Table 3).

Table 3. Mean (SE) reproductive variables for NDV injected and control adult female house martins.

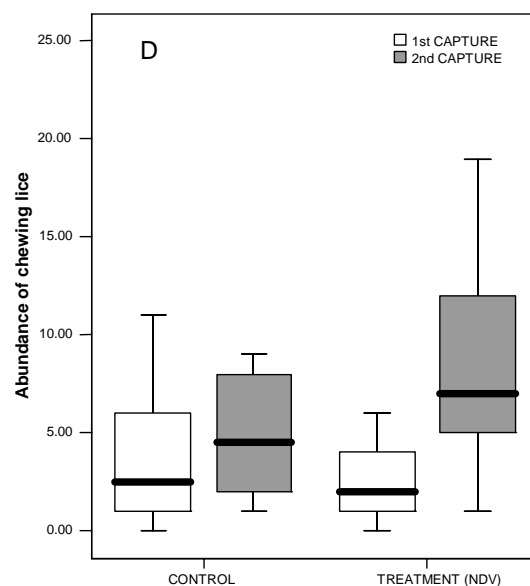
TABLE 3	1 st clutch	Replacement clutch	z (Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test)	P
Clutch size control	4.86 (0.36)	4.07 (0.83)	-2.50	0.013
Clutch size treatment	4.71 (0.69)	4.29 (0.77)	-2.65	0.008
Feather mite control	5.50 (7.47)	12.07 (18.22)	-1.73	0.08
Feather mite treatment	13.00 (23.98)	15.18 (20.47)	-1.54	0.12
Feather lice control	4.79 (6.57)	4.86 (3.06)	-0.67	0.50
Feather lice treatment	4.29 (5.24)	8.77 (5.24)	-2.61	0.009
Haematocrit (%) control	50.07 (3.63)	53.21 (3.07)	-2.66	0.008
Haematocrit (%) treatment	49.41 (3.61)	51.06 (3.38)	-1.17	0.24
Weight (g) control	16.39 (1.10)	15.96 (1.10)	-2.36	0.018
Weight (g) treatment	16.00 (1.30)	15.74 (1.40)	-0.86	0.39
<i>Haemoproteus</i> intensity control	3.11 (10.10)	2.87 (4.14)	-1.79	0.07
<i>Haemoproteus</i> intensity treatment	0.84 (2.21)	1.44 (2.59)	-0.96	0.34
Leukocytes control	44.00 (18.5)	40.21 (9.08)	-0.16	0.88
Leukocytes treatment	31.47 (13.46)	45.24 (18.07)	11.12	0.004

Fig 1C. Box plots for NDV injected and control female house martins for haematocrit. Values are means, standard deviations and extreme observations. Sample sizes are 17 and 14 females, respectively.



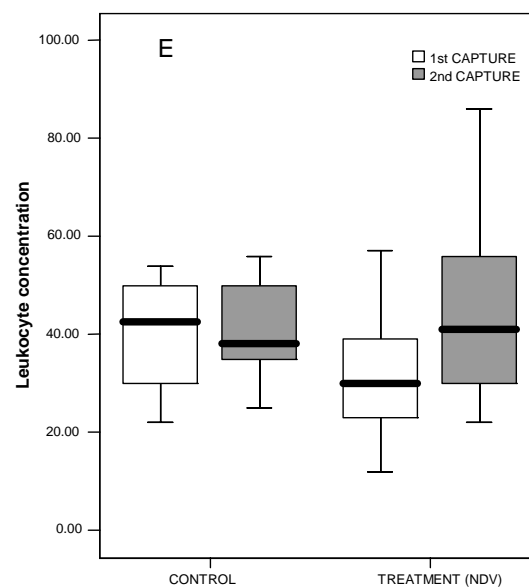
However, the number of feather lice increased significantly between captures in treated females, but not in controls (Fig. 1D; Table 2).

Fig 1D. Box plots for NDV injected and control female house martins for abundance of chewing lice. Values are means, standard deviations and extreme observations. Sample sizes are 17 and 14 females, respectively.



Leukocyte counts of adult females that received the NDV treatment increased significantly between captures, while that was not the case for control females (Fig. 1E; Table 2). When entering time until relaying as a covariate in an analysis of covariance, with treatment as a factor, we still found a significant effect of treatment on leukocyte counts ($F = 8.20$, d. f. = 1, 28, $P = 0.008$).

Fig 1E. Box plots for NDV injected and control female house martins for leukocyte concentration. Values are means, standard deviations and extreme observations. Sample sizes are 17 and 14 females, respectively.



There was no significant difference in quality of nestlings between treatment groups. Mean tarsus length, body mass, haematocrit and T-cell response did not differ between treatments (Table 4).

Table 4. Mean (SE) nestling quality of treated and control females. The number of nestlings in the treated nest was 41 and in controls 48. Differences for nestlings were tested by using brood means.

TABLE 4	Tratamiento	Control	Z (Mann-Witney U test)	P
Nestling haematocrit (%)	43.35 (4.42)	44.57 (2.74)	-0.80	0.44
Nestling tarsus length (mm)	10.84 (0.48)	11.04 (0.45)	-1.63	0.11
Nestling weight (g)	20.28 (2.34)	21.11 (2.54)	-1.25	0.22
Nestling T-cell response (mm)	113.44 (39.00)	133.51 (43.64)	-0.56	0.60

DISCUSSION

The main results of this experimental study of the life history costs of immunity were that a challenge of the immune system of adult females caused a significant delay in start of reproduction, a reduction in overall reproductive success, and an increase in the abundance of chewing lice. In contrast, there were no effects of experimental treatment on phenotypic quality of nestlings, suggesting that the costs of immunity were paid directly by reproducing females. We will briefly discuss each of these main findings.

Newcastle Disease Virus (NDV) is a common virus found in many different species of wild and domesticated birds, causing significant mortality (Alexander 1997; Kuiken *et al.* 1998). Injection with NDV results in the production of a specific and a non-specific immune response with the exponential increase in specific antibodies lasting 7-10 days in different bird species, but it could be maintained even as long as 28 days after vaccination (Svensson *et al.* 1998; Saino *et al.* 2002; Rahman *et al.* 2004). We did not quantify the concentration of specific antibodies in our experiment.

However, we found that the concentration of leukocytes increased significantly between first capture, when the antigen was injected, and the second capture when nestlings were nine days old. An alternative interpretation of the significant difference in temporal patterns of increase of leukocyte counts between treatments could be that the delay in reproduction in treated as compared to control females caused the former to be sampled later during the breeding season. Since the abundance of parasites increases throughout the breeding season (Allander and Sundberg 1997; Møller *et al.* 2003), we should expect later breeding house martins to be exposed to more parasites and hence have higher circulating levels of leukocytes. Such an effect has already been described for the house martin (Christe *et al.* 2001). However, when using the delay until start of the replacement clutch as a covariate, we still found a significant effect of treatment on the concentration of leukocytes. Thus, this difference between treatments cannot be considered a simple effect of differences in delay among treatments, but must be considered a real long-term physiological response of females to differences in costs of immunity.

Challenge of the immune system with NDV affected the timing of reproduction by causing a delay in start of laying among treated females. Many different species show sharp seasonal declines in reproductive success, in particular among single-brooded species that only have to optimise timing of a single clutch (Crick *et al.* 1993). In contrast, double-brooded species tend to start laying before the seasonal peak of food abundance to optimise laying of both first and second clutch (Crick *et al.* 1993). Two general hypotheses have been proposed to explain patterns of seasonal decline in reproductive success (Arnold *et al.* 2004). The timing hypothesis suggests that reproductive success declines due to factors associated with date of laying such as changes in environmental conditions, reduced breeding synchrony, and/or parental restraint as a result of lower reproductive value of late-reared chicks (Hatchwell 1991; Moreno 1998; Arnold *et al.* 2004). The parental quality hypothesis suggests that reproductive success declines because individuals that lay late in the season tend to be younger, less experienced and/or of lower quality than those that lay early (Parson 1975; Hatchwell 1991; Brinkhoff *et al.* 1993). Our finding, that reproduction was delayed by a challenge of the immune system of adult females, is consistent with the timing hypothesis. The reason is that a change in environmental conditions as reflected by changes in the abundance of parasites (in our experiment simulated by random

allocation of challenge of the immune system to adult females) caused the delay in timing of reproduction.

A challenge of the immune system with NDV did not significantly affect clutch size, but caused a significant difference in brood size and reproductive success. This effect amounted to a difference in brood size of one standard deviation between the two groups. The overall effect on reproductive success is likely to be stronger than indicated by the difference in brood size because the timing of fledging is delayed by five days on average in treated as compared to control females. Previous studies of the effects of parasites on reproductive success in the house martin (de Lope *et al.* 1993; Christe *et al.* 2000; Marzal *et al.* 2005) could potentially partly be explained by the effects of parasites on costs of immunity in the host. Obviously, hosts should only incur such costs if benefits could be achieved in terms of reduced fitness consequences of parasitism. However, this does not preclude the possibility that a fraction of the costs of parasitism are due to the direct effects of parasites on immunological costs in the host.

We investigated the effects of experimental treatment on three different species of parasites in a powerful design that relied on using individuals as their own controls. We found no evidence of clear changes in abundance in feather mites or blood parasites of the genus *Haemoproteus*; a common parasite of house martins in our study area (Marzal *et al.* 2005). However, the abundance of chewing lice increased significantly in treated females, but not in controls. This effect could be explained by the former category of females having less time and energy available for preening (Mooring 1995; Giorgi *et al.* 2001; Moore 2002). The increase in the abundance of chewing lice could potentially have detrimental effects on flight performance (Barbosa *et al.* 2003) and thereby indirectly influence the ability of females to capture insect prey.

We estimated nestling quality for treated and control females, but did not find any evidence of significant differences in phenotype. However, there was a clear effect of treatment on reproductive success, suggesting that the absence of an effect of treatment on nestling quality was due to low quality nestlings dying disproportionately more often in the treatment than the control group. The cost of immunity could affect the quality or quantity of parental care, as shown previously in other species (Ilmonen *et al.* 2000; Råberg *et al.* 2000). Challenge of the immune system of mothers could also affect maternal transfer of antibodies (Saino *et al.* 2002) and thereby indirectly influence the development of nestlings. We were unable to assess the amount of parental care in the house martin, and, therefore, we cannot assess whether treatment

affected reproductive success through effects on parental care or other mechanisms. These interpretations are supported by the observation that haematocrit increased significantly in control females, but not in NDV-injected females. An increase in haematocrit is indicative of higher levels of activity (Christe *et al.* 2002; Sánchez-Guzmán *et al.* 2004), such as seen during the nestling period when adults increase the rate of capture of insect prey for their offspring.

In conclusion, we have shown that injection of adult female house martins with a novel antigen caused a significant delay in timing of reproduction and in overall reproductive success. This provides evidence of significant life history costs of immunity in a colonial passerine bird with strong impact of parasites on reproductive success.

REFERENCES

- Alexander DJ (1997) Newcastle disease and other avian Paramyxoviridae infections. In: Diseases of Poultry, 10th ed. B. W. Calnek (ed). Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, pp. 541-582.
- Allander K, Sundberg J (1997) Temporal variation and reliability of blood parasite levels in captive yellowhammer males *Emberiza citrinella*. *J Avian Biol* 28: 325–330
- Arnold JM, Hatch JJ, Nisbet ICT (2004) Seasonal declines in reproductive success of the common tern *Sterna hirundo*: timing or parental quality? *J Avian Biol* 35: 33-45.
- Baer B, Schmid-Hempel P (1999) Experimental variation in polyandry affects parasite loads and fitness in a bumblebee. *Nature* 397: 151 – 154.
- Barbosa A, Merino S, Møller AP, de Lope F (2003) Effects of feather lice on the flight behavior of male barn swallows (*Hirundo rustica*). *Auk* 119: 213-216
- Brinkhof MWG, Cavé AJ, Perdeck AC (1993) Timing of reproduction and fledging success in the coot *Fulica atra*: evidence for a causal relationship. *J Anim Ecol* 62: 577 – 587

-
- Christe P, Møller AP, de Lope F (1998) Immunocompetence and nestling survival in the house martin: “The tasty chick hypothesis”. *Oikos* 83: 175-179
 - Christe P, Møller AP, Saino N, de Lope F (2000) Genetic and environmental components of phenotypic variation in immune response and body size of a colonial bird, the house martin *Delichon urbica*. *Heredity* 85: 75-83
 - Christe P, de Lope F, González G, Saino N, Møller A (2001) The influence of environmental conditions on immune responses morphology and recapture probability of nestling house martins (*Delichon urbica*). *Oecologia* 126: 333-338
 - Christe P, Møller AP, González G, de Lope F (2002) Intraseasonal variation in immune defence body mass and hematocrit in adult house martin *Delichon urbica*. *J Avian Biol* 33: 321-325.
 - Crick HQP, Gibbons DW, Magrath RD (1993) Seasonal changes in clutch size in British birds. *J Anim Ecol* 62: 263 - 273
 - Freitak D, Ots I, Vanatoa A, Hõrak P (2003) Immune response is energetically costly in white cabbage butterfly pupae. *Proc R Soc Lond Ser B* 270 [Suppl]: S220-S222
 - Giorgi MS, Arlettaz R, Christe P, Vogel P (2001) The energetic grooming costs imposed by a parasitic mite (*Spinturnix myoti*) upon its bat host (*Myotis myotis*). *Proc R Soc Lond Ser B* 268: 2071–2075
 - Hart BJ (1997) Behavioural defence. In: Clayton DH, Moore J (eds) Host–parasite evolution: general principles and avian models. Oxford University Press, Oxford, pp 59–77
 - Hatchwell BJ (1991) An experimental study of the effects of timing breeding on the reproductive success of common guillemots (*Uria aalge*). *J Anim Ecol* 60: 721 – 736
 - Ilmonen P, Täärna T, Hasselquist D (2000) Experimentally activated immune defence in female pied flycatchers results in reduced breeding success. *Proc R Soc Lond Ser B*. 267: 665-670.
 - Jacot A, Scheuber H, Brinkhof MW (2004) Costs of an induced immune response on sexual display and longevity in field crickets. *Evolution* 58: 2280-2286
 - Klasing KC (2004) The cost of immunity. *Acta Zoologica Sinica* 50: 961 – 964

-
- Kuiken T, Leighton FA, Wobeser G, Danesik KL, Riva J, Heckert RA (1998) An epidemic of Newcastle disease in double-crested cormorants from Saskatchewan. *J Wild Dis* 34: 457-471
 - Lochmiller RL, Deerenberg C (2000) Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos* 88: 87–98.
 - de Lope F, González G, Pérez J, Møller AP (1993) Increased detrimental effects of ectoparasites on their bird hosts during adverse environmental conditions. *Oecologia* 95: 234-240.
 - Marzal A, de Lope F, Navarro C, Møller AP (2005) Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. *Oecologia* 142: 541-545.
 - Merino S, Potti J, Fargallo JA (1997) Blood parasites of some passerine birds from Central Spain. *J Wild Dis* 33: 638-641.
 - Møller AP, Erritzøe J (1996) Parasite virulence and host immune defense: host immune response is related to nest reuse in birds. *Evolution* 50: 2066-2072.
 - Møller AP, Merino S, Brown CR, Robertson RJ (2001) Immune defense and host sociality: A comparative study of swallows and martins. *Am Nat* 158:136 – 145
 - Møller AP, Erritzøe J, Saino N (2003) Seasonal changes in immune response and parasite impact on hosts. *Am Nat* 161: 657-671
 - Moore J (2002) *Parasites and the behaviour of animals*. Oxford University Press, New York.
 - Mooring MS (1995) The effect of tick challenge on grooming rate by impala. *Anim Behav* 50: 377 – 392
 - Moreno J (1998) The determination of seasonal declines in breeding success in seabirds. *Etología* 6: 17 – 31
 - van Nouhuys S, Hanski I (2002) Colonization rates and distances of a host butterfly and two specific parasitoids in a fragmented landscape. *J Anim Ecol* 71: 639–650
 - Ots I, Kerimov AB, Ivankina EV, Ilyina TA, Hõrak P (2001) Immune challenge affects basal metabolic activity in wintering great tits. *Proc R Soc Lond Ser B* 268: 1475-1482
 - Parson J (1975) Seasonal variation in the breeding success of the herring gull: an experimental approach to pre-fledging success. *J Anim Ecol* 44: 553-573.

-
- Råberg L, Grahn M, Hasselquist D, Svensson E (1998) On the adaptive significance of stress-induced immunosuppression. *Proc R Soc Lond Ser B* 265, 1637-1641
 - Råberg L, Nilsson JA, Ilmonen P, Stjernman M, Hasselquist D (2000) The cost of an immune response: vaccination reduces parental effort. *Ecol Lett* 3: 382 - 386.
 - Rahman MB, Rahman MM, Rahman M, Kabir SM, Nazir KH, Amin MM (2004) Efficacy of V₄HR Newcastle Disease (V₄HR-ND) vaccine in broiler birds in Bangladesh. *Int J Poul Sci* 3: 365 – 368.
 - Roitt I, Brostoff J, Male D (1996) *Immunology*. Mosby, London
 - Saino N, Ferrari R, Martnelli R, Romano M, Rubolini D, Møller AP (2002) Early maternal effects mediated by immunity depend on sexual ornamentation of the father in the barn swallow (*Hirundo rustica*). *Proc R Soc Lond Ser B* 269: 1005-1011
 - Sánchez-Guzmán JM, Villegas A, Corbacho C, Moran R, Marzal A, Real R (2004) Response of the haematocrit to body condition changes in northern bald ibis *Geronticus eremita*. *Comp Biochem Physiol, Part A: Mol Integr Physiol* 139: 41 – 47
 - Smits J, Bortolotti G, Tella J (1999) Simplifying the phytohemagglutinin skin-testing technique in studies of avian immunocompetence. *Funct Ecol* 13: 567–572
 - Svensson E, Råberg L, Koch C, Hasselquist D (1998) Energetic stress, immunosuppression and the costs of an antibody response. *Funct Ecol* 12: 912 – 919

Chapter IV

Immune costs of yolk androgen deposition

FEMALE HOUSE MARTINS (*Delichon urbica*) REDUCE EGG ANDROGEN DEPOSITION IN RESPONSE TO A CHALLENGE OF THEIR IMMUNE SYSTEM.

Behavioural Ecology Sociobiology (2005)
(accepted)

Abstract

Female birds deposit in the yolks of eggs substantial amounts of androgens, such as testosterone and androstenedione. These androgens have been shown to speed up nestling development, induce a fast development of ornaments and increase dominance in adults. Experiments in several species have reported that females invest greater amounts of androgens in the eggs fathered by attractive males, suggesting that yolk androgen is a costly investment for either the offspring or the mother. There is some evidence that nestling immunocompetence may be partially suppressed by high levels of yolk androgens, but it is not known whether this is also the case for females. We tested this hypothesis in the house martin by inducing an immune challenge through an injection of sheep red blood cells (SRBC). Experimental birds laid eggs with lower amounts of yolk androstenedione than controls, and there was a similar non significant trend for testosterone. Furthermore, the probability of laying a replacement clutch was higher for birds that had laid a first clutch with relatively high levels of yolk testosterone. These results suggest that yolk androgen deposition is limited by immune costs in the female, and that only females in good condition may afford to invest higher levels of androgen in eggs.

INTRODUCTION

Maternal effects are receiving increasing attention as powerful mechanisms that parents can use to promote adaptation to complex and changing environments (Mousseau & Fox 1998). Since the discovery of egg androgens in avian eggs (Schwabl 1993), a growing body of research has found that minute differences in the amount of androgens that a bird receives in the yolk can have important effects on its future development. Importantly, these effects start right at the beginning of development, and high levels of egg androgens have been found to result in short incubation periods and improved embryo growth (Schwabl 1996b; Lipar & Ketterson 2000; Eising *et al.* 2001). This leads to a cascade of effects that include increased begging rates, fast development of sexual ornaments and higher social dominance (Schwabl 1993; Eising & Groothuis 2003; Strasser & Schwabl 2004).

Despite these obvious benefits not all females lay eggs with high levels of androgens (see for instance Pilz *et al.* 2003). Furthermore, experimental work in three different bird species shows differential allocation of egg androgen to the eggs of attractive males (Gil *et al.* 1999; Gil *et al.* 2004; Tanvez *et al.* 2004; Gil *et al.* in press). This pattern suggests that high levels of yolk androgens must carry some type of costs, either for the offspring or the female (Gil 2003). A recent study has indeed found that nestlings hatching from testosterone injected eggs have a reduced cellular immune response (Groothuis *et al.* 2005). However, no study so far has addressed the possibility that the cost may be paid by the female that lays those eggs. This is highly probable, since high androgen titres can be immunosuppressive for females (Duffy & Ball 2002). In the present study we tested this hypothesis in the house martin *Delichon urbica*, by challenging experimental females with an injection of sheep red blood cells (SRBC) and comparing the levels of androgens laid in the eggs of these females with those laid by control birds. SRBC injection is a standard test developed to challenge the cell-mediated immune system, causing a peak in specific antibodies 10-15 days post injection (Roitt *et al.* 1996).

MATERIAL AND METHODS

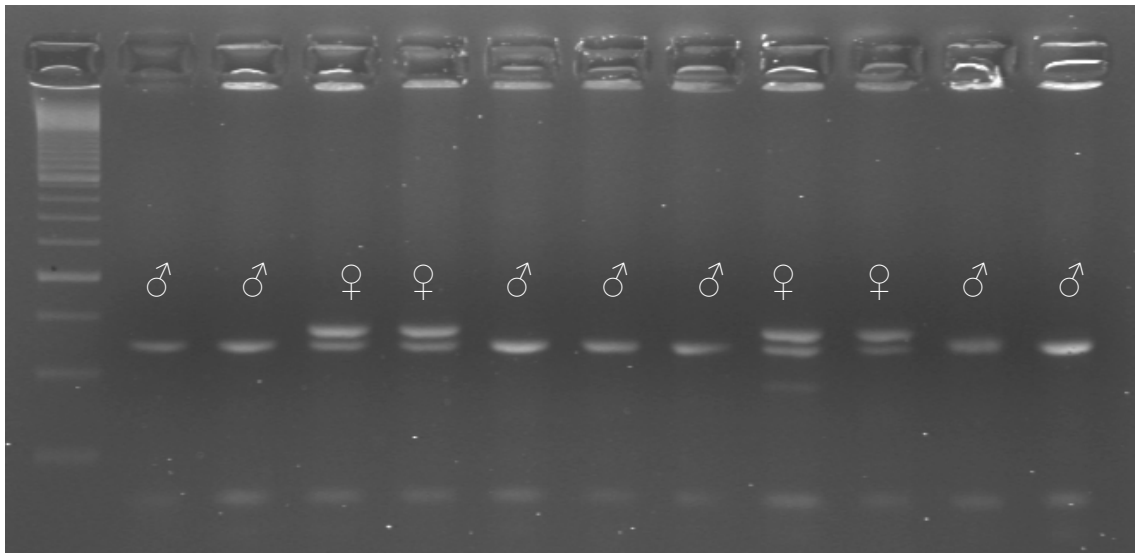
The study was done in a large colony of house martins in the University of Extremadura (Badajoz) during February-May 2001. Nests were visited every 2 days from early February and new eggs found were marked daily with a indelible marker. Females were captured in their nests at dawn when they had been incubating 4 days (mean = 3.77, SD = 1.13) and injected subcutaneously with either 0.1 ml of a 5% solution of SRBC or the same volume of phosphate buffered saline. Females were haphazardly allocated to experimental groups and did not differ in biometry or age. We subsequently followed these nests and collected their second broods after a similar period of incubation (mean = 3.96, SD = 0.71).

Eggs were frozen at -20°C until dissection. We dissected the yolk from the embryo while the egg was still frozen to allow a good separation. Yolk was weighed and steroids extracted by adding 3 ml of diethyl ether to the sample, vortexing, centrifuging and decanting the ether phase after separation by snap-freezing in a bath of ethanol at -20°C . The ether phase was evaporated under a stream of nitrogen and dissolved in a fixed volume of PBS. We used commercial I125 RIA kits for assaying the samples (DSL Labs, USA). These kits have highly specific (100%) antibodies for their target hormone and low cross reactivity with other hormones. Reported cross-reactivity of the androstenedione kit was less than 1% for all hormones tested, and less than 5% in the case of the testosterone kit (except 5α -DHT which was 5.8%). The intra-assay coefficient of variation was 5.4 for testosterone and 6.8 for androstenedione. The inter-assay coefficient of variation was 13.3 for testosterone and 8.85 for androstenedione.

Sex was determined by amplification of a sex-specific bird product following the procedures reported by Griffiths *et al.* (1998). DNA was extracted using Chelex® 100 resin (Bio-Rad Laboratories, CA). The sex identification test employs the P8 (5'-CTCCAAGGATGAGRAAYTG-3') and P2 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3') primers (Griffiths *et al.* 1998) and PCR amplification was carried out in a total volume of 25 μL . The final reaction conditions were as follows: 20 μL ddH₂O (Sigma, St Louis, Mo); 2.5 μL of Taq DNA polymerase 10X buffer (Promega), 50 mM of each dNTP; 100 ng of each primer and 0.5 units of Taq polymerase (Promega). Between 50 and 250 ng of genomic DNA was used as template. A layer of 2 μL of mineral oil were added to

avoid evaporation. PCR was performed in a Intelligent Heating Block (Cherlyn Electronics Ltd). An initial denaturing step at 94 °C for 5 min, 55 °C for 2 min and 72 °C for 5 min was followed by 35 cycles of 94 °C for 1 min, 55°C for 2 min and 72°C for 5 min. A final run of 72°C for 7 min completed the program. PCR products were separated by electrophoresis for 105 min at 50 V in a 3% agarose gel stained with ethidium bromide.

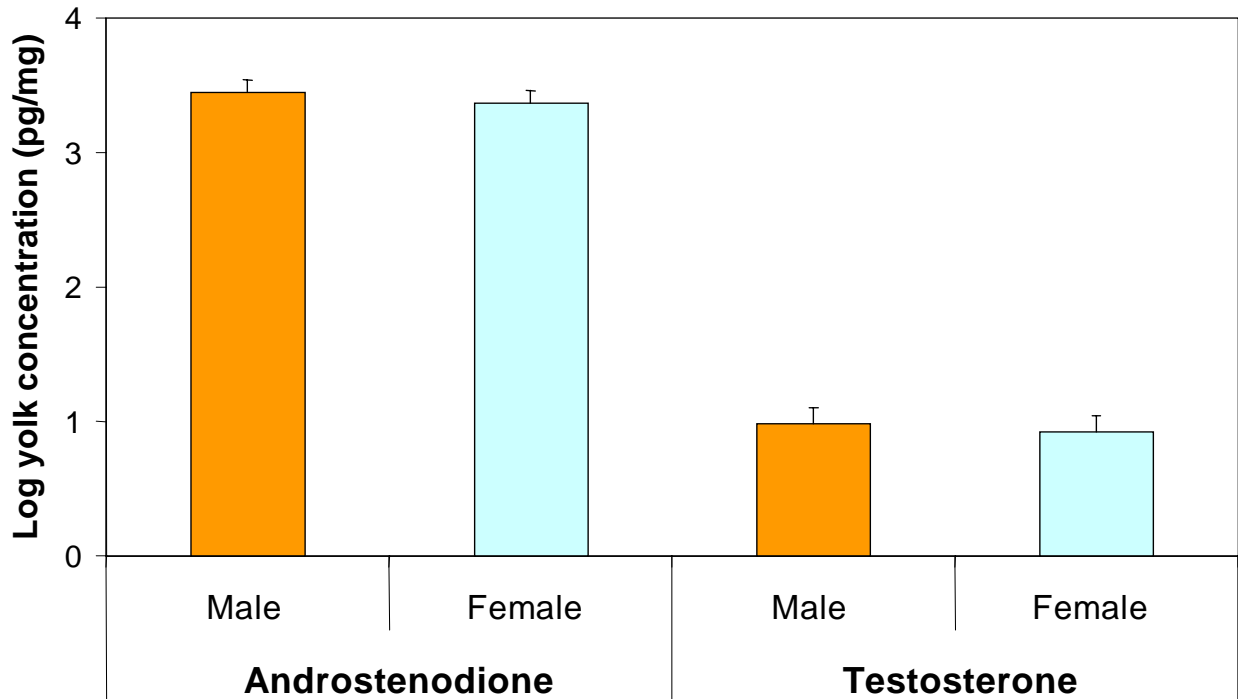
Fig. 1 Developing of PCR product in agarose gel



RESULTS

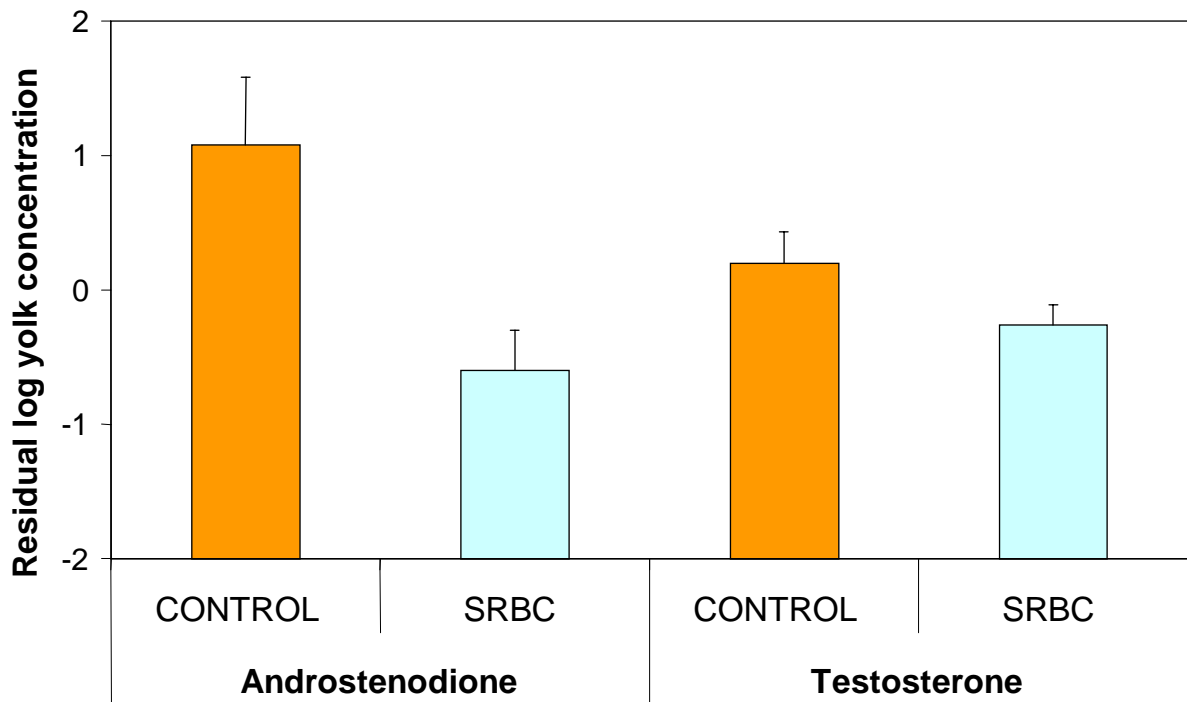
We ran some exploratory models to assess uncontrolled sources of variance in egg androgen concentration, declaring brood a random factor, and including embryo sex and laying order, as well as its interaction as fixed factors. Neither sex nor its interaction with laying order were significant: male and female eggs contained similar amounts of androgens ($\log T$: $F_{1,64.9} = 0.54$, $P = 0.46$; $\log A_4$: $F_{1,65.1} = 1.49$, $P = 0.22$; Fig. 2).

Fig. 2 Embryo sex did not influence androgen yolk composition (pg/mg). Graph shows least squares means plus SE.



Both androgens increased with increasing laying order (log T: $F_{1,63.3} = 11.7$, $P < 0.001$, estimate (SE) = 0.11 (0.03); log A4: $F_{1,63.4} = 7.26$, $P < 0.01$, estimate (SE) = 0.06 (0.02); Fig. 3).

Fig. 3 Differences between groups in androgen yolk composition in replacement clutches. Graph shows means of residual concentrations corrected for laying order plus SE.



Laying order is confounded by differential incubation time, since females typically start incubating before the last egg is laid, and it has been shown that androgen concentration decreases with incubation time, probably because of yolk and albumen mixing (Elf & Fivizzani 2002; Pilz *et al.* 2005). Therefore, in the following analyses we used female average log yolk androgen concentrations estimated as residuals from the regressions on laying order as a way of controlling for differential incubation time. Results do not change if we use uncorrected raw data instead.

Females injected with SRBC were as likely as control females to lay a replacement clutch (SRBC: 39% vs. PBS: 55%; $\chi^2 = 0.98$, $df = 1$, $P = 0.32$). A stepwise logistic regression using the two androgen concentrations as predictors of the likelihood of laying a replacement clutch showed that females that laid replacement clutches had significantly higher levels of yolk T in their first clutch than females that did not lay a second clutch ($\chi^2 = 6.59$, $df = 1$, $P < 0.05$; mean uncorrected concentrations (SE): 5.1

(0.5) pg/mg vs. 3.4 147 (0.4) pg/mg). Yolk androstenedione was not retained in the final model.

There was a strong repeatability between first and second clutches in yolk T concentration ($r_p = 0.65$, $n = 16$, $P < 0.01$), but not in yolk A4 ($r_p = 0.07$, $n = 16$, $P = 0.87$).

Our main prediction was that the concentration of yolk androgen in replacement broods would be lower for females injected with SRBC than for control females. We ran GLMs for yolk T and A4 with treatment as a main factor. In the case of yolk T we added first clutch yolk T concentration as a covariate to correct for differences in relaying probability. We found that SRBC injected females laid eggs with lower levels of yolk A4 than control females ($F_{1,12} = 6.57$, $P < 0.05$; Fig. 3). Although the trend was in the same direction, there were no significant differences in yolk T levels ($F_{1,12} = 2.55$, $P = 0.13$; Fig. 3).

DISCUSSION

We found that females that had been challenged with a foreign antigen (SRBC) laid eggs that had a lower androstenedione content than control females. A similar pattern, although not statistically significant, was found for yolk testosterone. Since SRBC injection induces a costly immune response that sequesters resources from other body functions, increasing metabolic rates and reducing body condition (Ots *et al.* 2001), our results suggest that egg androgen allocation is costly and that it constitutes a condition-dependent investment. Furthermore, in agreement with this conclusion, we found that the probability of laying a replacement clutch was positively directed with testosterone levels in the first brood, as expected if yolk androgen deposition was a condition dependent trait.

Yolk androgens are passed from the female bird to the egg (Schwabl 1993) and modulate the development of the embryo (Lipar & Ketterson 2000), having long-lasting consequences in behaviour at the nestling and adult stages. Nestlings hatching from eggs experimentally injected with high androgen levels beg more intensively and have shorter incubation periods (Schwabl 1996b; Eising & Groothuis 2003), although the beneficial effects at this stage may be more relevant in situations of strong competition for food (Pilz *et al.* 2004). In adulthood, these birds are more likely to be dominant in

flocks (Schwabl 1993), and develop ornaments earlier than control birds (Strasser & Schwabl 2004).

In agreement with life history theory (Burley 1988), females have been shown to invest higher levels of egg androgens when mated to attractive males (Gil *et al.* 1999; Gil *et al.* 2004; Tanvez *et al.* 2004; Gil *et al.* in press). This pattern of differential allocation suggests that females accrue indirect benefits from these offspring (Sheldon 2000), but also that a high yolk androgen investment is somehow costly (Gil 2003). At least three possibilities can be identified: (1) high levels of yolk androgens can be costly to the offspring, for instance impairing their immune system. Evidence towards this point has recently been identified by a reduced T-cell immune response in androgen treated black headed gull eggs (Groothuis *et al.* 2005); (2) female and male offspring may have different yolk androgen optima in some species, thus limiting the scope of optimal sex ratio determination (Saino *et al.* submitted); and (3) high androgen yolk allocation may be costly for the mother. Our study gives support to this third source of costs.

Androgen levels in females increase around egg laying (Schwabl *et al.* 2005), as a consequence of the high androgen production that takes place in the growing follicles (Staub & De Beer 1997; Johnson 1999). An experimental study in the canary *Serinus canaria* has shown that plasma testosterone levels in the female are a reflection of yolk androgen production (Schwabl 1996a), suggesting that females that lay eggs with high levels of testosterone are also exposed to high testosterone levels in plasma. In agreement with this point, comparative evidence shows that females in colonial species lay eggs with higher amount of androgens (Gil *et al.* unpublished manuscript), and also have higher levels of circulating testosterone (Møller *et al.* 2005). Since high androgen levels have been shown to reduce immune responsiveness in males as well as females (Folstad & Karter 1992; Verhulst *et al.* 1999; Duffy *et al.* 2000), our results suggest that the immune response against SRBC injection interfered with androgen production in our experimental birds. This would have resulted in the reduced amount of androgens that we found in the yolks laid by these females.

However, evidence from other studies suggest that there is a complex relationship between costs, benefits and yolk androgen investment. For instance, androgen injections in American kestrels *Falco sparverius* were found to increase nestling mortality (Sockman & Schwabl 2000). This result suggests that the benefits of high yolk androgen levels may depend on the phenotypic or genotypic quality of the

offspring. In line with this idea, the two sexes can have different optima for yolk androgen levels (Saino *et al.* submitted). Also, two different food supplementation studies have shown that food supplemented females do not increase yolk androgen levels, as it would be expected if this allocation would be limited by resources (Verboven *et al.* 2003; Gil *et al.* submitted). Taken together, all this evidence shows that yolk androgens as a maternal effect have a complex matrix of costs and benefits, and that the simple rule of “the more the better” cannot be applied in this case. In other words, it is not correct to consider yolk androgens as yet another egg resource, but rather as a phenotypic modifier subject to costs and benefits that show transgenerational differences among mother and offspring.

REFERENCES

- Burley N (1988) The differential-allocation hypothesis: an experimental test. *American Naturalist*, 132, 611-628
- Duffy DL, Ball GF (2002) Song predicts immunocompetence in male European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 269, 847-852
- Duffy DL, Bentley GE, Drazen DL, Ball GF (2000) Effects of testosterone on cell mediated and humoral immunity in non-breeding adult European starlings. *Behavioral Ecology*, 11, 654-662
- Eising CM, Eikenaar C, Schwabl H, Groothuis TGG (2001) Maternal androgens in black-headed gull (*Larus ridibundus*) eggs: consequences for chick development. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 268, 839-846
- Eising CM, Groothuis TGG (2003) Yolk androgens and begging behaviour in black-headed gull chicks: an experimental field study. *Animal Behaviour*, 66, 1027-1034
- Elf PK, Fivizzani AJ (2002) Changes in sex steroid levels in yolks of the Leghorn chicken, *Gallus domesticus*, during embryonic development. *Journal of Experimental Zoology*, 293, 594-600

-
- Folstad I, Karter AJ (1992) Parasites, bright males, and the immunocompetence handicap. *American Naturalist*, 139, 603-622
 - Gil D (2003) Golden eggs: maternal manipulation of offspring phenotype by egg androgen in birds. *Ardeola*, 50, 281-294
 - Gil D, Gasparini J, Gill VA, Hatch SA, Rocha M, Boulinier T, Puerta M (en revisión) Positive correlation between egg androgens and immunoglobulins in the black-legged kittiwake (*Rissa tridactyla*).
 - Gil D, Graves JA, Hazon N, Wells A (1999) Male attractiveness and differential testosterone investment in zebra finch eggs. *Science*, 286, 126-128
 - Gil D, Leboucher G, Lacroix A, Cue R, Kreutzer M (2004) Female canaries produce eggs with greater amounts of testosterone when exposed to preferred male song. *Hormones and Behavior*, 45, 64-70
 - Gil D, Ninni P, Lacroix A, de Lope F, Tirard C, Marzal A, Møller AP (2005). Yolk androgens in the barn swallow (*Hirundo rustica*): a test of some adaptive hypotheses. *Journal of Evolutionary Biology*
 - Griffiths R, Double MC, Orr K, Dawson RJG (1998). A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology*, 7, 1071-1075
 - Groothuis TGG, Eising CM, Dijkstra C, Müller W (2005). Balancing between costs and benefits of maternal hormone deposition in avian eggs. *Biology Letters*, 1, 78-81
 - Johnson AL (1999) Reproduction in the female. In: *Avian Physiology* (ed. Whittow GC), pp. 569-596. Academic Press, New York
 - Lipar JL, Ketterson ED (2000) Maternally derived yolk testosterone enhances the development of the hatching muscle in the red-winged blackbird *Agelaius phoeniceus*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 267, 2005-2010
 - Møller AP, Merino S, Brown CR, Robertson RJ (2001): Immune defence and host sociality: a comparative study of swallows and martins. *The American Naturalist* 158: 136 - 145
 - Møller AP, Garamszegi LZ, Gil D, Hurtrez-Bousses S, Eens M (2005) Correlated evolution of male and female testosterone profiles in birds and its consequences. *Behavioral Ecology and Sociobiology*
 - Mousseau TA, Fox CW (1998). *Maternal Effects as Adaptations*. Oxford University Press, New York.

-
- Ots I, Kerimov AB, Ivankina EV, Ilyina TA, Horak P (2001) Immune challenge affects basal metabolic activity in wintering great tits. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 268, 1175-1181
 - Pilz KM, Adkins-Regan E, Schwabl H (2005) No sex difference in yolk steroid concentrations of avian eggs at laying. *Biology Letters*
 - Pilz KM, Quiroga M, Schwabl H, Adkins-Regan E (2004) European starling chicks benefit from high yolk testosterone levels during a drought year. *Hormones and Behavior*, 46, 179-192
 - Pilz KM, Smith HG, Sandell MI, Schwabl H (2003) Interfemale variation in egg yolk androgen allocation in the European starling: do high-quality females invest more? *Animal Behaviour*, 65, 841-850
 - Saino N, Ferrari RP, Romano M, Martinelli R, Lacroix A, Gil D, Møller AP (enviado). Maternal allocation of androgens and antagonistic effects of yolk androgens on sons and daughters.,
 - Schwabl H (1993) Yolk is a source of maternal testosterone for developing birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 90, 11446-11450
 - Schwabl H (1996a) Environment modifies the testosterone levels of a female bird and its eggs. *Journal of Experimental Zoology*, 276, 157-163
 - Schwabl H (1996b) Maternal testosterone in the avian egg enhances postnatal growth. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 114A, 271-276
 - Schwabl H., Flinks H. & Gwinner E. (2005) Testosterone, reproductive stage, and territorial behavior of male and female European stonechats *Saxicola torquata*. *Hormones and Behavior*, 47, 503-512
 - Sheldon BC (2000) Differential allocation: tests, mechanisms and implications. *Trends in Ecology and Evolution*, 15, 397-402
 - Sockman KW, Schwabl H (2000) Yolk androgens reduce offspring survival. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 267, 1451-1456
 - Staub NL, de Beer M (1997) The role of androgens in female vertebrates. *General and Comparative Endocrinology*, 108, 1-24
 - Strasser R, Schwabl H (2004) Yolk testosterone organises behavior and male plumage coloration in house sparrows (*Passer domesticus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 56, 491-497

-
- Tanvez A, Béguin N, Chastel O, Lacroix A, Leboucher G (2004) Sexually attractive phrases increase yolk androgen deposition in canaries (*Serinus canaria*). *General and Comparative Endocrinology*, 138, 113-120
 - Verboven N, Monaghan P, Evans DM, Schwabl H, Evans N, Whitelaw C, Nager RG (2003) Maternal condition, yolk androgens and offspring performance: a supplemental feeding experiment in the lesser black-backed gull (*Larus fuscus*). *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 270, 2223-2232
 - Verhulst S, Dieleman SJ, Parmentier HK (1999) A tradeoff between immunocompetence and sexual ornamentation in domestic fowl. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 96, 4478-4481
 - Vigilant L (1999): An Evaluation of Techniques for the Extraction and Amplification of DNA from Naturally Shed Hairs. *Biol. Chem. Vol. 380*: 1329 – 1331.
 - Walsh PS, Metzger DA, Higuchi, R (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10, 506 – 513.

Chapter V

Parasitism as a sign of senescence: a
comparative test in hirundines

ECOLOGICAL INTERACTIONS AMONG PROTOZOAN
PARASITES AND THEIR AVIAN HOSTS: AN
APPROACH (2005)

In *“RECENT RESEARCH DEVELOPMENTS IN
MULTIDISCIPLINARY APPLIED MICROBIOLOGY”*

(accepted)

Abstract

Senescence is the progressive loss of functionality accompanied by fertility decreasing and increasing in risk of mortality as time goes by. Immune system deteriorates as ageing, so it could cause an ability reduction to fight against parasites and to prevent diseases. That is the reason why parasitism has been supposed to be involved in the expression of the senescence. Several studies have shown that immune function declines with age in humans and captive animals, but little is known about whether immune function deteriorates with age in natural populations due to the impossibility to study the same individual consecutive years.

In this study we made a comparative test for prevalence of malarial infection (*Trypanosoma* and *Haemoproteus*) between two avian species, capturing the same individual every year. We show that protozoan parasites are related to the expression of their hosts' senescence in three natural populations of two different avian species (*Delichon urbica* and *Hirundo rustica*), because immune system declines with age at the same time that prevalences and intensities of blood parasites infection increase as a consequence of this immune deterioration. The most prevalence of infection happens in three years old individual, and decreases in older birds. It could be because these older birds had no previous exposition to infection, or because they have a strong immune system to fight against parasites.

INTRODUCTION

Aging is a continuous and irreversible process of gradual changes as the time goes by. Usually aging is used as a synonym with senescence, but the Merck Manual of Geriatrics (2000) define aging as a “process of gradual and spontaneous change, resulting in maturation through childhood, puberty, and young adulthood and then decline through middle and late age” while defines senescence as a “the process by which the capacity for cell division, growth, and function is lost over time, ultimately leading to an incompatibility with life” (see Beers & Berkow 2000). Besides, both terms are normally used as synonyms, because senescence leads to aging, and is the main cause of aging, but not all effects of aging can be attributed to senescence. For instance, menopause is a part of aging, but due to its clear genetic origin (de Bruin *et al.* 2001) may be segregated from senescence (de Magalhães 2003, 2005)

But, which is the cause of aging? Many theories have been proposed for a long time, even though there is no definitive answer yet (see review in Barja 1998; table 1)

Table 1. Theories of aging and senescence (taken from Barja 1998)

-
1. ORGANIC THEORIES
 - Immunitary
 - Endocrinology
 2. CELULAR THEORIES
 - Maximum limit of cellular duplication
 3. MOLECULAR THEORIES
 - Residues accumulation
 - Cross-over between macromolecules
 - Somatic mutations
 - Catastrophic errors
 - Metabolic
 - Glucooxidation
 - Free radicals
 4. PROGRAMMED AGING THEORIES
 - Genetic program of aging
 5. EVOLUTIONARY THEORIES
 - Energy allocation between reproductive effort and self-maintenance
 - Preation risk intensity
 - Pleiotropic theories
-

According to Fisher's definition (1930), senescence reflects decrease in age-dependent residual reproductive value in species, usually given rise to a deteriorating phenotype and an increase in mortality with age. Therefore, age-related decline in physiological functions leads to an increasing in mortality rates (Finch 1990; Holmes & Austad 1995)

Ricklefs (2000) proposed two hypotheses to explain this decline in function associated with aging. First, physiological deterioration that goes with aging may increase the vulnerability of organisms to the same extrinsic factors of mortality that cause death in other ages (e.g. predation, infectious diseases and weather-related stress). On the other hand, senescence may reflect the increasing related to age of intrinsic causes of death (e.g. vascular disease, cancer, autoimmune disease and acquired genetic damage) that kill individuals irrespective of external environment. Therefore, extrinsic mortality is considered as the key factor that determines how natural selection moulds intrinsic mortality (Abrahams 2004)

Several animal species have prominently appear in senescence researches (Sprott & Austad 1996). Many of these studies have been centred on genetic basis of the aging and in a better comprehension of the ways to regulate rates of aging, creating a new framework to the studies of senescence-related diseases (Rogina *et al.* 2000; Reddy *et al.* 2004). Researches have identified animal genes that influences life span. Some of them modify senescence process in the whole, while other ones act shaping the expression of aging-related diseases (Guenette & Tanzi 1999; Eslamboli *et al.* 2005)

With few exceptions, birds species show remarkably higher longevities compared to their mammalian counterparts and live up to three times longer than mammals of equivalent body mass (Finch 1990; Holmes & Austad 1995). These slowing aging rates are paradoxical due to their high metabolic rates (2-2.5 times higher, with lifetime energy expenditure up to 15 times higher), blood sugar levels (two- to four-fold levels) and body temperatures (nearly 3°C higher) (Holmes *et al.* 2001). According to current biochemical theories of aging, elevation of these parameters in birds should prompt to fast tissue damage due to the accumulation of deleterious products from oxidative metabolism and Malliard reaction (Monnier *et al.* 1991; Kristal & Yu 1992; Holmes *et al.* 2001). However, some bird species show one of the higher life spans in the Animal Kingdom (Carey & Judge 2000). These long-lived species could be those who show slow aging patterns with delayed maturity and low annual fecundity, but recent studies suggest that birds have special adaptations for preventing

age-related tissue damage and capacity for neurogeneration in brain (Monnier *et al.* 1991; Kristal & Yu 1992; Holmes *et al.* 2001; Holmes & Ottinger 2003).

Despite these anti-aging mechanisms, birds do age, so studies on this group of vertebrates would be specially interesting. Moreover, since birds and other homoeothermic animals (including humans and primates) show gradual senescence with definite life span, the study of avian aging processes should become important because it might actually be more similar to ours in some respects than those of the short-lived rodents typically used to model basic of mammalian aging processes (Holmes & Ottinger 2003).

In human beings and laboratory animals it has been observed a decrease in immune function related to age (see Nagel *et al.* 1986; Miller 1990 for reviews), also in invertebrates (Adamo *et al.* 2001; Kurtz *et al.* 2002). The physiological mechanisms generating these effects have been documented. For instance, T-cell proliferation, generation of cytotoxic effectors, production of some interleukins by T-cells, T-cells activity and even antigen presentation may decline with age (Miller 1996; 2000). Furthermore, several studies in natural populations have shown a decrease in antibody production in older birds (Cichon *et al.* 2003, Saino *et al.* 2003).

Since T-cells are implicated in antimalarial defence (Wakelin 1996), this decline in immune function could lead to an ability reduction of fighting against parasites and preventing the expression of diseases. Hence, individuals might suffer higher parasitism intensities when growing old.

The effects of senescence related to parasitism would be particularly important in populations that suffer the most from attacks of virulent parasites, because this factor of extrinsic mortality might have influence on intrinsic mortality beyond senescence effects (see Abrahams 2004). So, the better study may be the examination of prevalence and intensity of parasitism in the same individuals along their life or, at least, several consecutive years.

To the best of our knowledge, so far only a single study have been able to study blood parasitism in the same individuals in two consecutive years (Bennet & Bishop 1990). Here we extend this study by comparing prevalence and intensities of blood parasitism in two members of swallow family, studying the evolution of parasitism and the immune system in the same individual throughout the years.

MATERIAL AND METHODS

The study took place in three different colonies of hirundines during breeding season at Badajoz, Southern Spain, as a part of a long-term project. First one was a *Delichon urbica* colony close to University Campus (RUCAB) (38°52'N, 7°05'W). The second one was a barn swallow *Hirundo rustica* colony situated in an open farmland (38°52'N, 6°50'W). We also studied house martins during 2004 and 2005 in a colony 10 kms. away from Badajoz (BOTOA) (38°53'N, 6°55'W).

From 1997 to date more than 5.000 martins and 1.000 swallows were captured at dawn in their nest and with mist nest. Because of high mortality of swallows family species (Bryant 1979, Turner 1994) and rates of migratory return (de Lope & da Silva 1988, Turner 1994), the final total number of samples of this study was 412 and 54 martins (RUCAB and BOTOA colonies), and 100 swallows, matched in 206, 27 and 50 pairs, respectively.

Birds were individually identified with numbered metal rings. A blood sample was taken in a capillary from the brachial vein and a blood smear was made to allow quantification of leukocytes and blood parasites. Blood samples were fixed in absolute methanol and stained with Giemsa. Half of each smear was examined under 200x magnification in search of large extra-erythrocytic Haematozoa (i.e. *Trypanosoma*), and in the other half of the smear 20 fields were scanned under 400x magnification for intra-erythrocytic Haematozoa (i.e. *Haemoproteus*). The intensity of extra-erythrocytic parasites was quantified as number of parasites per 100 fields, and number of parasites per 2,000 erythrocytes for intra-erythrocytic parasites under 1,000x magnification with oil immersion (Merino *et al.* 1997). Total leukocyte count was quantified as the number of leukocytes per 50 fields at 1,000x magnification (Naguib *et al.* 2004).

Statistical methods

We used non-parametric tests accordingly to determine if differences in prevalence (McNemar χ^2), intensity of infections and leukocyte counts (Wilcoxon matched paired test) between years were statistically significant (SPSS 12.0 for Windows).

RESULTS

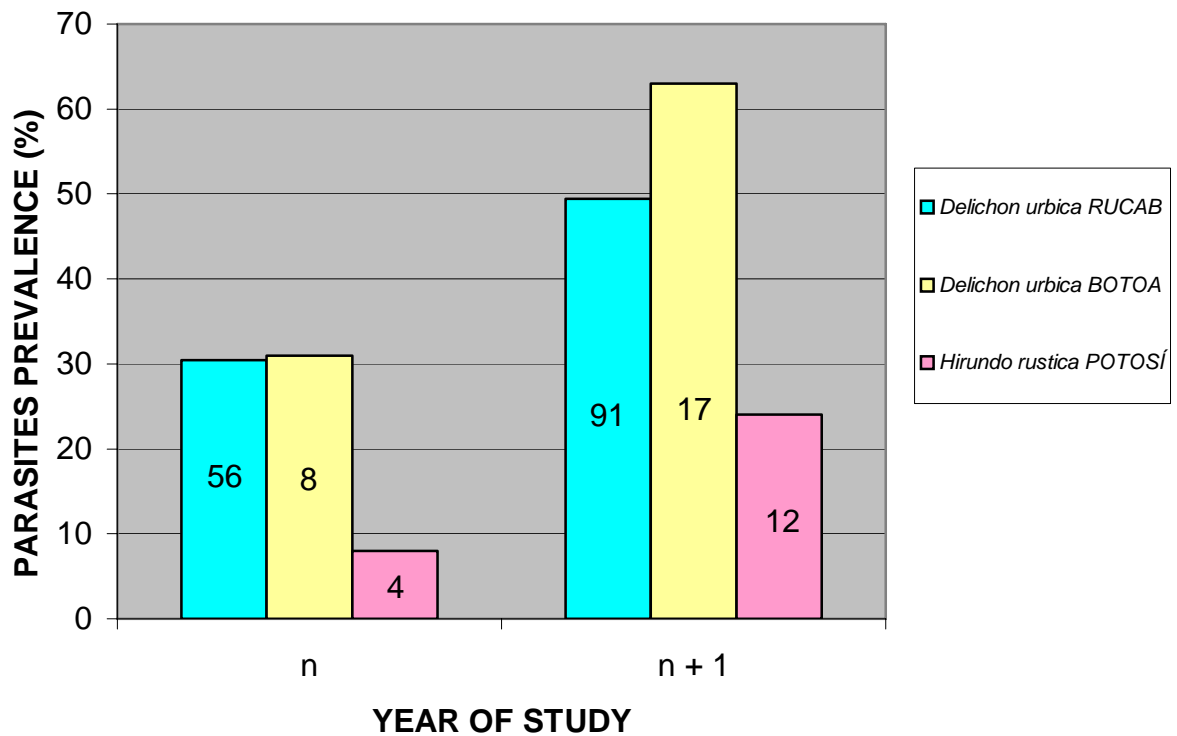
A total of 4 genders of parasites were found in the blood of the birds studied (table 2). *Haemoproteus* was the higher prevalence in martins, while *Trypanosoma* was in swallows. The other two parasites prevalence were lower than 2%, therefore they won't be included in subsequent analyses.

Table 2. Prevalence of infection (%) of different blood parasites genders in three studied populations of hirundines. Samples sizes of birds examined are shown

population	N	<i>Haemoproteus</i>		<i>Trypanosoma</i>		<i>Leucocytozoon</i>		Microfilaria	
		Infected	Prevalence	Infected	Prevalence	Infected	Prevalence	Infected	Prevalence
<i>Delichon urbica</i> RUCAB	1008	534	52.9	15	1.5	1	0.1	6	0.6
<i>Delichon urbica</i> BOTOA	40	21	52.5	0	0	0	0	0	0
<i>Hirundo rustica</i>	265	4	1.5	59	22.2	0	0	5	1.9

There were significant differences in both species in prevalence of blood parasites infections by studying the same group of individuals in two consecutive years (*Delichon urbica* RUCAB: X_i^2 Pearson=10.125, P = 0.001; *Delichon urbica* Botoa: X_i^2 Pearson= 6.033, P = 0.014; *Hirundo rustica*: X_i^2 Pearson = 4.000; P = 0.046) (Figure 1)

Figure 1. Prevalence of hemoparasites infection in three populations studied en two consecutives years. Number of infected birds on each year is included.



56 martins from RUCAB colony were infected first year of study, while there were twice infected birds the second year. 65 healthy individuals in the first year were infected the second one. In contrast, only 10 individuals looked like recovered from infection. 63 birds were uninfected neither of two years. In addition, 46 individuals were infected both years. The differences were significant (McNemar $\chi^2 = 14,08$; $p \leq 0,001$) (table 3)

Table 3. Prevalence of infection of adults in RUCAB house martin colony

<i>D. urbica</i> RUCAB	YEAR 2 INFECTED	YEAR 2 UNINFECTED	TOTAL
YEAR 1 INFECTED	46	10	56
YEAR 1 UNINFECTED	65	63	128
TOTAL	111	73	184

A similar pattern was observed in Botoa house martins colony (McNemar $\chi^2 = 7.11$; $P < 0,05$) (table 4) and swallows (McNemar $\chi^2 = 4,083$; $p < 0,05$) (table 5)

Table 4. Prevalence of infection of adults in BOTOA house martin colony

<i>D. urbica</i> BOTOA	YEAR 2 INFECTED	YEAR 2 UNINFECTED	TOTAL
YEAR 1 INFECTED	8	0	8
YEAR 1 UNINFECTED	10	9	19
TOTAL	18	9	27

Table 5. Prevalence of infection of barn swallows adults

<i>Hirundo rustica</i>	YEAR 2 INFECTED	YEAR 2 UNINFECTED	TOTAL
YEAR 1 INFECTED	2	2	4
YEAR 1 UNINFECTED	10	36	46
TOTAL	12	38	50

In order to go deeply into the study of parasitism and senescence, we divided RUCAB population in three different age-classes: one year old (table 6), minus or equal three years old (table 7), and older (table 8). The age of three years old is suitable to classify individuals according to their ages because previous studies have shown that this is the life span of house martins in our colony (de Lope, unpublished data). The prevalence of infection in recaptured individuals year after year was significantly different in all the categories [(nestling to 1 year old: McNemar $\chi^2 = 12.07$; $p \leq 0.001$), (age ≤ 3 years old: McNemar $\chi^2 = 27.841$; $p \leq 0.001$), (age > 3 years old: McNemar $\chi^2 = 10.452$; $p \leq 0.001$)]

Table 6. Prevalence of infection in 1-year-old house martins

<i>D. urbica</i> RUCAB	YEAR 2 INFECTED	YEAR 2 UNINFECTED	TOTAL
YEAR 1 INFECTED	0	0	0
YEAR 1 UNINFECTED	14	8	22
TOTAL	14	8	22

Table 7. Prevalence of infection in house martins aged between one and three years old

<i>D. urbica</i> RUCAB	YEAR 2 INFECTED	YEAR 2 UNINFECTED	TOTAL
YEAR 1 INFECTED	25	4	29
YEAR 1 UNINFECTED	40	37	77
TOTAL	65	41	106

Table 8. Prevalence of infection in house martins older than 3 years old

<i>D. urbica</i> RUCAB	YEAR 2 INFECTED	YEAR 2 UNINFECTED	TOTAL
YEAR 1 INFECTED	21	6	27
YEAR 1 UNINFECTED	25	26	51
TOTAL	46	32	78

The differences in intensity of infection in house martins were significantly in both populations (RUCAB: Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test, $z = 2.190$, $P = 0.029$; BOTOA: Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test, $z = 2.268$, $P = 0.023$)

The number of leukocytes significantly declined with age in the same individual in both species (*Delichon urbica*: Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test, $z = -3.415$, $P = 0.009$; *Hirundo rustica*: Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test, $z = -2.613$, $P = 0.009$)

Between 1999 and 2005 it was made a study on prevalence of blood parasites infection in exact known age House martins (RUCAB) (figure 2) and Barn swallows (figure 3). To avoid pseudoreplication, none individual was included in two different categories. Birds used in other experiments were also excluded.

Figure 2. Prevalence of *Haemoproteus* infection in exact known age House martins. Sample sizes are shown.

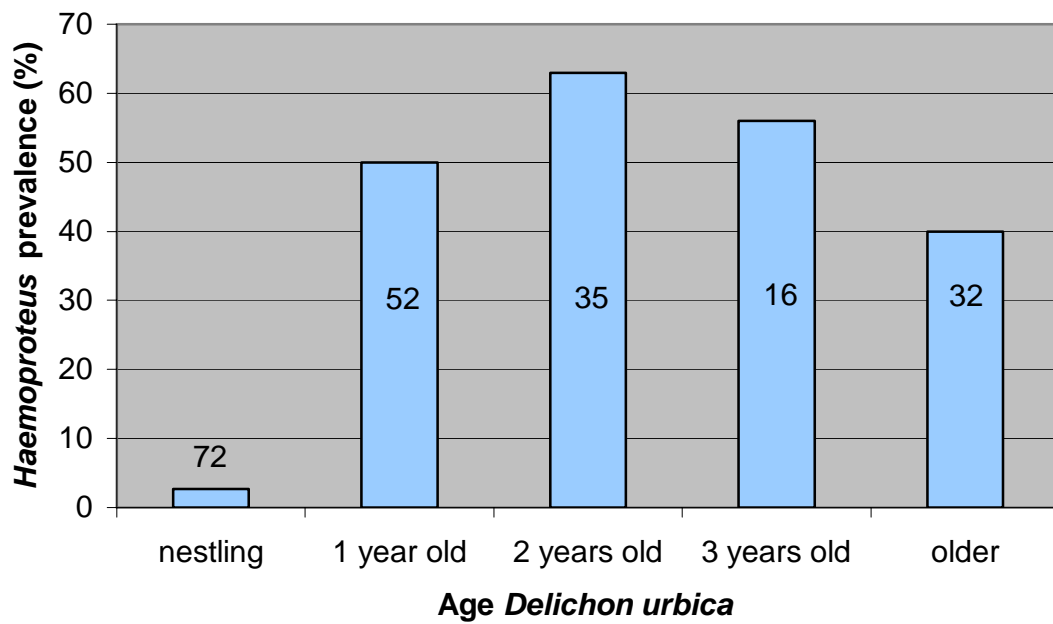
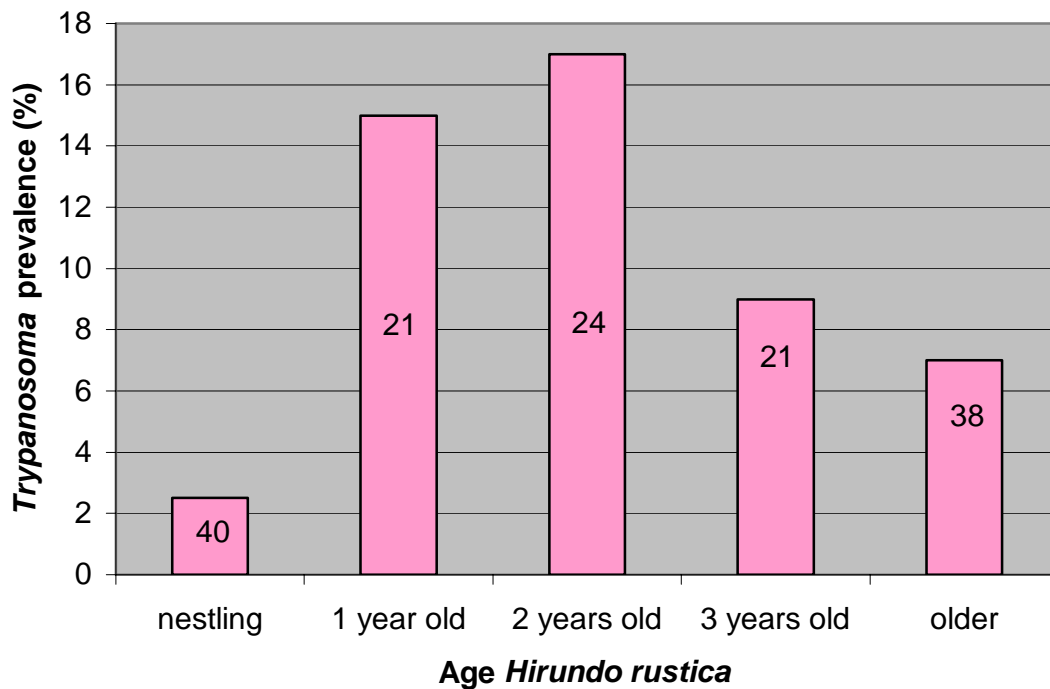


Figure 3. Prevalence of *Trypanosoma* infection in exact known age Barn swallows. Sample sizes are shown



DISCUSIÓN

The main findings of this study were that (1) immune system deteriorates with age in natural populations of hirundines, as drop in circulating leukocytes shows; (2) this immunitary decline clashes with increasing in prevalence and intensities of blood parasites when individuals grow old; and (3) the most prevalence of hemoparasites happens in 3-years-old house martins and barn swallows, being lower in older individuals. We will briefly discuss each of these main findings.

From 1997 more than 5.000 house martins and 1.000 barn swallows were captured, but only we could recapture 283 useful for the study, probably due to high mortality of these species (Lack 1949; Bryant 1979), estimating that 88% of individuals die during their first year of life (Rheinwald 1975; Rheinwald *et al.* 1976). In a previous study in Botoa colony rates of natal returns were estimated, varying between 6.1% in the second calendar year and 0.5% in the fourth calendar year. In addition, breeding return rates decrease from 27.3% second calendar year to 0.6% in the sixth calendar year (de Lope & da Silva 1998). Therefore, there is the intrinsic difficulty doing this kind of study. In fact, to the best of our knowledge, there are very few studies under natural conditions that were able to capture the same individual year after year (Bennett & Bishop 1990; but see also Allander & Bennett 1994).

All blood samples were collected during breeding season, between March and June, because higher prevalence of blood parasites is found at this time (Allander & Bennett 1994), although infections could last to the end of autumn in lower intensities (Allander & Sundberg 1997). Also, most of parasites transmission in temperate climates happens during host breeding season, when many hosts suffer from spring relapses in their chronic infections and the most parasites are, as a clear adaptation in host-parasite co evolution (Atkinson & van Ripper 1991). Because of some house martins nestlings were infected, we are certain that *Haemoproteus* infection occurred in the breeding area. This is also attributable to *Trypanosoma* infection, because in a previous study some nestlings infected were found (Merino *et al.* 1998).

Four different blood parasites genders were found in the blood smears. *Haemoproteus* was the most common parasites in both house martins populations, with prevalences of infections higher than 50%, just like other birds suffer (Allander & Bennett 1994; Sundberg 1995; Dawson & Bortolotti 2000). All *Haemoproteus*

infections were mixed with other blood parasites infectious, as other many studies (Allander & Bennett 1994; Merilä *et al.* 1995; Dawson & Bortolotti 1999).

Trypanosoma was the most common parasite found in adults Barn swallows, with prevalences nearly to 22%, similar to other *Trypanosoma* infections found in several passerines (Merino & Potti 1995; Merino *et al.* 1997; Scheuerlein & Ricklefs 2004). As previously quoted, due to lower prevalence of two other parasites genders, they won't be included in subsequent analyses, as other studies did (Merino *et al.* 2000)

Variations on prevalence infections could be due to both host intrinsic factors (genotypic resistance, behavioural mechanisms or health condition) and extrinsic factors (different vector exposition), sex (McCurdy *et al.* 1988) or age (Weatherhead & Bennett 1992). Prevalence of infection in house martins are higher than in barn swallows. Perhaps these differences could reflect a balance between exposition and infection resistance (van Riper *et al.* 1994; Atkinson & van Riper 1991; Holmstad & Skorpning 1998; Wiehn *et al.* 1999), because *Trypanosoma* infection is transmitted by simuliids vectors, more often in northern environments (Scheuerlein & Ricklefs 2004)

Some studies show prevalence of infections in one or more populations, even though prevalence is by itself a poor indicator of parasites effects on their hosts (May 1984; Anderson 1986; Kirkpatrick 1991), although changes in prevalence could give to us a very valuable information (Kitron & Higashi 1985; Kirkpatrick 1991). It's clear that the very best research is the one who show changes in prevalence and intensity of infection in the same individual year after year. To date, we don't have evidence of any other study able to do in birds natural populations for so many years.

Here we present a comparative test of prevalence and intensity of malaria parasites, recapturing the same individual along the time in three different natural populations of two species of the swallow's family. According to the sense of our predictions, the immune system declines with age, and it causes an increasing in prevalence and intensity of infection in both species.

Parasitism and genetic-base diseases have been implicated on the expression of the senescence for a long time (Medawar 1952; Williams 1957), because immune system is consider deteriorating with age (Miller 1996). Our results are consistent with these hypothesis. In addition, intensity of ectoparasites also increase with age (Møller & de Lope 1999), maybe as a consequence of host ability reduction with age to defend against parasites.

Contagion risk increases with age, maybe due to higher vector exposition (Weatherhead & Bennett 1991; Allander & Bennett 1994). Moreover, many birds retain infections for years (Bennett & Bishop 1990), so birds infected one year will be also infected the next one, besides new infected birds. This is agree with our results, where the most birds retain infection, and only very few looked like recovered. Also, It's only natural that the longer an animal lives, the more environmental risk suffers, including hemoparasites infections.

Another point that reaffirms our hypothesis is because of hemoparasites infections spring relapses, probably arisen by reproduction hormones (Atkinson & van Riper 1991). So we could expect higher prevalences and intensities during breeding season (Allander & Sundberg 1997). Relapse of sexual hormones at the beginning of the breeding season might cause an immune suppression and chronic infections relapses (Zuk 1991; Folstad & Karter 1992). In fact, it has shown in birds that a great breeding effort could increase intensities of parasites, both in natural populations (Korpimäki *et al.* 1993; Allander & Bennett 1995; Dufva 1996; Oppliger *et al.* 1997; Ilmonen *et al.* 1999) and in experimentally manipulated clutch sizes (Norris *et al.* 1994; Richner *et al.* 1995; Ots & Hôrak 1996; Allander 1997; Siikamäki *et al.* 1997; Wiehn & Korpimäki 1998; Wiehn *et al.* 1999). So, the longer an animal lives, the more reproduction events it has, and the more immunosuppression it suffers

In the same way, migration related stress might also provoke an infections relapse (Valkiunas 1991). What's more, migrant birds suffer most from protozoan parasites than residents (Bennett & Fallis 1960; Dogiel 1964; Greiner 1975; Figuerola & Green 2000), specially trans-saharian migrants (Peirce & Mead 1978), as swallows do. Møller & Erritzoe (1988) showed that migrant birds have immune system organs bigger than sedentaries. Hence, we must assume than probability of become infected, or to increase a chronic infection, grows as growing old. And it may get worse with migrations.

By compare prevalence of infection in known age individuals in both species, it's shown that older ones stand lower prevalence. We suggest two alternative explanations for this result. First, it might be that older individuals are those who had no previous infection exposition. Second, individuals that reach this age should have a very good immune system to reduce or even avoid infection effects (Weatherhead & Bennett 1991; Allander & Bennett 1994; Wakelin 1996; Ots & Horak 1998), and also, perhaps infected birds are not alive. In this context, several studies have shown that high

intensities of hematozoan infection could lead to a continuous body deterioration, or even death (Olsen & Gaunt 1985; Hawkey & Samour 1988; Atkinson & van Riper 1991; Bennett *et al.* 1993; Butterworth & Harcourt-Brown 1996; Evans & Otter 1998; Chen *et al.* 2001)

Concluding, and according to our results, we confirm that immune system declines with age in natural populations of birds, at the same time that prevalences and intensities of blood parasites infection increasing as a consequence of this immune deterioration. Hence, we show that parasites could play an important role in the expression of their host's senescence. Therefore, forthcoming studies on effects of parasites over their host populations must take into account the age of the analysed individuals.

REFERENCES

- Abrahams PA (2004) Evolutionary biology: Mortality and lifespan. *Nature* 431: 1048
- Adamo SA, Jensen M, Younger M (2001) Changes in lifetime immunocompetence in male and female *Gryllus texensis* (formerly *G. integer*): trade-offs between immunity and reproduction. *Animal Behavior* 62: 417–425
- Allander K (1997) Reproductive investment and parasite susceptibility in the great tit. *Functional Ecology* 11: 358-364
- Allander K, Bennett GF (1994) Prevalence and intensity of hematozoan infections in a population of Great Tits *Parus major* from Gotland, Sweden. *Journal of Avian Biology* 25: 69-74
- Allander K, Sundberg J (1997) Temporal variation and reliability of blood parasite levels in captive Yellowhammer males *Emberiza citrinella*. *Journal of Avian Biology* 28: 325-330
- Anderson RM (1986) The population dynamics and epidemiology of intestinal nematode infections. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 80: 686 – 690
- Apanius V (1991) Blood parasitism, immunity and reproduction in American kestrels (*Falco sparverius*). En *Biology and Conservation of Smalls Falcons* by MK Nicholls and R Clarke (eds). Proc. 1991 Hawk and Owl Trust Conference

-
- Atkinson C, van Riper III C (1991) Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon* and *Haemoproteus*. En *Bird-Parasite interactions* (Loyle & Zuk eds.) Oxford University Press. Oxford pp. 19-48
 - Baker RR (1978) The evolutionary ecology of animal migrations. Hodder & Stoughton, London.
 - Beers MH, Berkow R (eds.) (2000). The Merck manual of geriatrics (3rd ed.). Whitehouse Station, NJ. Merck Research Laboratories.
 - Bennett GF, Fallis AM (1960) Blood parasites of birds in Algoquin Park, Canada, and a discussion of their transmission. *Can. J. Zool.* 38: 261 - 273
 - Bennett GF (1970). Simple techniques for making avian blood smears. *Canadian Journal of Zoology.* 48: 585-586
 - Bennett GF, Bishop MA (1990) Change in status of haematozoan infections in wild passeriform sampled in successive years. *Proc. Zool. Soc. (Calcutta)* 43: 9-18
 - Bennett GF, Peirce MA, Ashford RW (1993). Avian Haematozoa: mortality and pathogenicity. *J. Nat. Hist. Lond.* 26: 993-1001.
 - Bennett GF, Peirce MA, Earlé RA (1994). An annotated checklist of the valid avian species of *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* (Apicomplexa: Haemosporida) and *Hepatozoon* (Apicomplexa: Haemogregarinidae). *Systematic Parasitology* 29: 61-73
 - Bennett GF, Squires-Parsons D, Siikamäki P, Huhta E, Allander K, Hillström L (1995) A comparison of blood parasites of three Scandinavian populations of the pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*). *Journal of Avian Biology* 26: 33-38
 - Bernis F (1966) Migración en aves. Tratado teórico y práctico. S.E.O. Madrid.
 - de Bruin JP, Bovenhuis H, van Noord PAH, Pearson PL, van Arendonk JAM, Velde ER, Kuurman WW and Dorland M (2001) The role of genetic factors in age at natural menopause. *Human Reproduction* 16: 2014-2018
 - Bryant DM (1979). Reproductive cost in the house martin *Delichon urbica*. *Journal of Animal Ecology* 52: 905-925
 - Butterworth G, Harcourt- Brown NH (1996): Neonate husbandry and related diseases. En *BSAVA Manual of raptors, pigeons and waterfowl*, PH Benyon, NA Forbes and NH Harcourt-Brown (eds). BSAVA, Cheltenham

-
- Carey JR, Judge DS (2000). Longevity Records: Life Spans of Mammals, Birds, Amphibians, Reptiles, and Fish. Odense Monographs on Population Aging. Odense University Press, Odense, Dinamarca
 - Chen M, Shi L, Sullivan DJr (2001): *Haemoproteus* and *Schistosoma* synthesize heme polymers similar to *Plasmodium* hemozoin and β - hematin. Molecular & Biochemical Parasitology 113: 1-8
 - Chung TC (1976) General parasitology. Academic Press, New York
 - Cichon M, Sendecka J, Gustafsson L (2003). Age-related decline in humoral immune function in Collared Flycatchers. Journal of Evolutionary Biology 16: 1205-1210
 - Coatney GR (1933) Relapse and associated phenomena in the *Haemoproteus* infection of the pigeon. American Journal of Hygiene 18: 133-160
 - Davidar P, Morton ES (1993) Living with parasites: prevalence of a blood parasite and its effect on survivorship in the Purple Martin. The Auk 110(1): 109-116
 - Dawson RD, Bortolotti GR (1999) Prevalence and intensity of hematozoan infections in a population of American kestrels. Canadian Journal of Zoology 77: 162-170
 - Desser SS, Bennett GF (1993) The genera *Leucocytozoon*, *Haemoproteus*, and *Hepatocystis*. En *Parasitic Protozoa, Vol. 4, Chpt. 5.* (ed. JP Kreier). Academic Press. pp. 273-307
 - Dogiel (1964) General Parasitology. Oliver and Boyd. Edinburgh
 - Dufva R (1996) Blood parasitism, health, reproductive success, and egg volume in female great tits *Parus major*. Journal of Avian Biology 27: 83-87.
 - Eslamboli A, Georgievska B, Ridley RM, Baker HF, Muzyczka N, Burger C, Mandel RJ, Annett L, Kirik D (2005). Optimizing GDNF gene therapy in Parkinsonian monkeys. The Journal of Neuroscience 25: 769-777
 - Evans M, Otter A (1998) Fatal combined *Haemoproteus noctuae* and *Leucocytozoon ziemanni* infection in juvenile snowy owls (*Nyctea scandiaca*); a case report. Vet Rec 143 (3): 72-76
 - Fedynich AM, Pence DB, Godfrey RD (1995). Hematozoa in thin blood smears. Journal of Wildlife Diseases, 31 (3): 436-438
 - Figuerola J, Green AJ (2000): Hematozoan parasites and migratory behaviour in waterfowl. Evolutionary Ecology 14: 143 - 153

-
- Finch CE (1990). Longevity, Senescence and the Genome. University of Chicago Press, Chicago
 - Fisher RA (1930). The Genetical Theory of Natural Selection. Clarendon Press, Oxford
 - Folstad I, Karter AJ (1992) Parasites, bright males and the immunocompetence handicap. *American Naturalist* 139: 603-622.
 - Gauthreaux SA (1982) Site fidelity and Nomadism. En *Avian Biology Vol. VI* (D.Farner eds.), pp 144-146. Academic Press, New York
 - Gibson RM (1990) Relations between blood parasites, mating success and phenotypic cues in male sage grouse *Centrocercus urophasianus*. *Amer. Zool.* 30: 271-280.
 - Godfrey RD, Fedynich AM, Pence DB (1987). Quantification of hematozoa in blood smears. *Journal of Wildlife Diseases*, 23 (4): 558-565
 - Greiner EC (1975) Prevalence and potential vectors of *Haemoproteus* in Nebraska morning doves. *J. Wild. Dis* 11: 151 - 157
 - Guenette SY, Tanzi RE (1999). Progress toward valid transgenic mouse models for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 20: 201-11
 - Hawkey CM, Samour HJ (1988): The value of clinical haematology in birds. En *Exotic Animals*, ER Jacobsen and GV Kollias (eds) Churchill Livingstone. New York
 - Holmes DJ, Austad SN (1995). The evolution of avian senescence patterns: implications for understanding primary aging processes. *Amer. Zool.* 35: 307-317
 - Holmes DJ, Fluckinger R, Austad SN (2001) Comparative biology of aging in birds: an update. *Exp Gerontol* 36: 869-83.
 - Holmes DJ, Ottinger MA (2003) Birds as long-lived animal models for the study of aging. *Experimental Gerontology* 38:1365-1375
 - Holmstad PR, Skorping A (1988) Covariation of parasites intensities in willow ptarmigan *Lagopus lagopus*. *Canadian Journal of Zoology* 76: 1581-1588
 - Imonen P, Hakkarainen H, Koivunen V, Korpimäki E, Mullie A, Shutler D (1999) Parental effort and blood parasitism in Tengmalm's owl: effects of natural and experimental variation in food abundance. *Oikos* 86: 79-86

-
- Kirkpatrick CE, Robinson S, Kirton UD (1991) Phenotypic correlates of blood parasitism in the common grackle. En *Bird-Parasite interactions* (Loyle & Zuk eds.) Oxford University Press. Oxford pp. 344-358
 - Kitron, U.D. & Higashi, G.I. (1985): Schistosoma haematobium in Upper Egypt; analysis of dispersión patterns. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 34: 331 – 340
 - Korpimäki E, Hakkarainen H, Bennett GF (1993) Blood parasites and reproductive success of Tengmalm's owl: detrimental effects on females but not on males? *Funct. Ecol.* 7: 420-423
 - Korpimäki E, Tolonen P, Bennett GF (1995) Blood parasites, sexual selection and reproductive success of European kestrels. *Ecoscience* 2: 335-343
 - Kristal BS, Yu BP (1992) An emerging hypothesis synergistic inductions of aging of free radicals and Maillard reaction. *J. Gerontol. Biol. Sci* 47: B107-B114
 - Kurtz J, Van der Veen IT, Ryder JJ (2002). Ecological immunity of arthropods – a thread of Ariadne? *TREE* 17: 204–205.
 - Lack D (1949) Vital statistics from ringed swallows. *Brit. Birds* 42: 147 - 150
 - Lin S, Ford E, Haigis M, Liszt G, Guarente L (2004). Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH. *Genes & Development* 18:12–16
 - de Lope, F (1983) La reproducción d'*Hirundo rustica* en Extremadura (España). *Alauda* 51: 89-91.
 - de Lope F, da Silva E. (1988). La fidelidad al lugar de nidificación o de nacimiento en el avión común (*Delichon urbica urbica* L.) en Badajoz, España. *Ardeola*, 35 (1): 51-58
 - de Lope F, Møller AP (1993). Female reproductive effort depends on the degree of ornamentation of their mates. *Evolution* 47: 1152-1160
 - de Magalhães JP (2003). Winning the war against aging. *The Futurist*, 37(2): 48-50.
 - de Magalhães JP (2005). Open-minded scepticism: inferring the causal mechanisms of human ageing from genetic perturbations. *Ageing Research Reviews* 4: 1-22.
 - Markus MB (1972) Pathogenicity of *Haemoproteus columbae*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 66: 186-187.

-
- Marzal A (2001) Prevalencia e intensidad de parásitos hematozoos en el avión común (*Delichon urbica* Linneo 1758). Tesis de Licenciatura. Universidad de Extremadura
 - May RM (1984) Ecology and population Biology. En *Tropical and geographical medicine* (ed. KS Warren and AAF Mahmoud), pp. 152 – 166. McGraw – Hill, New York
 - McCurdy DG, Shutler D, Mullie A, Forbes MR (1988) Sex-biased parasitism of avian hosts: relations to blood parasite taxon and mating system. *Oikos* 82: 303-312
 - Medawar PB (1952). *An Unsolved Problem in Biology*. H. K. Lewis, London
 - Merilä J, Björklund M, Bennett GF (1995) Geographic and individual variation in hematozoan infections in the greenfinch, *Carduelis chloris*. *Can. J. Zool.* 73: 1798-1804
 - Merino S, Potti J (1995). High prevalence of hematozoa in nestlings of a passerine species, the pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*). *Auk* 112: 1041-1043
 - Merino S, Potti J, Fargallo JA (1997) Blood parasites of some passerine birds from Central Spain. *Journal of Wildlife Diseases* 33: 638-641
 - Merino S, Martínez J, Barbosa A, Møller AP, de Lope F, Pérez J, Rodríguez-Caabeiro F (1998). Increase in a heat shock protein from blood cells in response to parasitism of nestling house martins (*Delichon urbica*): An experimental approach. *Oecologia* 116: 343-347
 - Merino S (1999). Obtención de muestras sanguíneas para el estudio de las interacciones hospedador-parásito. *Etología* 17: 21-30
 - Merino S, Moreno J, Sanz JJ, Arriero E (2000) Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). *Proc. R. Soc. Lond. B* 267: 2507-2510
 - Miller RA (1996). The aging immune system. Primer and prospectus. *Science* 273: 70-74
 - Miller RA (1990). Aging and the immune response. En *Handbook of the Biology of Ageing* (E. L. Schneider & J. W. Rowe, eds). Academic Press, New York
 - Møller AP, Erritzoe J (1998) Host immune defence and migration un birds. *Evolutionary Ecology* 12: 945 – 953

-
- Møller AP, de Lope F (1999) Senescence in a short-lived migratory bird: age-dependent morphology, migration, reproduction and parasitism. *Journal of Animal Ecology* 68: 163-171
 - Monnier VM, Sell DR, Ramanakoppa HN, Miyata S (1991) Mechanisms of protection against damage mediated by the Maillard reaction in aging. *Gerontology* 37: 152-165
 - Nagel JE, Yanagihara RH, Adler WH (1986). Cells of the immune response. En *Handbook of the Cell Biology of Ageing* (V. J. Cristofalo, ed.). CRC Press, Boca Raton, FL, USA
 - Norris K, Anwar M, Read AR (1994) Reproductive effort influences the prevalence of hematozoan parasites in great tits. *Journal of Animal Ecology* 63: 601-610
 - Olsen OW (1974) *Animal parasites*. University Park Press, Baltimore.
 - Olsen GH, Gaunt SD (1985) Effects of haemoprotozoal infections on rehabilitation of wild raptors. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 187: 1204 - 1205
 - Oppliger A, Christe P, Richner H (1997) Clutch size and malarial parasites in female great tits. *Behavioural Ecology* 8: 148-152
 - Ots I, Hôrak P (1996) Great tits *Parus major* trade health for reproduction. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 263: 1443-1447
 - Ots I, Hôrak P (1998) Health impact of blood parasites in breeding great tits. *Oecologia* 116: 441- 448
 - Peirce MA, Mead CJ (1978) Hematozoa of British birds III. Spring incidence of blood parasites of birds from Hertfordshire, especially returning migrants. *J Nat Hist* 12: 337 - 340
 - Plowden J, Renshaw-Hoelscher M, Engleman C, Katz J, Sambhara S (2004). Innate immunity in aging: impact on macrophage function. *Aging Cell* 4: 161-167
 - Reddy PH, McWeeney S, Park BS, Manczak M, Gutala RV, Partovi D, Jung Y, Yau V, Searles R, Mori M, Quinn J (2004). Gene expression profiles of transcripts in amyloid precursor protein transgenic mice: up-regulation of mitochondrial metabolism and apoptotic genes is an early cellular change in Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics* 13: 1225-1240.
 - Rheinwald G (1975) The pattern of settling distances in a population of House martins *Delichon urbica*. *Ardea* 53: 136 – 145

-
- Rheinwald G, Gutscher H, Hormeyer K (1976) Einfluss des Alters der Mehlschwalbe (*Delichon urbica*) auf ihre Brut. Vogelwarte 28: 190 – 206
 - Richner H, Christe P, Oppliger A (1995) Parental investment affects prevalence of malaria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 1192-1194
 - Ricklefs RE (2000) Intrinsic aging-related mortality in birds. Journal of Avian Biology 31: 103-111
 - van Riper III C, van Riper SG, Goff ML, Laird M (1986) The epidemiology and ecological significance of malaria in Hawaiian land birds. Ecological Monograph 56: 327-344
 - van Riper III C, Atkinson CT, Seed TM (1994). Avian Malaria. En. *Parasitic Protozoa Vol. 7*, 2nd Edition. JP Krier & JR Baker (eds.). pp. 71-138. Academic Press, New York
 - Rogina B, Reenan RA, Nilsen SP, Helfand SL (2000). Extended life-span conferred by cotransporter gene mutations in drosophila. Science 2000 290: 2137-2140.
 - Saino N, Ferrari RP, Romano M, Rubolini D, Møller AP (2003). Humoral immune response in relation to senescence, sex and sexual ornamentation in the barn swallow (*Hirundo rustica*). J Evol Biol 16: 1127-1134
 - Sanz JJ, Arriero E, Moreno J, Merino S (2001) Interactions between hemoparasite status and female age in the primary reproductive output of pied flycatchers. Oecologia 126: 339-344
 - Scheuerlein A, Ricklefs RE (2004) Prevalence of blood parasites in European passeriform birds. Proc. R. Soc. Lond. B. 271: 1363-1370
 - Seutin G (1994) Plumage redness in redpoll finches does not reflect hemoparasitic infection. Oikos 70: 280-286
 - Siikamäki P, Rätti O, Hovi M, Bennett GF (1997): Association between haematozoan infections and reproduction in the pied flycatcher. Functional Ecology 11: 176-183
 - Sol D, Jovani R, Torres J (2000) Geographical variation in blood parasites in feral pigeons: the role of vectors. Ecogeography 23: 307-314
 - Sorci G, Møller AP (1997) Comparative evidence for a positive correlation between haematozoan prevalence and mortality in waterfowl. Journal of Evolutionary Biology 10: 731-741.

-
- Sprott RL, Austad S (1996). Animal models for aging research. En Schneider EL, Rowe JW, editors. *Handbook of the Biology of Aging*. 4th ed. Academic Press, Orlando
 - Sundberg J (1995) Parasites, plumage coloration and reproductive success in the yellowhammer, *Emberiza citrinella*. *Oikos* 74: 331-339
 - Svensson L (1992). Identification guide to European passerines. Fingraf, Sweden
 - Turner AK (1994) *The Swallow*. Hamlyn Species Guides. Hamlyn Limited, London.
 - Valkiunas (1991) The role of seasonal migration in the distribution of Haemosporidia of birds in North Palearctic. *Ekologija* 1993: 57 – 73.
 - Wakelin D (1996). Immunity to parasites: How parasitic infections are controlled. Cambridge University Press, Cambridge
 - Weatherhead PJ, Bennett GF (1991) Ecology of Red-winged Blackbird parasitism by haematozoa. *Canadian Journal of Zoology* 69: 2352-2359
 - Weatherhead, P.J. & Bennett, G.F. (1992): Ecology of parasitism of brown-headed cowbirds by haematozoa. *Canadian Journal of Zoology* 70: 1-7
 - White GC (2000) Programa “Mark and Recapture Survival Rate Estimation” versión 1.9
 - Wiehn J, Korpimäki E (1998) Resource levels, reproduction and resistance to haematozoan infections. *Proc. R. Soc. Lond. B* 265: 1197-1201
 - Wiehn J, Korpimäki E, Pen I (1999) Haematozoan infections in the Eurasian kestrel: effects of fluctuating food supply and experimental manipulation of paternal effort. *Oikos* 84: 87-98
 - Williams GC (1957). Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. *Evolution* 11: 398-411
 - Yamada KA, Sherman IW (1979) *Plasmodium lophurae*: composition and properties of hemozoin, the malarial pigment. *Experimental Parasitology* 48: 61-74
 - Zuk M (1991) Reproductive strategies and disease susceptibility: an evolutionary viewpoint. *Parasitology Today* 6: 231-233

Conclusions

According to proposed objectives in Chapter I, and in accordance with results, conclusions of this PhD thesis are:

1. Los parásitos maláricos pueden tener efectos dramáticos sobre las variables demográficas de sus hospedadores, como demuestra el hecho del incremento significativo del tamaño de puesta, éxito de eclosión y éxito reproductor tras la reducción experimental de la prevalencia e intensidad de parasitismo. De hecho, existen efectos considerables de los parásitos sanguíneos en el tamaño de las poblaciones de sus hospedadores, pudiendo afectar a la contribución relativa de las diferentes poblaciones y al total del tamaño poblacional debido a diferencias en productividad de distintas poblaciones causadas por el impacto de los parásitos.

Malarial parasites can have dramatic effects on their hosts' demographic variables, as demonstrate the significative increase in clutch size, hatching success and reproductive success when the infection was experimentally reduced. Therefore, there are considerable effects of blood parasitism on the size of the post-breeding population of hosts, and this may affect the relative contribution of different populations to the overall population size of hosts across their range due to differences in population productivity

2. La reducción experimental del parasitismo no tuvo ningún efecto en la condición corporal de los volantones, probablemente debido a un cese del efecto del tratamiento experimental anti-malárico con el tiempo o a un ajuste del esfuerzo parental al tamaño de cría.

Experimental infection reduction has no effect on phenotypic quality of the nestlings, probably due to a drop of treatment effects on infection status, or an adjustment of parental effort to brood size

3. La producción de una respuesta inmune es costosa en términos de estrategias vitales, como demuestra el descenso en el éxito reproductor de las hembras a las que se les indujo experimentalmente una respuesta inmune

There is a life history cost of producing an immune response, as demonstrate the decrease of reproductive success in immune challenged adult females

4. Los costes de la respuesta inmune se concretaron en nuestro estudio en un retraso en el comienzo de la reproducción, una reducción en el éxito reproductor y un aumento de la infestación por parásitos. Estos costes podrían ser especialmente significativos y acusados en las estrategias vitales de poblaciones de aves que sufren un fuerte impacto de los parásitos en su éxito reproductor, como es el caso del Avión Común.

The life history costs of immunity in our study were that a challenge of the immune system of adult females caused a significant delay in start of reproduction, a reduction in overall reproductive success, and an increase in the abundance parasites. These costs of immunity could be especially significant in a colonial passerine bird with strong impact of parasites on reproductive success, like House martin

5. No encontramos efectos provocados por la inducción experimental de una respuesta inmune sobre la calidad fenotípica de los descendientes, lo que nos sugiere que los costes de la inmunidad fueron pagados directamente por las hembras.

We did not find any effects of experimental treatment on phenotypic quality of nestlings, suggesting that the costs of immunity were paid directly by reproducing females

6. La distribución de andrógenos en las yemas de los huevos es muy costosa y constituye una inversión dependiente de la condición corporal, como demuestra la menor concentración de andrógenos en las puestas de reposición de las

hembras a las que se les indujo experimentalmente una respuesta inmune en referencia a las hembras del grupo control

Yolk androgen allocation is costly and that is constitutes a condition-dependent investment, as shown the less androgen concentrated reposition clutch from experimentally immune-challenged females than control females

7. Con relación a la anterior conclusión, las hembras que realizaron una puesta de reposición tuvieron niveles de testosterona en las yemas de las primeras puestas significativamente mayores que aquellas hembras que no pudieron realizar puestas de reposición. Esta evidencia reafirma nuestra idea de la dependencia de la condición corporal de la deposición de andrógenos en la yema.

Related to previous conclusion, females who were able to lay a reposition clutch also had higher testosterone levels in first clutches than those were not able to lay a reposition clutch. This evidence support our idea that yolk androgen deposition was a condition dependent trait

8. No hubo diferencias en la concentración de andrógenos en la yema dependiendo del sexo del embrión

There were no differences in yolk androgen concentration between sexes

9. La concentración de andrógenos en la yema se incrementó con el orden de puesta, de forma similar que se ha encontrado en estudios previos

Yolk androgen concentration increases with laying order, as previous studies shown

10. En los individuos analizados se encontraron cuatro especies de parásitos sanguíneos: *Haemoproteus*, *Trypanosoma*, *Leucocytozoon* y una microfilaria de nematodo no identificado.

We found four blood parasites genus in analysed individuals: Haemoproteus, Trypanosoma, Leucocytozoon and an unidentified nematode microfilaria

11. La especie de hemoparásito con mayor prevalencia en el Avión Común fue *Haemoproteus*, apareciendo infectados más de la mitad de los individuos de la población. En cambio, en Golondrinas Comunes la mayor infección correspondió a *Trypanosoma*, con prevalencias en torno al 20%.

The highest prevalence found in House martins was the genus Haemoproteus (more than 50 %). In contrast, the highest prevalence in barn swallows was the genus Trypanosoma (20 %)

12. La presencia de pollos y juveniles de Avión Común infectados por *Haemoproteus* y *Trypanosoma* nos indica que la transmisión de la infección puede ocurrir en su área de cría, con lo que los vectores apropiados para dicha transmisión deben encontrarse también en la localidad de cría

The findings of infected nestlings show that transmission of infection may take place in the breeding area, so suitable vectors also may be there

13. Comprobamos que la prevalencia e intensidad de infección por hemoparásitos aumenta con la edad en estas poblaciones naturales de aves estudiadas, comenzando a notarse los efectos del parasitismo a edades tempranas, siendo éste un patrón común en las dos especies de hirundínidos analizadas.

*We show that prevalence and intensity of protozoan parasites infection increases with age in natural populations are related to the expression of their hosts senescence in three natural populations of two different avian species (*Delichon urbica* and *Hirundo rustica*), because blood parasites infection levels increase as their hosts grow old.*

14. De forma similar, el sistema inmune de los individuos de las dos especies analizadas se deteriora con el envejecimiento, constatado por el descenso en el

número de leucocitos circulantes en los individuos conforme avanzan en edad, pudiendo ser la causa del aumento de la infección antes reseñado.

Similarly, immune system in both analysed species deteriorates with age, as decrease in circulating leukocytes shown. It could cause the increase in blood parasites as they grow old

15. Al estudiar comparativamente la prevalencia de infección en las poblaciones de Aviión y Golondrina en referencia a la edad exacta conocida de los individuos analizados, observamos que ésta aumentó con la edad desde el estadio juvenil hasta alcanzar un máximo en individuos de 3 años, siendo menor en individuos de edad más avanzada. Estas diferencias podrían deberse a que los individuos que alcanzaron una edad madura son aquellos que previamente no han estado expuestos a la infección, o bien han sido capaces de desarrollar un sistema inmune eficiente que les permite atenuar o anular los efectos de la infección, o incluso pudieran desarrollar una cierta inmunidad adquirida tras una exposición previa a la infección

With a comparative test of prevalence of infection among three natural populations of two different avian species we show that the most prevalence of infection happens at three years old individual, and decreases in older birds. It could be because these older birds had no exposition to infection, or because they have a strong immune system to fight against parasites

***Edita: Universidad de Extremadura
Servicio de Publicaciones***

Caldereros 2. Planta 3^a
Cáceres 10071
Correo e.: publicac@unex.es
<http://www.unex.es/publicaciones>

