



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Efecto de la activación de la respuesta inmunitaria
sobre el desarrollo temprano, estrés oxidante y
supervivencia en *Sialia mexicana* (Passeriformes)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Yetzi América Hernández Martínez

Comité Tutorial

Dr. Sergio Ivan Ancona Martínez

Dra. Margarita Martínez Gómez

Dr. Jorge Vázquez Pérez

Dra. María Isabel López-Rull

Tlaxcala, Tlax.

Noviembre, 2017

Este trabajo de investigación se realizó bajo la asesoría del Dr. Sergio Ivan Ancona Martínez y la Dra. Margarita Martínez Gómez, en el Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (CTBC) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala- Unidad Periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Para la realización del presente trabajo se contó con el apoyo financiero otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a los proyectos “Ecofisiología del crecimiento: Factores asociados a la variación en estrés oxidativo, longitud de telómeros y supervivencia en pollos de aves silvestres” (Fondo de Ciencia Básica SEP-CONACYT No. 220418), “Resistencia y resiliencia de comunidades microbianas de suelos de diferentes ecosistemas ante diferentes perturbaciones” (Fondo de Ciencia Básica SEP-CONACYT No. 256096), “Fortalecimiento de la investigación en fisiología del comportamiento: Estudios en biomedicina y ecofisiología” (Infraestructura No. 225126), además de la beca para estudios de maestría y beca mixta de movilidad en el extranjero brindadas por la misma institución (Becas Nos. 587009 y 291212 respectivamente). Así como por el proyecto “Estación Científica La Malinche: Investigación integrativa para la conservación y educación ambiental” (Programa por Amor al Planeta Volkswagen).

El programa de Maestría en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala se encuentra registrado en el Programa para el Fortalecimiento del Posgrado Nacional. Padrón Nacional de Posgrado-CONACYT (PNP).



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado
Posgrado en Ciencias Biológicas



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

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que **Yetzi América Hernández Martínez** realiza para la obtención del grado de Maestra en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es: **“Efecto de la activación de la respuesta inmunitaria sobre el desarrollo temprano, estrés oxidante y supervivencia en *Sialia mexicana* (passeriformes)”**.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., OCTUBRE 12 DE 2017

DR. SERGIO IVÁN ANCONA MARTÍNEZ

DR. JORGE VÁZQUEZ PÉREZ

DRA. BIBIANA CAROLINA MONTOYA LOAIZA

DR. LORENZO PÉREZ RODRÍGUEZ

DR. DANIEL MATÍAS GONZÁLEZ TOKMAN



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:
ISO 9001:2008-NMX-CC-9001-IMNC-2008



Km. 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla CP 90070, Tlaxcala, Tlax. Tel/Fax: 01(246)462-15-57 e-mail: posgradoctbcuat@gmail.com

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, al Posgrado en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (CTBC) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala- Unidad Periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

A la Estación Científica La Malinche por las facilidades brindadas durante el trabajo de campo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero otorgado a los proyectos “Ecofisiología del crecimiento: Factores asociados a la variación en estrés oxidativo, longitud de telómeros y supervivencia en pollos de aves silvestres” (Fondo de Ciencia Básica SEP-CONACYT No. 220418), “Resistencia y resiliencia de comunidades microbianas de suelos de diferentes ecosistemas ante diferentes perturbaciones” (Fondo de Ciencia Básica SEP-CONACYT No. 256096), “Fortalecimiento de la investigación en fisiología del comportamiento: Estudios en biomedicina y ecofisiología” (Infraestructura No. 225126), además de la beca para estudios de maestría y beca mixta de movilidad en el extranjero brindadas por la misma institución (Becas Nos. 587009 y 291212 respectivamente). Así como por el proyecto “Estación Científica La Malinche: Investigación integrativa para la conservación y educación ambiental” (Programa por Amor al Planeta Volkswagen).

A mis directores de tesis, el Dr. Sergio Ivan Ancona Martínez y la Dra. Margarita Martínez Gómez por tomar el proyecto y por el compromiso puesto en él.

A los miembros de cada uno de los comités evaluadores: Dr. Jorge Vázquez Pérez, Dra. María Isabel López-Rull, Dr. Alejandro Salinas Melgoza, Dra. Bibiana Carolina Montoya Loaiza, Dr. Daniel Matías González Tokman, Dr. Lorenzo Pérez-Rodríguez, Dra. Melissa Plasman.

Al Dr. Juan Antonio Fargallo Vallejo y al Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid (MNCN) por su apoyo en la estancia de investigación.

A quienes se sumaron a la labor y fueron un apoyo constante en la parte molecular: Dra. Yendi Navarro, Dra. Bibiana Carolina Montoya Loaiza, Dra. Alexandra Rodríguez Sastre, Dra. María Isabel López-Rull y Dr. Juan Antonio Fargallo Vallejo.

Al Dr. Alejandro Salinas Melgoza y la Biol. Irene Gaona Gordillo por su apoyo en el trabajo de campo.

A la Biol. Zayra Arery Guadalupe Muñoz González por el diseño de la imagen de la dedicatoria.

Al Dr. Fausto René Beamonte-Barrientos quien diseñó una parte sustancial del proyecto y que fue culminado por el Dr. Sergio Ivan Ancona Martínez y la Dra. Margarita Martínez Gómez. Por su participación en la colecta de datos.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Hay tantas personas a quienes agradecer en este trabajo, que resulta difícil comenzar con alguna de ellas.

Quiero agradecerle a Margarita por todo el apoyo que me brindó desde el comienzo, desde la licenciatura, cuando me dio la oportunidad de integrarme al CTBC para escribir la tesis y, posteriormente, cursar un posgrado. Por no dejarme vencer por la tristeza y motivarme con el trabajo. Por estar al pendiente del avance del proyecto.

A Cheko, por tomar este trabajo y hacerlo suyo. Por acogerme cuando más lo necesitaba. Por esa retroalimentación tan enriquecedora que tuvo siempre. Por su motivación, calidez, entusiasmo y su interés por saber si estaba bien. Por su motivación a que fuera más allá siempre. Gracias, muchas gracias por aceptar este reto. Este logro es de los dos.

A cada uno de los revisores, George, Isa, Alex, Bibi, Loren, Daniel y Melissa por su compromiso, dedicación y sus comentarios, todos ellos tan importantes.

A Isa y Juanto por su apoyo para hacer posible la estancia en Madrid, por su recibimiento, atención y enseñanzas durante ese período. Por su participación en los análisis de laboratorio. A David Idiaquez por su amistad, por las charlas y las risas que compartimos.

A Yendi, quien nunca se rindió con los telómeros y puso todo su empeño, hasta el último momento, para lograr afinar la técnica.

A Bibiana, por su invaluable ayuda con los análisis de estrés oxidante, por sus comentarios y las pláticas, por su amistad y por tratar de no dejarme sola en un país que no conocía.

A Bélgica, Fer, George, Hilda y Luisa por recibirme en el laboratorio y brindarme su amistad.

A Mine por hacerme sentir como en casa, por brindarme su apoyo incondicional y estar ahí siempre. Por ser esa gran amiga con la que se pueden compartir risas, frustraciones, llanto y logros. Por abrirme las puertas de su casa y colarme hasta el último rincón. No tengo cómo agradecerle todos estos años Mine. Gracias, de verdad, muchas gracias.

A “Martes de Biólogos”: Alex, Iv, Mine y Tam por su amistad, por esas reuniones tan divertidas en las que siempre discutíamos sobre nuestros trabajos, en las que siempre teníamos algo nuevo que decir y donde todos nos desahogábamos.

A mis padres, Adriana y Pepe, y a hermanos, Isa y Uri, por su paciencia al saber que estamos lejos, su amor y apoyo incondicional, por la motivación que siempre me dieron cuando me sentía vencida. Por impulsarme a lograr lo que quiero y respetar las decisiones que he tomado. Saben que los quiero y que son lo más importante para mí.

A Iv quien, por casi siete años, he recibido lo mejor. Por su paciencia y amor. Por nunca dejar que me rindiera, por exigirme, por motivarme. Por dejar muchas cosas de lado y empezar una nueva vida en Tlaxcala. Por dejarme llorar y por hacerme reír siempre. Por dejarme vivir y sufrir estos dos años de maestría a su lado.

Finalmente, a René por haberme aceptado como su estudiante en la licenciatura y en la maestría, por sembrar en mí la semilla de la curiosidad, del trabajo en equipo, la motivación por la investigación y las ganas de obtener lo mejor. Por su amistad, apoyo y calidez. Por todas sus enseñanzas. No hay día que no te piense y te extrañe.

A René Beamonte-Barrientos

Ánimo



Efecto de la activación respuesta inmunitaria sobre el desarrollo temprano, estrés oxidante y supervivencia en *Sialia mexicana* (Passeriformes)

Biol. Y. América Hernández Martínez

Co-directores: Dres. Sergio Ancona Martínez y Margarita Martínez Gómez

RESUMEN

Una respuesta inmunitaria eficaz podría ser crucial para sobrevivir al ataque de agentes patógenos durante el desarrollo temprano, pero su activación y mantenimiento podría requerir de una inversión sustancial de recursos y comprometer el desarrollo de otras estructuras o funciones. Por ejemplo, una activación temprana de la respuesta inmunitaria podría ir en detrimento del crecimiento o podría dar lugar a una tasa de deterioro fisiológico y corporal más acelerada, lo que podría traducirse en reducciones en la supervivencia o el éxito reproductivo. Sin embargo, se sabe muy poco acerca de los compromisos que podrían emerger durante el desarrollo temprano entre la activación de la respuesta inmunitaria y algunos componentes de historias de vida como el crecimiento y la supervivencia, así como de los mecanismos fisiológicos que podrían mediar estos compromisos. En este proyecto usamos al azulejo garganta azul (*Sialia mexicana*) como modelo de estudio para examinar cómo la activación experimental de la respuesta inmunitaria (*i. e.* inyección intradérmica de fitohemaglutinina, PHA) durante el desarrollo posnatal afecta negativamente el crecimiento y la supervivencia al emplumado (14 días de edad) y si estas disyuntivas están mediadas por el estrés oxidante, un parámetro fisiológico asociado con el deterioro celular. Nuestros análisis de 104 crías (34 nidadas) arrojaron dos resultados principales: la activación experimental de la respuesta inmunitaria de las crías de azulejo garganta azul a la edad de 8 días por medio de una inyección de PHA no comprometió la tasa de crecimiento, ni dio lugar a incrementos en los niveles de daño oxidante ni a reducciones en la capacidad antioxidante y la probabilidad de supervivencia al emplumado. Este resultado podría indicar que la inyección de PHA pudo no haber tenido un impacto en el crecimiento, probablemente porque montar una respuesta inmunitaria contra el mitógeno no implica un costo energético muy alto. Otra posibilidad es que el crecimiento no se vea comprometido por la activación de la respuesta inmunitaria si la talla al emplumado es un atributo canalizado en esta población.

Alternativamente, la ausencia de un impacto de la inyección de PHA en el crecimiento de las crías de azulejo podría atribuirse también a que los padres absorbieron el costo de la manipulación proveyéndoles más alimento o alimentos de mejor calidad a las crías que fueron retadas inmunitariamente, la aplicación de PHA fue realizada cuando el sistema inmune de las crías no estaba completamente maduro, o la dosis de PHA no fue suficientemente alta como para inducir una respuesta inmunitaria. Sin embargo, al encontrar que las crías sometidas al reto inmunitario con PHA provenientes de nidos con ayudantes de crianza mostraron niveles más altos de daño oxidante en plasma que las crías retadas inmunitariamente que no contaron con la presencia de ayudantes en el nido, y que las crías que no fueron retadas inmunitariamente procedentes de nidos con ayudantes y sin ayudantes de crianza, sugiere que, aunque no hubo un impacto directo de la aplicación del reto inmunitario en el crecimiento y la fisiología de las crías de estos azulejos, la aplicación de este reto inmunitario podría haber inducido ajustes en el nivel de cuidado que proveen los ayudantes de crianza, permitiendo a las crías desarrollar una respuesta inmunitaria fuerte sin comprometer los recursos necesarios para crecer, pero derivando en una mayor actividad citotóxica de defensa. Estudios posteriores son necesarios para examinar si la activación de la respuesta inmunitaria durante el desarrollo temprano podría comprometer la supervivencia en la adultez o el éxito reproductivo de por vida.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
<i>Desarrollo temprano y disyuntivas de historia de vida.....</i>	1
<i>Costos de la activación de la respuesta inmunitaria durante la vida temprana...</i>	3
<i>La respuesta inmunitaria aviar.....</i>	6
ANTECEDENTES.....	10
JUSTIFICACIÓN.....	12
OBJETIVOS.....	13
<i>Generales.....</i>	13
<i>Específicos.....</i>	13
HIPÓTESIS Y PREDICCIONES.....	13
MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
<i>Área y especie de estudio.....</i>	14
<i>Procedimiento experimental.....</i>	16
<i>Análisis moleculares.....</i>	20
<i>Análisis estadísticos.....</i>	22
RESULTADOS.....	25
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	34
REFERENCIAS.....	40
APÉNDICES.....	50
<i>Protocolo para la estimación de la longitud de telómeros.....</i>	50
<i>Cajas nido en el Parque Nacional La Malinche ocupadas por el azulejo de garganta azul (Sialia mexicana).....</i>	59

INTRODUCCIÓN

Desarrollo temprano y disyuntivas de historia de vida

El desarrollo temprano, definido como el periodo que abarca desde la fecundación hasta la madurez sexual (Lindström 1999), es una etapa crítica en la vida de un individuo, ya que durante este periodo se modela el metabolismo y se consolidan diversas estructuras y funciones corporales (Metcalfé y Monaghan 2001). Por lo tanto, las condiciones que un individuo experimenta durante su desarrollo temprano pueden tener un impacto sustancial en la expresión de sus características fenotípicas (Monaghan 2008) y en su adecuación (Lindström 1999). La magnitud de estos impactos depende del estadio de desarrollo en que los individuos experimentan algunos retos ambientales y, en general, cuanto más temprano en la vida estos retos tienen lugar, más profundo y persistente es su impacto (Gluckman y cols. 2005, Ancona y Drummond 2013).

Las consecuencias de experimentar condiciones adversas durante el desarrollo temprano han sido documentadas en insectos (Koella y Boëte 2002), peces (Taborsky 2006, Auer 2010), reptiles (Bleu y cols. 2012), aves (Costantini y Dell’Omo 2006, Ancona y Drummond 2013, Asghar y cols. 2015) y mamíferos (Hayward 2011), incluyendo humanos (McDade y cols. 2008). Los déficits nutricionales y otras condiciones desfavorables durante el desarrollo temprano, como densidades poblacionales altas, una alta incidencia de parasitismo o un clima adverso, pueden tener impactos negativos en la morfología (*e. g.* en el tamaño corporal y características sexuales secundarias; Birkhead y cols. 1999, Morgan y Metcalfé 2000), fisiología (*e. g.* resistencia a la insulina y acortamiento de telómeros; Gluckman y Handson 2004, Asghar y cols. 2015) y conducta (*e. g.* capacidad competitiva; Richner y cols. 1989) de los individuos. Estos impactos pueden manifestarse en diversas etapas de la vida y expresarse de forma distinta entre los sexos, esto último debido probablemente a diferencias sexuales en los requerimientos nutricionales o en la sensibilidad a variaciones ambientales durante el desarrollo entre machos y hembras (Mora y cols. 1981, Nager y cols. 1999, Gorman y Nager 2004).

Los costos de haber experimentado condiciones desfavorables durante el desarrollo prenatal o posnatal pueden expresarse temprano en la vida en términos de una mayor mortalidad juvenil o una reducción en la probabilidad de reclutamiento, es decir, una reducción en la probabilidad de que los individuos logren establecerse en la población como adultos reproductores (Verboven y Visser 1998, Einum y Fleming 2000, McDonald y cols. 2005). Sin embargo, los individuos afectados podrían sobrevivir a las adversidades iniciales y los costos podrían expresarse en su adecuación a largo plazo como retrasos en la reproducción (Descamps y cols. 2006), reducciones en su longevidad o éxito reproductivo acumulado (Lindström 1999), o como tasas de senescencia más aceleradas (Nussey y cols. 2007). Los costos que son evidentes a largo plazo (*e. g.* después de la madurez sexual) suelen ser resultado de disyuntivas en la asignación de recursos entre diferentes estructuras y funciones vitales y entre distintos atributos de historia de vida que son inducidas por la exposición temprana a condiciones de estrés (Monaghan 2008).

Los individuos sometidos a condiciones adversas durante etapas tempranas de su desarrollo podrían experimentar ajustes en sus trayectorias de crecimiento que les permiten sobrevivir al estrés inicial (Monaghan 2008). Estos ajustes podrían comprometer el desarrollo de otras funciones o estructuras y, por lo tanto, podrían afectar otros componentes de su historia de vida como la longevidad o el éxito reproductivo (De Block y Stocks 2008, Auer y cols. 2010). En algunas especies, la reducción en la ingesta de alimento durante el desarrollo temprano puede inducir crecimiento compensatorio, es decir, una ralentización de la tasa de crecimiento cuando los recursos son escasos seguida de un crecimiento acelerado, usualmente cuando la disponibilidad de recursos aumenta (Geiger y cols. 2011). Este crecimiento compensatorio puede permitir al individuo alcanzar la talla óptima para la reproducción, sin embargo, también puede comprometer el desarrollo o la maduración de otros rasgos y, por lo tanto, puede tener importantes implicaciones para su adecuación (Metcalf y Monaghan 2001). Por ejemplo, las crías de pinzón cebrado (*Taeniopygia guttata*) presentan crecimiento compensatorio en respuesta a una dieta de baja calidad y, al mismo tiempo, muestran un déficit en el desempeño de tareas de aprendizaje y exploración espacial (Krause y Naguib 2011), posiblemente debido a un pobre desarrollo del hipocampo y de las células neuronales. Cambios importantes en algunas estructuras cerebrales asociados a déficits nutricionales o un crecimiento compensatorio han sido documentados en otras

especies como la chara californiana (*Aphelocoma californica*; Pravosudov y cols. 2005). Estos cambios en el desarrollo podrían tener impactos importantes en la supervivencia, ya que un desarrollo adecuado del cerebro es fundamental para la búsqueda de alimento o la evasión de depredadores (Pravosudov y cols. 2005). Similarmente, en ratas de laboratorio (variedad Wistar), el crecimiento compensatorio posnatal puede dar lugar a reducciones en la probabilidad de supervivencia en la adultez, ya que suele relacionarse con un acortamiento más acelerado de los telómeros en el riñón (Jennings y cols. 1999).

Algunas veces, los ajustes que los individuos experimentan en sus trayectorias de desarrollo como resultado de estar expuestos a condiciones prenatales o posnatales adversas (Metcalf y Monaghan 2001, Auer 2010) podrían no derivar necesariamente en costos en su adecuación a largo plazo, como sugieren varios estudios en poblaciones silvestres de aves (Drummond y Ancona 2015). La efectividad de esta flexibilidad en las trayectorias de desarrollo para mitigar los impactos subsecuentes de haber experimentado condiciones de desarrollo adversas en la adecuación podría depender de la naturaleza, magnitud y duración del estrés durante etapas prenatales o posnatales (Monaghan 2008). En poblaciones silvestres, los impactos negativos de un desarrollo temprano pobre podrían también ser evadidos o mitigados mediante mecanismos que permiten a los progenitores proteger a la descendencia de las adversidades ambientales (Monaghan 2008). Las hembras de varias especies de aves y mamíferos, por ejemplo, podrían hacer ajustes en la cantidad de nutrientes u hormonas que transfieren a su descendencia y, con ello, modular el desarrollo de la misma o producir fenotipos con mayores capacidades de enfrentar condiciones adversas como la escasez de alimento o la abundancia de depredadores y competidores (Mosseau y Fox 1998, Groothuis y cols. 2005). Asimismo, en especies que presentan cuidado parental, uno o ambos progenitores podrían modificar la frecuencia con la que alimentan a sus crías o proveer alimentos de mejor calidad nutrimental cuando persisten condiciones desfavorables durante el desarrollo posnatal de su descendencia (Hakkarainen y Korpimäki 1994).

Costos de la activación de la respuesta inmunitaria durante la vida temprana

Una de las presiones ecológicas más fuertes a la que están expuestos los organismos durante su desarrollo temprano es el ataque por patógenos y parásitos (Charmantier y cols. 2004,

Hayward 2011). Durante el desarrollo temprano, la protección contra agentes invasores es crucial para la supervivencia juvenil, por lo tanto, los individuos deben contar con un mecanismo de defensa inmunitaria eficaz y eficiente. Los parásitos y patógenos pueden mermar la condición corporal y promover tasas de crecimiento más lentas en los individuos (Saino y cols. 1998, Soler y cols. 2003, van de Crommenacker y cols. 2010). Esto último debido a que los agentes externos consumen los recursos del hospedero, la activación del sistema inmune puede demandar un gasto de energía elevado para la producción de células inmunes, o porque la toxicidad de la actividad de defensa de estas últimas puede tener un impacto en otros tejidos (Costantini y Møller 2009, Hasselquist y Nilsson 2012, Schneeberger y cols. 2013). Las consecuencias del ataque por parásitos y patógenos en la adecuación a corto y largo plazo han sido ampliamente documentadas en diferentes grupos de animales como insectos (Koella y Boëte 2002), aves (Saino y cols. 2003, Reid y cols. 2006) y mamíferos (McDade y cols. 2008, Chylinski y cols. 2009, Hayward 2011, Bourke y cols. 2011). Sin embargo, el impacto que podría tener la activación de la respuesta inmunitaria en sí misma en el desarrollo y, por consiguiente, en diferentes atributos de historia de vida, ha sido poco evaluado (Costantini y Dell’Omo 2006), aunque su estudio contribuiría a mejorar nuestra comprensión de las disyuntivas que podrían surgir como resultado de la exposición a agentes infecciosos durante el desarrollo temprano.

En general, el sistema inmune en animales es tanto esencial como complejo, y su desarrollo, activación y mantenimiento requieren de una alta cantidad de nutrientes específicos y un gasto de energía elevado (Hasselquist y Nilsson 2012). La producción de células de defensa asociada a la activación de la respuesta inmunitaria es energéticamente demandante y podría traducirse en incrementos en la tasa metabólica basal (Costantini y Møller 2009, Schneeberger y cols. 2013). Por ejemplo, los adultos del gorrión europeo (*Passer domesticus*) a los cuales se le induce la activación del sistema inmune experimentalmente muestran un incremento en la tasa metabólica equiparable a la producción de un huevo (Martin y cols. 2003).

Además de inducir costos de índole energética, la activación de la respuesta inmunitaria puede dar lugar a costos nutricionales y fisiológicos (Hasselquist y Nilsson 2012). La activación del sistema inmune requiere de nutrientes específicos como amino

ácidos, los cuales son necesarios para la gluconeogénesis y síntesis de proteínas de la fase aguda, carbohidratos y proteínas como fuente de energía, así como de agentes antioxidantes, como los carotenoides (Hasselquist y Nilsson 2012, Rauw 2012). Asimismo, la respuesta inmunitaria por sí misma podría incrementar los niveles de estrés oxidante y tener impactos negativos en la homeostasis celular. El balance entre la producción de especies y metabolitos reactivos de oxígeno (ROS y ROMs por sus siglas en inglés), y la neutralización de estos por medio de los antioxidantes, puede verse modificado por la defensa contra patógenos, ya que las células inmunes actúan por actividad citotóxica e inflamatoria, lo que promueve la generación de agentes pro-oxidantes (Hasselquist y Nilsson 2012).

El estrés oxidante es el desbalance entre la producción de especies y metabolitos reactivos de oxígeno (ROS y ROMs por sus siglas en inglés) y la neutralización de éstas por medio de los antioxidantes (Schneeberger y cols. 2013). Las ROS son generadas como consecuencia de la producción de energía por medio de los procesos metabólicos de las mitocondrias y peroxisomas de las células causando daño oxidante a los tejidos y biomoléculas de los organismos (Finkel y Holbrook 2000). En cuanto a la activación del sistema inmune se refiere, ROMs como hidroperóxidos pueden ser formados por la oxidación de la enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH por sus siglas en inglés) debido al un incremento en el consumo de oxígeno (Costantini y Møller 2009). El costo fisiológico no sólo puede ser medido en términos del estrés oxidante sino también en el efecto que éste tiene sobre las biomoléculas, tal como en los lípidos y el ADN de los organismos, ya que los niveles de ROS se encuentran estrechamente relacionados con la longitud de los telómeros (Beaulieu y cols. 2011). Los telómeros (cápsulas que protegen los extremos finales de los cromosomas) son estructuras que podrían ser vulnerables al daño oxidante causado por la activación de la respuesta inmunitaria, ya que los ROS atacan de manera particular a las guaninas que los conforman (T₂AG₃; Oikawa y cols. 2001).

De esta manera, la evolución de la respuesta inmunitaria implica un balance entre los beneficios que esta confiere a los individuos en términos de supervivencia y los diversos costos que su desarrollo, activación y mantenimiento parecen implicar (Klasing 2004). Los costos de la activación de la respuesta inmunitaria podrían ser evidentes desde fases tempranas de la vida de un individuo. Sin embargo, los intentos por evaluar el impacto de la

activación de la respuesta inmunitaria en el crecimiento, mantenimiento corporal y supervivencia durante el desarrollo temprano han sido escasos, y aún no contamos con una apreciación general de qué tan importantes son estos impactos en poblaciones silvestres de animales.

Este proyecto de maestría se enfocó en investigar cómo la activación del sistema inmune, inducida experimentalmente por una inyección intradérmica de fitohemaglutinina (PHA por sus siglas en inglés), un mitógeno que suele utilizarse como un inductor de la defensa inmunitaria, influye en el crecimiento, la fisiología y la supervivencia juvenil en el azulejo garganta azul (*Sialia mexicana*), un ave paserina que presenta crianza cooperativa facultativa. La crianza cooperativa en el azulejo garganta azul implica la defensa del nido y el aprovisionamiento de alimentos a la prole de una pareja reproductiva por parte de individuos juveniles o adultos que no son miembros de la pareja reproductiva (Dickinson y cols 1996). Los ayudantes usualmente son descendientes producidos por (al menos) un miembro de la pareja en temporadas reproductivas anteriores, y frecuentemente, estos ayudantes son de sexo masculino, ya que la mayoría de las hembras suelen a dispersarse (Dickinson y cols 1996). Los azulejos garganta azul pueden enfrentarse a una amplia variedad de macro y micro parásitos durante su desarrollo, entre ellos moscas, garrapatas, piojos, ácaros, acantocéfalos, nemátodos y protistas (Thompson-Cowley 1979, Germaine y Germaine 2002, Carleton y cols. 2012). La inyección intradérmica de PHA estimula la respuesta inmunitaria celular en las crías de estas aves, simulando así lo que suele ocurrir cuando los antígenos y el daño cutáneo producidos por estos parásitos generan una respuesta inflamatoria (Owen y cols. 2010).

La respuesta inmunitaria aviar

En vertebrados, el sistema inmune está compuesto por los órganos linfoides, los cuales se encuentran conectados a través del sistema linfático (Demas y cols. 2011). Los principales constituyentes de este sistema son la médula ósea, el timo y, en el caso de las aves, la bursa de Fabricio (figura 1; Kaiser y cols. 2014). Además de estos, el sistema linfático involucra otros órganos como el bazo, las tonsilas cecales y las placas ileocecales de Peyer (exclusivas en las aves). El timo es un órgano lobulado que participa en la producción y maduración de

los linfocitos T. En la médula ósea tiene lugar la hematopoyesis que dará paso a los progenitores de las células mieloides (granulocitos y macrófagos) y linfoides (linfocitos B y T). La bursa de Fabricio es un órgano ovoide que se encuentra entre la cloaca y el sacro y es el responsable de la proliferación y diferenciación de los linfocitos B (Kaiser y cols. 2014).

La inmunocompetencia de los organismos, es decir, la capacidad de un individuo para prevenir y controlar una infección por algún agente patógeno (Norris y Evans 2000), se encuentra mediada por la respuesta innata y la adquirida (tabla 1). La respuesta inmunitaria innata es considerada como la primera línea de defensa ante un ataque por microorganismos y activa una respuesta rápida y no específica (Kaiser y cols. 2014). La defensa inmune innata involucra tres diferentes barreras de protección (Demas y cols. 2011): una barrera física (*e. g.* piel y membranas mucosas), una humoral (proteínas de la fase aguda, anticuerpos naturales y sistema de complemento) y una celular (granulocitos y macrófagos como células fagocíticas, pro-inflamatorias y citotóxicas). Los anticuerpos naturales son moléculas capaces de eliminar a un patógeno por medio de la opsonización, promueven el inicio de una cascada enzimática del sistema complementario y, como elementos importantes del sistema innato, no necesitan de exposición previa al antígeno para su funcionamiento (Matson y cols. 2005). El sistema de complemento suprime componentes no propios del individuo por medio de un bombardeo enzimático a las membranas, provocando una inflamación y, posteriormente, la lisis de las células invasoras (Demas y cols. 2011).

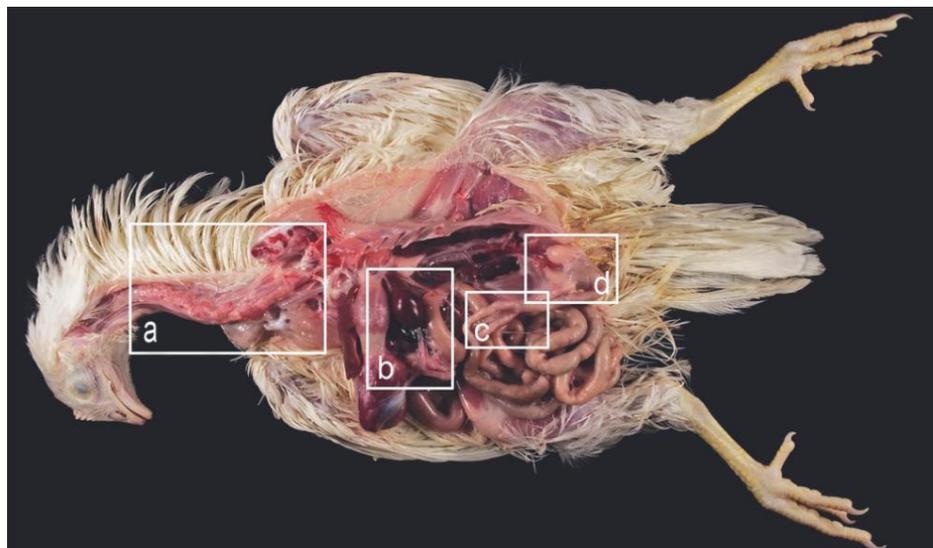


Figura 1. Estructura del sistema linfático en las aves, conformado por (a) el timo, (b) el bazo, (c) las tonsilas cecales y (d) la bursa de Fabricio (Tomado de Kaiser y cols. 2014).

Por otro lado, la respuesta inmunitaria adquirida es de acción lenta, ya que requiere del desarrollo de células linfoides, las cuales actúan de manera específica por medio del reconocimiento de receptores particulares (Palacios y cols. 2009). Asimismo, este tipo de respuesta posee un mecanismo de memoria que le permitirá responder de manera más rápida y oportuna ante ataques subsecuentes (Demas y cols. 2011). Este tipo de protección utiliza un mecanismo de acción celular y otro humoral. La respuesta inmunitaria humoral es aquella en la que participan los linfocitos B provenientes de la bursa de Fabricio, los cuales se encargan de la producción de los anticuerpos para la eliminación de los patógenos, por lo que es necesario que se genere, a su vez, un repertorio de antígenos específicos (Kaiser y cols. 2014). Por otra parte, la respuesta inmunitaria celular está basada en la acción de los linfocitos T provenientes del timo que, a diferencia de la defensa humoral, necesitan del contacto directo con el microorganismo a eliminar (Demas y cols. 2011). Los linfocitos T se dividen en tres subtipos de acuerdo a la función que desempeñan: células citotóxicas (Tc), coadyuvantes o *helper* (Th) y reguladoras (Treg), las cuales destruyen las células infectadas por medio de la secreción de citocinas y glicoproteínas (Demas y cols. 2011).

Tabla 1. Sistema inmune aviar (Modificado de Demas y cols. 2011).

Tipo de inmunidad	Descripción	Células participantes
Innata	<ul style="list-style-type: none"> • Inespecífica. • Acción rápida. • Barreras de defensa: <ul style="list-style-type: none"> ✓ Físicas: Piel y membranas mucosas. ✓ Bioquímicas: Proteínas de fase aguda, péptidos microbianos, enzimas del sistema de complemento y anticuerpos naturales. ✓ Celulares. 	<ul style="list-style-type: none"> • Fagocíticas: <ul style="list-style-type: none"> ✓ Heterófilos. ✓ Monocitos. ✓ Macrófagos. • Pro-inflamatorias: <ul style="list-style-type: none"> ✓ Basófilos. ✓ Eosinófilos. • Citotóxicas: <ul style="list-style-type: none"> ✓ <i>Natural killers</i> (NK)
Adquirida	<ul style="list-style-type: none"> • Específica (por medio de antígenos). • De respuesta lenta. • Mecanismo de memoria. • Respuesta humoral y celular. 	<ul style="list-style-type: none"> • Respuesta humoral <ul style="list-style-type: none"> ✓ Linfocitos B: Anticuerpos. • Respuesta celular <ul style="list-style-type: none"> ✓ Linfocitos T: Citotóxicos, cooperadores (<i>helpers</i>) y reguladores.

En el caso de las crías de aves, el sistema inmune se va modelando desde la fecundación por medio de la transferencia materna de proteínas conocidas, inmunoglobulinas, las cuales funcionan como anticuerpos, después tiene lugar el desarrollo de los órganos linfáticos y, finalmente, la madurez de la respuesta inmunitaria adquirida después del nacimiento (Kaiser y cols. 2014). Aunque la inmadurez del sistema inmune durante los primeros días de vida pudiera representar un riesgo para la supervivencia de las crías, se ha encontrado que estas se encuentran protegidas por los anticuerpos de la madre por un periodo corto de tiempo, y por la activación de su sistema inmune innato (Pihlaja y cols. 2006, Palacios y cols. 2009).

Existen diversas formas de evaluar la inmunocompetencia de los organismos. Esto se ha hecho por medio de conteos de linfocitos y glóbulos blancos, a través de la estimación de la actividad de anticuerpos naturales y del sistema del complemento (hemólisis y hemaglutinación; Matson y cols. 2005), sometiendo a los organismos a retos inmunitarios que inducen la producción de anticuerpos específicos, por medio de la cuantificación de linfocitos producidos contra los glóbulos rojos de la oveja (sheep red blood cells, SRBC) y la vacuna de difteria-tétanos o mediante la prueba de la piel con PHA (Demas y cols. 2011). La aplicación de cada técnica depende del modelo de estudio en cuestión, ya que algunas técnicas requieren que los individuos sean capturados en repetidas ocasiones. Además, muchos de ellos requieren de un entrenamiento previo o del uso de equipo específico de laboratorio que no siempre es factible.

Uno de los métodos más utilizados para estimar la capacidad inmunitaria en animales silvestres es el reto con PHA, ya que esta técnica es de fácil aplicación en campo, el equipo necesario para la aplicación y análisis de sus efectos es de bajo costo, no se necesita de anticuerpos especie-específicos, no tiene un efecto letal para los organismos y el efecto en estos es a corto plazo (Smiths y cols. 1999). La PHA es un mitógeno obtenido del frijol (*Phaseolus vulgaris*; Martin y cols. 2006) que activa la respuesta inmunitaria adquirida mediada por células T (Tella y cols. 2008). Este compuesto actúa de manera rápida. Tres horas después de la aplicación de PHA comienza la aparición de heterófilos y trombocitos, 6-12 horas después de la aplicación se da una reacción celular que provoca vasodilatación, edema e inflamación de tejido debido a las citocinas secretadas por los macrófagos y

basófilos. Asimismo, se da un aumento en la concentración de proteínas asociadas a procesos inflamatorios como la albúmina, la α -globulina 2 y β -globulina 1. Transcurridas 24 horas después de la aplicación se da una filtración de células T derivadas del timo (CD4+, CD5+ y CD8+). Finalmente, 48 horas después desaparece la hinchazón (Martin y cols. 2006, Tella y cols. 2008).

El uso de PHA es común en aves paseriformes y no paseriformes y el efecto pasajero de esta sustancia puede durar varios días. Pollos de carbonero común (*Parus major*) inyectados con PHA a la edad de 8 días, mostraron niveles más altos de linfocitos y heterófilos (H/L) una semana después de la inyección que aquellos pollos a los que se les aplicó una sustancia inerte. Esto sugiere que el efecto de la PHA podría durar al menos siete días en algunas aves paseriformes (Hörak y cols. 2000). La PHA suele ser utilizada en estudios ecológicos como un sucedáneo del ataque por algunos ectoparásitos, ya que puede reflejar la capacidad de los individuos para defenderse contra infecciones por agentes externos (Navarro y cols. 2003). Además, la administración temprana de PHA podría simular una situación de estrés para los individuos en desarrollo. Si bien los mecanismos fisiológicos y de defensa descritos anteriormente actúan de manera similar en diferentes grupos de animales, este trabajo fue basado en un modelo aviar, por lo que las secciones posteriores de esta tesis se enfocan en este grupo de vertebrados.

ANTECEDENTES

La activación de la respuesta inmunitaria en la progenie y su impacto en el crecimiento han sido ampliamente estudiados en aves. Algunos estudios revelan resultados clave para el planteamiento de esta tesis. En pollos de golondrina ribereña (*Riparia riparia*), la privación de nutrientes tiene repercusiones para el crecimiento y la intensidad de la respuesta inmunitaria contra PHA, ya que las crías sometidas a un déficit alimentario presentan una tasa de crecimiento menor y una respuesta inmunitaria más débil que aquellas crías sometidas al mismo reto inmunitario pero con acceso *ad libitum* al alimento. Estos resultados sugieren que montar una respuesta inmunitaria efectiva depende del acceso a los recursos (Brzęk y Konarzeski 2007). Estudios en otras especies de aves también apoyan esta hipótesis. Se ha mostrado experimentalmente que las crías de urraca (*Pica pica*) y herrerillo común (*Parus*

caeruleus) a las cuales se les administra un suplemento de metionina, un potenciador de la respuesta inmunitaria mediada por células T que se obtiene a través del alimento, presentan una respuesta inmunitaria más intensa pero tasas de crecimiento y probabilidades de supervivencia menores que aquellas crías que no son suplementadas con metionina (Soler y cols. 2003, Brommer 2004). Esto sugiere que, al potenciarse la respuesta inmunitaria, más recursos podrían ser necesarios para mantener esta función, y estos requerimientos adicionales podrían comprometer la disponibilidad de recursos para otras funciones vitales como el crecimiento o el mantenimiento del soma.

A nivel fisiológico, las disyuntivas en la asignación de recursos hacia la activación de la respuesta inmunitaria *versus* crecimiento y mantenimiento somático, y sus implicaciones para la supervivencia, podrían ser mediadas por distintos mecanismos, como la modificación en los niveles de estrés oxidante y el acortamiento de los telómeros. Por ejemplo, se ha documentado que al aplicar un reto inmunitario en pollos de cernícalo vulgar (*Falco tinnunculus*) a la edad de 25 días pos-eclosión, los niveles de ROS incrementan y, consecuentemente, la barrera antioxidante disminuye (Costantini y Dell’Omo 2006). Este desbalance es predecible, pues una mayor producción de agentes pro-oxidantes se asocia con una menor proporción de antioxidantes en plasma (Monaghan y cols. 2009). Sin embargo, siguen siendo pocos los trabajos que han investigado el impacto de la activación de la respuesta inmunitaria en la fisiología de las crías en desarrollo.

Hasta ahora, solo un estudio en aves ha evaluado el efecto de la carga parasitaria en la dinámica de acortamiento de los telómeros. Asghar y cols. (2015) encontraron que las crías de carricero tordal (*Acrocephalus arundinaceus*) que sufrieron una infección por malaria durante su primer año de vida presentaron una mayor tasa de acortamiento de telómeros que aquellas crías que no fueron infectadas. Además, este mismo estudio demostró que cuanto mayor fue el grado de infección, más rápida fue la pérdida del material que conforma a los telómeros. La relación entre la infestación parasitaria y la tasa de acortamiento de telómeros en el carricero podría estar mediada por un incremento en los niveles de estrés oxidante, sin embargo, este parámetro no fue evaluado en dicho trabajo. La tasa de acortamiento de los telómeros podría tener importantes implicaciones para la adecuación de los individuos, ya que una mayor longitud de los telómeros se correlaciona con una mayor probabilidad de

supervivencia en etapas tempranas (Heidinger y cols. 2012) y tardías de la vida, como se ha encontrado en crías de pinzón cebrado (*Taeniopygia guttata*) y en diversas especies de aves (Hall y cols. 2004, Haussmann y cols. 2005, Bize y cols. 2009, Salomons y cols. 2009, Barrett y cols. 2013, Boonekamp y cols. 2014).

En lo que respecta a la supervivencia, se ha encontrado que pollos con mayor respuesta inmunitaria celular tienen mayores probabilidades de supervivencia al emplumado (Christe y cols. 1998, Christe y cols. 2001, López-Rull y cols. 2011). Los pollos de golondrina común (*Hirundo rustica*) criados en nidos donde toda la nidada sobrevive presentan una mayor respuesta inmunitaria que aquellos pollos provenientes de nidadas donde al menos uno de los hermanos perece (Merino y cols. 2000). Además, en el avión común (*Delichon urbica*) se ha encontrado una relación positiva entre la intensidad de la respuesta inmunitaria (*i. e.* grado de hinchazón en el ala), la condición corporal de los pollos (*i. e.* longitud del tarso, las alas y masa corporal) y la probabilidad de supervivencia al emplumado (Christe y cols. 1998, Christe y cols. 2001). Sin embargo, se requieren más estudios enfocados en examinar si la activación de la respuesta inmunitaria puede inducir cambios en el balance oxidante-antioxidante y en la tasa de acortamiento de telómeros, y si estos cambios podrían repercutir en la supervivencia de las aves en desarrollo.

JUSTIFICACIÓN

Si bien existen algunos estudios que evalúan el efecto de la activación de la respuesta inmunitaria en el crecimiento (Soler y cols. 2003, Brommer 2004, Brzęk y Konarzeski 2007), pocos estudios han evaluado simultáneamente las consecuencias de montar una respuesta inmunitaria durante fases tempranas del desarrollo para distintos parámetros fisiológicos (*e. g.* el nivel de estrés oxidante y la dinámica de acortamiento de los telómeros) y para distintos atributos de historia de vida en la etapa juvenil. Algunas aves con un periodo de desarrollo rápido, como el azulejo garganta azul, ofrecen buenas oportunidades para evaluar estos efectos. Investigar el impacto de la activación del sistema inmune durante el desarrollo temprano en múltiples parámetros nos permitirá tener un entendimiento integral de las posibles disyuntivas de historia de vida que pueden aparecer durante esta etapa crítica de la vida. Además, los resultados de este estudio contribuirán a la escasa, pero creciente literatura

que documenta los impactos de la activación de la respuesta inmunitaria adquirida en el desarrollo de la descendencia en poblaciones silvestres, ya que la mayoría de los estudios existentes han sido realizados en poblaciones en cautiverio y en individuos adultos (Costantini y Møller 2009, Smith y cols. 2016).

OBJETIVOS

Generales

Evaluar cómo la activación experimental de la respuesta inmunitaria influye en la tasa de crecimiento y la supervivencia de crías del azulejo garganta azul, y si los impactos de la activación de la respuesta inmunitaria en la supervivencia son mediados por un incremento en los ROMs y un acortamiento más acelerado de los telómeros.

Específicos

- i. Activar experimentalmente el sistema inmune de las crías del azulejo garganta azul por medio de una inyección intradérmica de PHA a la edad de 8 días.
- ii. Comparar la tasa de crecimiento y la probabilidad de supervivencia al emplumado entre crías sometidas al reto con PHA (grupo experimental) y crías a las que se les inyectó una sustancia inerte (grupo control).
- iii. Comparar la concentración de ROMs y la capacidad antioxidante entre los individuos asignados a los dos tratamientos.
- iv. Comparar el cambio en la longitud de los telómeros entre los 5 y 14 días de edad pos-eclosión entre las crías asignadas al grupo experimental y las crías asignadas al grupo control.

HIPÓTESIS Y PREDICCIONES

La activación experimental de la respuesta inmunitaria compromete el crecimiento y la supervivencia, y aumenta los niveles de estrés oxidante y la tasa de acortamiento de los

telómeros en las crías del azulejo garganta azul. Por consiguiente, se espera que las crías a las cuales se les aplica un reto inmunitario con PHA presenten:

- i. tasas de crecimiento menores,
- ii. niveles de daño oxidante mayores,
- iii. una capacidad antioxidante en plasma menor,
- iv. tasas de acortamiento de telómeros en eritrocitos mayores,
- v. y probabilidades de supervivencia al emplumado más bajas que aquellas crías que no son sometidas al reto inmunitario con PHA.

MATERIAL Y MÉTODOS

Área y especie de estudio

El trabajo de campo se llevó a cabo durante la temporada reproductiva (abril-junio) del azulejo garganta azul de 2015 en el Parque Nacional La Malinche (PNLM), Tlaxcala. Los datos fueron recabados a partir de cajas nido ubicadas en tres zonas de bosque localizadas dentro del perímetro del PNLM (figura 2), en las cuales el azulejo garganta azul se reproduce anualmente desde 2011 (Beamonte-Barrientos datos no publicados).

El azulejo garganta azul es un ave paserina de vida corta, socialmente monógama. Los machos presentan una coloración azul brillante, mientras que las hembras presentan una coloración azul grisácea, por lo que es fácil identificar el sexo de los adultos a simple vista (Siefferman y Hill 2005, Charmantier y cols. 2007; figura 3). Esta especie es usuaria secundaria de cavidades: utiliza cavidades naturales en árboles muertos o que son excavadas por otras aves para reproducirse y también se reproduce con éxito en cajas nido (Duckworth y Badyaev 2007, Cuatianquiz-Lima y Macías-García 2016).



Figura 2. Localidades pertenecientes al Parque Nacional La Malinche en las que se encuentra el sistema de cajas nido.



Figura 3. Azulejos garganta azul: hembra (derecha) y macho (izquierda). Foto: George Gentry, tomada de la red).

Los azulejos garganta azul establecen una puesta modal de 4 huevos. La media del número de crías por nido es de 3.5 ± 0.41 pollos, de los cuales, en promedio, 2.65 ± 0.32 sobreviven hasta el emplumado (Germaine y Germaine 2002). La etapa de máximo crecimiento de los pollos ocurre entre los 5 y 14 días de edad, y al día 8, los pollos presentan

una masa promedio de 20 gr (Beamonte-Barrientos datos no publicados). Los volantones suelen abandonar el nido a la edad de 20 días (Dickinson y cols. 1996). Esta especie presenta un sistema de crianza cooperativa facultativa, donde aproximadamente el 5% de los nidos presentan ayudantes de crianza (Gaona 2014), los cuales son predominantemente machos emparentados y participan en la alimentación de los pollos y en la defensa del nido (Dickinson y cols. 1996, Dickinson y Akre 1998).

Los azulejos garganta azul son un modelo de estudio muy bueno para poner a prueba la hipótesis de este trabajo porque no se encuentran en ninguna categoría de riesgo, los pollos tienen un crecimiento rápido, la etapa de anidación es corta y se puede dar seguimiento a cada nido hasta que los pollos emplumen sin riesgo de perturbar la conducta de incubación o de cuidado de las crías.



Figura 4. Nido de azulejo garganta azul (foto: América Hernández).

Procedimiento experimental

Las cajas nido fueron revisadas cada tres días a partir de la segunda mitad de marzo hasta la primera semana de julio para determinar su ocupación y registrar o estimar la fecha de puesta del primer huevo de cada nido focal. El intervalo de puesta entre cada huevo es de un día, lo que permite inferir de forma precisa la fecha de puesta de cada huevo mediante visitas subsiguientes. Se estimó el tamaño de puesta como el número de huevos en el nido (figura 4) y se calculó el volumen promedio de la puesta a partir de las medidas de largo y ancho de

cada uno de los huevos. Las puestas se consideraron completadas cuando transcurrían al menos dos días sin que otro huevo fuera puesto. Una vez completada la puesta, cada caja fue revisada sistemáticamente cada 2-4 días durante dos semanas para determinar la fecha de eclosión en cada nido focal. En esta población de azulejos, el periodo de incubación tiene una duración de 14 ± 1 días y la eclosión de los pollos en cada nido es sincrónica, es decir, todos ellos eclosionan el mismo día (Beamonte-Barrientos datos no publicados).

Se incluyeron las cajas que presentaron más de una cría en el nido. Esto rindió un total de 34 cajas y 104 pollos (número de nidos focales con 2 pollos = 3, con 3 pollos = 16, con 4 pollos = 14 y con 5 pollos = 1; apéndice 2). Se tomaron las medidas de masa y de la longitud del tarso y del pico (figura 5) de cada pollo focal a la edad de 5, 8, 11, 14 y 17 días. Los pollos fueron marcados repetidamente para su identificación individual dentro de cada caja con pintura vegetal no tóxica hasta la edad de 8 días. A partir de esta edad, los pollos fueron marcados con anillos de plástico de color. Los pollos que sobrevivieron hasta la edad de 14 días fueron marcados con anillos de metal grabados con una identidad alfanumérica individual.



Figura 5. Medición de la longitud del pico y del tarso de crías de azulejo garganta azul (fotos: René Beamonte-Barrientos).

Se implementó un diseño experimental anidado, en el cual parte de las crías de cada nidada focal fue sometida a un tratamiento control y la otra parte a un tratamiento experimental. Se asignó a las crías de cada nidada focal a uno de los dos grupos experimentales en función de su orden de eclosión, inferido a partir de su masa corporal, ya

que las crías más pesadas en una nidada suelen ser aquellas que eclosionan primero (Maddox y Weatherhead 2008). Para garantizar una muestra balanceada de crías con órdenes de eclosión diferentes en cada grupo experimental, se conformaron diferentes combinaciones de orden de eclosión y estas combinaciones fueron asignadas secuencialmente a cada tratamiento. Por ejemplo, en una nidada de 4 pollos, el primer y tercer pollo en eclosionar eran asignados al grupo control, y el segundo y cuarto pollo en eclosionar eran asignados al grupo experimental, mientras que en otra nidada, este orden en la asignación de parejas de hermanos a los dos tratamientos experimentales era invertido.

A la edad de 5 ± 1 días, antes de implementar cualquier tratamiento, se colectó una muestra de sangre de 60 μ l (equivalente a un tubo capilar heparinizado) de cada pollo para estimar la longitud inicial de los telómeros en los eritrocitos, cada muestra fue conservada en 400 μ l de etanol al 96%. Al día 8, durante la etapa de crecimiento exponencial, se aplicó un reto inmunitario (figura 6) a los 53 pollos incluidos en el grupo experimental. Este reto inmunitario consistió en una inyección intradérmica de 40 μ g de PHA diluidos en 20 μ l búfer salino de fosfato (PBS por sus siglas en inglés) en el patagio de alguna de las alas. Esta dosis fue igual a la suministrada en un estudio realizado en crías de la golondrina bicolor (*Tachycineta bicolor*), las cuales presentan una masa promedio similar a la que presentan las crías de azulejo garganta azul a la edad de 8 días (Smits y cols. 1999) y cuyo desarrollo es similar al de nuestro modelo de estudio, ya que presenta un tamaño de puesta de 4-6 huevos, un periodo de incubación de 13-16 días y las crías abandonan el nido entre los 16 y 24 días pos-eclosión (Baicich y Harrison 2005). La inyección de PHA induce la activación del sistema inmunológico sin desencadenar una infección y pone en marcha tanto la respuesta inmunitaria innata como la adquirida (Martin y cols. 2006). Los 51 pollos incluidos en el grupo control fueron inyectados con 20 μ l de PBS en el patagio de alguna de las alas. Estudios previos en aves sugieren que los individuos tratados con PBS presentan conteos de linfocitos y leucocitos similares a los que presentan aquellos individuos a los cuales no se les aplica ninguna sustancia (Smits y cols. 1999). Por lo tanto, no se requirió de un grupo control adicional al cual no se le aplicara solución alguna.



Figura 6. Aplicación de PHA a las crías de azulejo garganta azul (foto: René Beamonte-Barrientos).

A la edad de 14 días, seis días después de suministrar el inóculo de PHA o PBS, se extrajo una segunda muestra de sangre (240 μ l, equivalentes a 4 tubos capilares heparinizados) a cada pollo focal para estimar la longitud de los telómeros en sus eritrocitos, sus niveles de daño oxidante y su capacidad antioxidante en plasma posterior a la manipulación. Las muestras de sangre utilizadas para estimar la longitud de los telómeros fueron colocadas en etanol. Las muestras de sangre colectadas para la evaluación de estrés oxidante fueron centrifugadas a 10,000 rpm por 15 minutos para separar el plasma de la fracción celular. Ambas fracciones se almacenaron a -80° C. A las edades de 11 y 17 días, únicamente se tomaron medidas morfométricas de los pollos pertenecientes a ambos grupos experimentales.

Para estimar la probabilidad de supervivencia al emplumado, se registró la presencia (o ausencia) de las crías en su caja nido natal a la edad de 14 días; a esta edad su vagilidad es muy baja, por lo que si una cría no es vista en el nido a esta edad puede asumirse que ha muerto. Aunque es a la edad de 17 días que los azulejos ya han emplumado por completo en esta población, estimar la supervivencia a esta edad podría dar lugar a una subestimación sustancial de la supervivencia al emplumado, pues a partir de los 17 de días de edad los azulejos suelen hacer viajes intermitentes y regresar a sus nidos natales por periodos de tiempo cada vez más cortos, por lo que la probabilidad de encontrarlos en su nido natal es

muy baja. El registro de la presencia/ausencia de las crías focales en el nido a la edad de 14 días podría dar lugar a una sobrestimación de la supervivencia al emplumado. Sin embargo, esta sobrestimación podría ser pequeña en comparación con el sesgo en la estimación de supervivencia al emplumado resultante de registrar la presencia/ausencia de las crías a los 17 días de edad.

Análisis moleculares

Se extrajo ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de los eritrocitos mediante el kit DNesay Blood and Tissue (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante, modificando únicamente el tiempo de incubación de la proteinasa K, de 10 a 60 minutos. La concentración de ADN obtenido se estimó por triplicado por medio del Nanodrop 3000 (Thermo Scientific).

La cuantificación de la longitud de los telómeros se llevó a cabo por medio de PCR cuantitativa absoluta (qPCR) en tiempo real (Barrett y cols. 2012) empleando oligonucleótidos de tamaño y concentración conocidos para la amplificación de la región telomérica, así como un gen unicopia como control interno, el gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa o GAPDH del pinzón cebra (*Taeniopygia guttata*). Este control interno nos permitió normalizar la cantidad de telómeros amplificados en una concentración de ADN conocida (apéndice 1).

Por otro lado, se estimó el daño oxidante en plasma como la concentración de ROMs, particularmente de hidroperóxidos, los cuales son producidos por la peroxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Beamonte-Barrientos y Verhults 2013). Esta estimación se realizó por medio del kit d-ROM test (Diacron). El plasma (20 µl) fue diluido en una solución de 250 µl de búfer de acetato 0.01 M (pH= 4.8) y N, N-dietil-p-fenilenadamina como cromógeno, y se incubó por 90 minutos a 37°C. Cuando los compuestos han reaccionado con la amina aromática del cromógeno se presenta una coloración rosada, la cual es directamente proporcional a la concentración de ROMs. La absorbancia fue cuantificada con el fotómetro 5010 V5+ (Robert Riele Kg) a una longitud de onda de 546 nm al término de la incubación. La concentración de ROMs fue estimada a partir de la absorbancia de la solución estándar (plasma humano) incluida en el kit.

Se calculó la concentración de proteínas en sangre debido a que los hidroperóxidos del plasma producen radicales alcoxilo ($R-O^{\bullet}$) y peroxilo ($R-OO^{\bullet}$) en presencia del hierro liberado por las proteínas plasmáticas por acción del reactivo ácido y, estos radicales a su vez, pueden oxidar la amina aromática del cromógeno. Esto nos permitió conocer la cantidad de sustrato disponible para dichas reacciones. La cuantificación de proteínas se llevó a cabo por duplicado con el método de Bradford (Bradford 1976), para el cual se consideró un volumen de muestra de 0.1 μ l. La curva estándar se realizó por medio de albúmina de suero bovino a una concentración de 1 mg/ml. Tanto para la cuantificación de ROMs como de proteínas se incluyó como control interno la muestra de plasma de dos individuos de gallina, obtenida siguiendo el mismo protocolo ocupado para las muestras de las crías de azulejo garganta azul. La interacción entre el colorante y las proteínas de la muestra produce una coloración azul cuya absorbancia fue cuantificada por medio del fotómetro Stat Fax 303 Plus (Awareness Technologies Inc.) a 630 nm. Por lo tanto, la estimación de ROMs fue expresada como mg H_2O_2 /mg proteínas.

La capacidad antioxidante total (TAC por sus siglas en inglés) de los individuos fue evaluada por medio del kit QuantiChrom™ Antioxidant Assay Kit (BioAssay Systems), la cual es una prueba colorimétrica que reduce el Cu^{+2} a Cu^{+} por acción de los antioxidantes, produciendo una solución de color azul intenso a violeta. La densidad óptica de esta reacción fue medida a una longitud de onda de 570 nm usando el fotómetro Multiskan FC plate reader (Thermo Scientific), previa incubación a temperatura ambiente por 10 minutos. El volumen de muestra utilizado fue de 10 μ l (por duplicado). La curva estándar se realizó por medio de Trolox 1 mM (antioxidante análogo a la vitamina E) y en los ensayos se incluyó una muestra de gallina como control interno. La cuantificación de la capacidad antioxidante también fue corregida en base a la cantidad de proteínas en la muestra, ya que el ensayo considera todo agente reductor presente, entre los que puede contarse aminoácidos como cisteína, cistina, triptófano y tirosina y, por lo tanto, es adecuado cuantificar las proteínas contenidas. La TAC fue expresada como mM de equivalentes Trolox/mg de proteínas.

La identificación del sexo de las crías de azulejo garganta azul se realizó por medio de la amplificación por PCR de dos genes CHD (chromo-helicase-DNA-binding por sus siglas en inglés). El gen CHD-W se encuentra ligado al cromosoma sexual W presente en las

hembras (ZW), mientras que el gen CHD-Z se encuentra en ambos sexos (ZZ para machos). Los primers que se utilizaron para dicha técnica fueron 2550F (5'-GTTACTGATTCGTCTACGAGA-3') y 2718R (5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3') a una concentración de 10 μ M (Fridolfsson y Ellegren 1999). La amplificación de los genes se llevó a cabo en el termociclador GeneAmp PCR system 2700 usando 2 μ l de ADN por reacción, obteniendo un volumen final de 10 μ l. Las condiciones de ciclado fueron 4.5 minutos a 94°C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 49°C, 45 segundos a 72°C y 10 minutos a 72°C. Para la determinación del sexo, se analizaron los productos de la PCR de cada gen por electroforesis, en un gel de agarosa al 2% por 30 minutos a 90 V, este procedimiento revela una sola banda para los machos y dos bandas para las hembras (Fridolfsson y Ellegren 1999).

Análisis estadísticos

Para confirmar que las crías focales de diferente talla y peso fueron distribuidas de forma equitativa entre los dos tratamientos experimentales, se compararon las medidas morfométricas de las crías asignadas a ambos grupos obtenidas antes del inicio del tratamiento (a la edad de 5 días) por medio modelos lineales generalizados mixtos (GLMMs por sus siglas en inglés). En estos tres GLMMs se incluyó la longitud del pico, la longitud del tarso y la masa de los pollos como variables dependientes y el tratamiento (factor con dos niveles, experimental o control) como variable independiente y se asumió una distribución de errores tipo normal. En estos GLMMs se incluyó la identidad de la caja nido como un factor aleatorio, ya que las medidas de crecimiento de las crías hermanas que fueron incluidas en los tratamientos experimentales no son datos independientes. Además, confirmamos que un número similar de machos y hembras fueron asignados aleatoriamente a cada tratamiento experimental (ver la sección de resultados más abajo).

Para examinar si la inyección de PHA influye en el crecimiento de los pollos se usaron GLMMs donde se incluyó el cambio en la longitud del pico, la longitud del tarso y el peso corporal entre los 8 y 11 días, 8 y 14 días y 8 y 17 días de edad como variables dependientes (un GLMM por cada medida morfométrica y por cada intervalo de edades). En estos GLMMs se asumió una distribución de errores tipo normal y se incluyó la identidad de la caja nido

como un factor aleatorio. Se incluyó como variable independiente el tratamiento y como covariables la presencia de ayudantes (factor con dos niveles, presencia o ausencia de ayudantes), el sexo de cada cría focal (factor con dos niveles), el tamaño de la nidada y la fecha de eclosión. La presencia (o ausencia) de ayudantes de crianza fue incluida en estos GLMMs porque los ayudantes participan en la alimentación de los pollos y la defensa del nido (Dickinson y cols. 1996, Dickinson y Akre 1998) y su contribución al desarrollo de la descendencia podría alterar la magnitud o la dirección del efecto de la activación de la respuesta inmunitaria en los atributos evaluados. En todos estos GLMMs se incluyó además la interacción tratamiento \times presencia de ayudantes, así como la interacción tratamiento \times sexo.

Para validar las estimaciones de ROMs (12 tandas) y proteínas (7 tandas), se calculó el coeficiente de variación (CV) intra-ensayo (muestras de las crías focales) e inter-ensayo (muestras de gallina). El CV intra-ensayo para la cuantificación de proteínas fue igual a 2.56% y para la concentración de ROMs en plasma fue de 6.20%, mientras que el CV inter-ensayo para la cuantificación de proteínas fue igual a 5.09% y para la cuantificación de hidroperóxidos en plasma fue 8.37%, lo que sugiere que hay una alta repetibilidad en las estimaciones de estos parámetros. Los datos obtenidos de la concentración de ROMs en plasma (mg de H₂O₂/mg de proteína) se transformaron a logaritmo natural para evitar la sobredispersión de los mismos.

Para evaluar si la variación entre ensayos influye en la estimación de la concentración de ROMs, se usó un GLMM con distribución de errores tipo normal en el que se incluyó la concentración de ROMs como variable dependiente, el número de la prueba como variable independiente y la identidad del nido como factor aleatorio. La estimación del nivel de daño oxidante de una cría perteneciente al grupo experimental fue excluida de este análisis porque presentaba un valor anormalmente alto en comparación con el resto de las crías de ese mismo grupo (13 veces mayor). El número de ensayo influyó en la estimación de daño oxidante aun cuando este dato extremo fue eliminado del análisis ($\beta=0.10 \pm 0.03$, $t=2.89$, $p=0.006$), por lo tanto, el número de ensayo se incluyó como factor aleatorio en los análisis subsiguientes.

Para examinar cómo la activación del sistema inmune influye en el nivel de daño oxidante en plasma, se utilizó un GLMM con distribución de errores tipo normal en el que

se incluyó la concentración de hidroperóxidos como variable dependiente y la identidad de la caja y el número de ensayo como factores aleatorios. En este GLMM se incluyó el tratamiento como variable independiente y la presencia de ayudantes, el sexo de las crías, el tamaño de la nidada, la condición corporal inicial del individuo (estimada como los residuales de la regresión entre la longitud del tarso y la masa a la edad de 5 días) y la fecha de eclosión como covariables. Además, se incluyó la interacción tratamiento \times presencia de ayudantes y la interacción tratamiento \times sexo.

De la misma forma, se calculó el CV intra- e inter- ensayo para la cuantificación de la TAC en plasma (2 tandas). Tanto el CV intra como inter-ensayo fue igual a 3%. De la misma forma que para el análisis del daño oxidante, la concentración de Trolox en plasma (mM de equivalentes Trolox/mg proteínas) fue convertida a logaritmo natural. Se evaluó si la variación entre ensayos podría afectar la estimación de la TAC, por lo que se analizó la relación entre la estimación de la concentración de equivalentes de Trolox y el número de ensayo, incluyendo la identidad del nido como factor aleatorio en un GLMM con distribución normal. La variación entre ensayos para estimar la capacidad antioxidante en plasma resultó no ser estadísticamente significativa ($\beta=0.01 \pm 0.17$, $t=0.10$, $p=0.91$). Por consiguiente, el número de ensayo no fue considerado como un factor en los análisis subsiguientes de la TAC.

Se utilizó un GLMM con distribución de errores tipo normal para evaluar cómo la activación del sistema inmune influye en la capacidad antioxidante en plasma, incluyendo la concentración de equivalentes de Trolox como variable dependiente, el factor tratamiento como variable independiente y la identidad de la caja como un factor aleatorio. Además, se incluyó la presencia de ayudantes, el sexo de las crías focales, el tamaño de la nidada, la condición corporal inicial y la fecha de eclosión como covariables, así como la interacción tratamiento \times presencia de ayudantes y la interacción tratamiento \times sexo.

La supervivencia al emplumado se codificó como una variable binaria en la que se asignó el valor de 1 a los registros donde la cría focal estaba presente y viva en su nido natal a los 14 días de edad (presencia) y el valor de 0 a los registros donde la cría estaba presente pero muerta en su nido natal o estaba ausente a dicha edad (ausencia). Para examinar si la activación de la respuesta inmunitaria influye en la probabilidad de supervivencia al emplumado, se utilizó un GLMM con una distribución de errores tipo binomial y una función

de enlace *logit* en el que se incluyó la presencia/ausencia del individuo focal a los 14 días de edad como variable dependiente, el tratamiento experimental como variable independiente y la identidad de la caja como variable de efecto aleatorio. Se incluyó además la condición corporal inicial, el sexo de las crías focales, el tamaño de la nidada y la fecha de eclosión como covariables, así como la interacción tratamiento \times sexo. La fecha de eclosión fue estandarizada, restando la fecha de eclosión de cada cría menos la media de las fechas de eclosión de la temporada y dividiendo esta diferencia entre la desviación estándar de todas las fechas de eclosión, de la para asegurar la convergencia del modelo. La influencia de la presencia de ayudantes en el nido se probó en un modelo separado porque su inclusión no permitía la convergencia del modelo. La supervivencia de las crías no estuvo determinada por esta variable ($\beta = 55.89 \pm 249.28$, $z = 0.224$, $p = 0.82$), por lo que no fue incluida en el modelo subsecuente. La interacción tratamiento \times presencia de ayudantes no fue incluida, pues no se logró la convergencia del modelo.

Se realizó una simplificación secuencial de modelos eliminando primero las interacciones y los términos principales no significativos ($p > 0.05$). Para comparar el modelo simplificado con el modelo que incluía un término no significativo se usaron pruebas de χ^2 (*i. e.* comparación de likelihood ratios; Crawley 2012). Todos los análisis estadísticos se hicieron en el software de cómputo estadístico R (R Core Team 2015) versión 3.3.1. Los resultados son reportados como la media y el error estándar (EE) de los coeficientes estimados de los términos principales y de las interacciones de interés que fueron incluidas en los modelos.

RESULTADOS

De las 54 cajas nido que fueron ocupadas por los azulejos garganta azul en 2015, 34 fueron incluidas en el estudio. El resto de las cajas ocupadas fueron depredadas, solo tenían un pollo o los pollos murieron por razones no determinadas. Seis de las cajas incluidas en el estudio presentaron ayudantes de crianza, los cuales pudieron haber influido en el crecimiento de 19 de pollos focales (11 incluidos en el grupo control y 8 en el grupo experimental). En total, 104 pollos eclosionaron en las cajas nido incluidas en el estudio, 94 de estos pollos (90.38%) sobrevivieron hasta los 14 días de edad, la edad que consideramos como edad de emplumado

en este estudio (apéndice 2). Se incluyó un número similar de machos y hembras en cada tratamiento experimental: 25 machos fueron incluidos en el grupo experimental y 26 en el grupo control, mientras que 28 hembras fueron incluidas en el grupo experimental y 25 en el grupo control.

Tasa de crecimiento

Las medidas de pico, tarso y peso corporal no fueron estadísticamente diferentes entre los pollos incluidos en el grupo control (sin reto inmunitario) y los pollos incluidos en el grupo experimental (sujetos al reto inmunitario con PHA) antes del inicio del experimento (tabla 2, figura 7). En promedio, las crías macho presentaron tarsos y picos más largos que las crías hembra: la longitud del tarso fue de 12.48 ± 3.32 mm y 11.68 ± 2.55 mm en machos y hembras, respectivamente, y la longitud de pico fue de 6.90 ± 1.62 mm y de 6.69 ± 1.27 mm en machos y hembras, respectivamente. Estas pequeñas diferencias sexuales en la longitud del tarso y del pico fueron estadísticamente significativas (tabla 2; figura 8).

El cambio en las medidas de pico, tarso y peso corporal entre los 8 y 11 días de edad, entre los 8 y 14 días de edad y entre los 8 y 17 días de edad no fue estadísticamente diferente entre las crías asignadas al grupo control y las crías asignadas al grupo experimental después de la manipulación (tabla 3, figura 9). La presencia de ayudantes, el tamaño de la nidada, la fecha de eclosión y las interacciones tratamiento \times presencia de ayudantes y tratamiento \times sexo no influyeron en el crecimiento de ninguna de las medidas morfométricas en ninguna categoría de edad (tabla 3).

Tabla 2. Resultados de tres Modelos Lineales Generalizados Mixtos (GLMMs) utilizados para comparar las medidas morfométricas de 51 crías de azulejo garganta azul (*Sialia mexicana*) asignadas a un tratamiento control (inyección de búfer salino de fosfato) y 53 crías asignadas a un tratamiento experimental (reto inmunitario inducido por una inyección de fitohemaglutinina) antes de la manipulación, a la edad de 5 días. La identidad de la caja nido fue incluida como una variable de efecto aleatorio en estos GLMM.

(n= 104 pollos)	Longitud del pico			Longitud del tarso			Masa		
	Coefficiente ± EE	X ²	p	Coefficiente ± EE	X ²	p	Coefficiente ± EE	X ²	p
Tratamiento	-0.03 ± 0.10	0.09	0.75	0.01 ± 0.20	0.002	0.96	0.04 ± 0.31	0.02	0.87
Sexo de la cría	0.23 ± 0.12	3.71	0.05	0.70 ± 0.23	8.40	0.003	0.67 ± 0.37	3.17	0.07

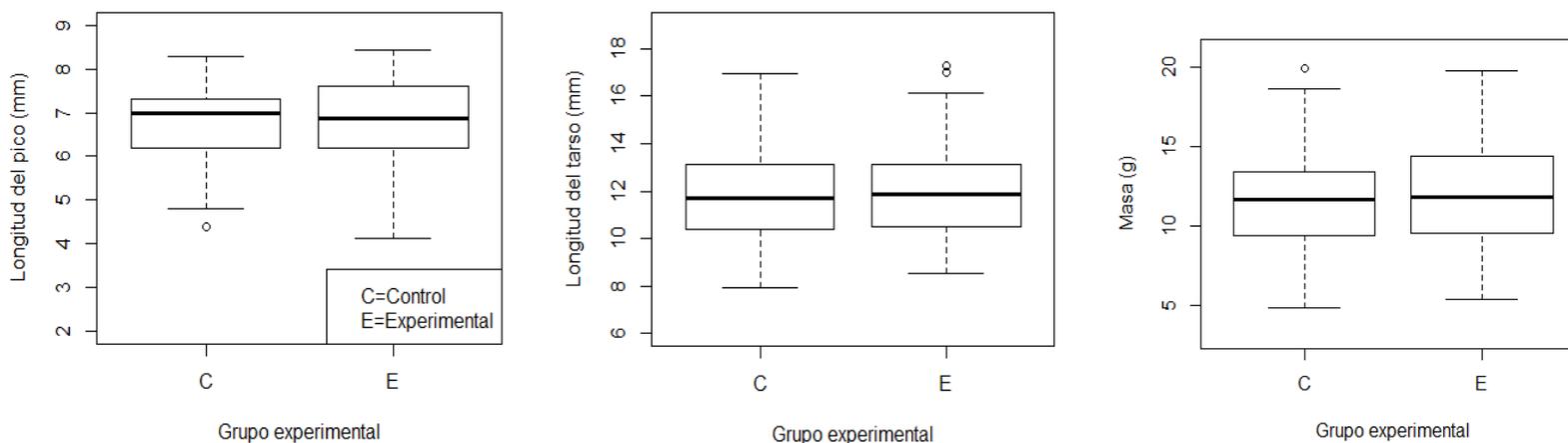


Figura 7. Medidas morfométricas de 53 crías incluidas en el grupo experimental y 51 crías incluidas en el grupo control a la edad de 5 días, antes de a la manipulación experimental.

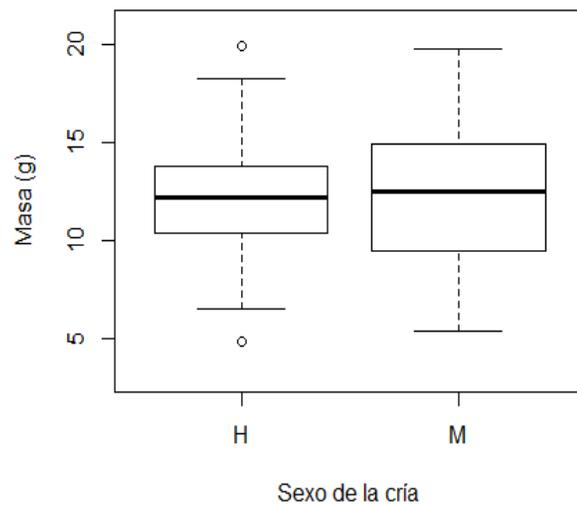
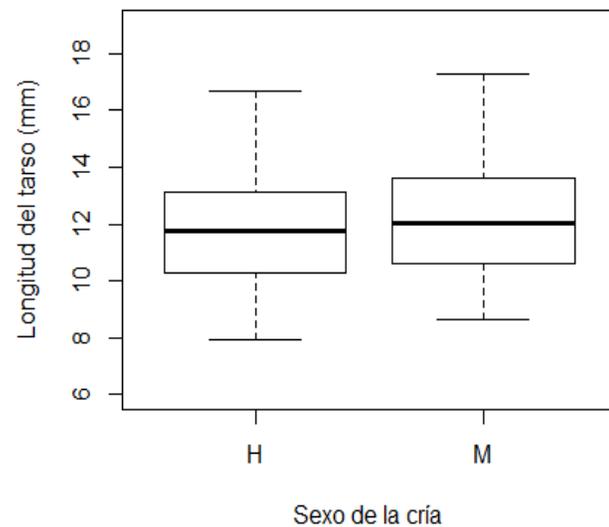
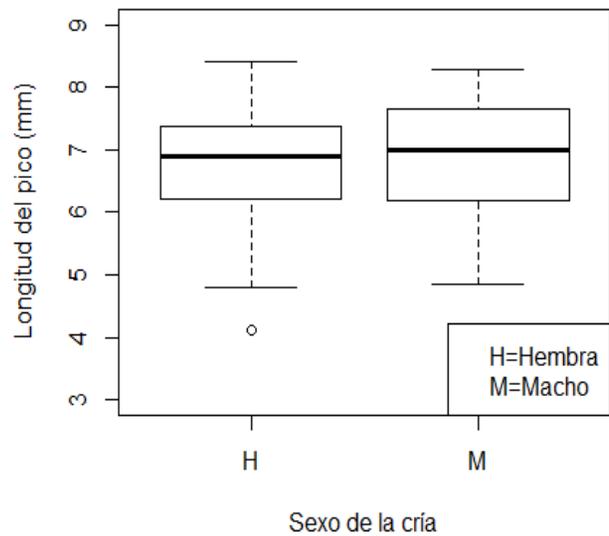


Figura 8. Medidas morfométricas de 51 crías macho y 53 crías hembra de azulejos garganta azul a la edad de 5 días, antes de a la manipulación experimental.

Tabla 3. Resultados de tres Modelos Lineales Generalizados Mixtos (GLMMs) utilizados para comparar el cambio en las medidas de pico, tarso y peso corporal entre los 8 y 11 días de edad, entre los 8 y 14 días de edad y entre los 8 y 17 días de edad entre 51 crías de azulejo garganta azul (*Sialia mexicana*) incluidas en el grupo control (inyección de búfer salino de fosfato) y 53 crías incluidas en el grupo experimental (reto inmunitario inducido por una inyección de fitohemaglutinina). La identidad de la caja nido fue incluida como una variable de efecto aleatorio en estos GLMM.

Intervalo de edad	Cambio en la longitud del pico			Cambio en la longitud del tarso			Cambio en la masa		
	Coefficiente ± EE	χ^2	<i>P</i>	Coefficiente ± EE	χ^2	<i>P</i>	Coefficiente ± EE	χ^2	<i>p</i>
8-11 días (n= 76 pollos)									
Tratamiento	0.13 ± 0.10	1.71	0.19	-0.08 ± 0.27	0.10	0.74	0.12 ± 0.61	0.04	0.83
Presencia de ayudantes	0.16 ± 0.23	0.50	0.47	0.15 ± 0.62	0.06	0.79	1.38 ± 1.15	1.47	0.22
Sexo de la cría	0.009 ± 0.12	0.005	0.94	-0.001 ± 0.32	0.00001	0.99	-0.24 ± 0.70	0.12	0.72
Tamaño de la nidada	0.05 ± 0.11	0.24	0.61	-0.05 ± 0.28	0.04	0.83	0.007 ± 0.54	0.0002	0.98
Fecha de eclosión	0.01 ± 0.01	1.47	0.22	0.007 ± 0.03	0.07	0.78	0.03 ± 0.05	0.47	0.49
Tratamiento: Sexo de la cría	0.19 ± 0.24	0.70	0.39	0.38 ± 0.64	0.39	0.52	1.36 ± 1.39	1.03	0.30
Tratamiento: Presencia de ayudantes	-0.04 ± 0.25	0.03	0.84	0.22 ± 0.66	0.13	0.71	-0.92 ± 1.47	0.43	0.51
8-14 días (n= 94 pollos)									
Tratamiento	0.05 ± 0.11	0.22	0.63	0.09 ± 0.22	0.16	0.68	-0.21 ± 0.65	0.10	0.74
Presencia de ayudantes	0.50 ± 0.31	2.50	0.11	0.22 ± 0.74	0.09	0.75	0.37 ± 1.23	0.09	0.75
Sexo de la cría	0.14 ± 0.12	1.22	0.26	-0.22 ± 0.26	0.76	0.38	-0.49 ± 0.72	0.48	0.48
Tamaño de la nidada	0.04 ± 0.15	0.08	0.76	0.02 ± 0.34	0.004	0.94	-0.14 ± 0.59	0.06	0.79
Fecha de eclosión	0.01 ± 0.01	2.10	0.14	0.01 ± 0.03	0.21	0.64	0.008 ± 0.05	0.02	0.87
Tratamiento: Sexo de la cría	-0.11 ± 0.25	0.19	0.65	0.50 ± 0.52	1.00	0.31	1.81 ± 1.45	1.65	0.19
Tratamiento: Presencia de ayudantes	-0.21 ± 0.28	0.61	0.43	-0.05 ± 0.57	0.01	0.91	-1.32 ± 1.66	0.68	0.40
8-17 días (n= 81 pollos)									
Tratamiento	-0.05 ± 0.12	0.15	0.69	-0.21 ± 0.24	0.82	0.36	-0.23 ± 0.67	0.11	0.72
Presencia de ayudantes	0.39 ± 0.38	1.07	0.29	0.32 ± 0.82	0.15	0.69	0.70 ± 1.66	0.18	0.66
Sexo de la cría	-0.04 ± 0.15	0.07	0.77	-0.25 ± 0.29	0.78	0.37	-0.11 ± 0.79	0.02	0.88
Tamaño de la nidada	-0.01 ± 0.17	0.005	0.94	0.05 ± 0.37	0.02	0.87	-0.01 ± 0.77	0.0002	0.98
Fecha de eclosión	0.01 ± 0.01	0.98	0.32	0.01 ± 0.03	0.14	0.70	0.04 ± 0.06	0.45	0.49
Tratamiento: Sexo de la cría	-0.25 ± 0.29	1.02	0.32	0.59 ± 0.55	1.23	0.26	2.14 ± 1.51	2.14	0.14
Tratamiento: Presencia de ayudantes	-0.20 ± 0.34	0.39	0.52	0.42 ± 0.64	0.48	0.48	-0.88 ± 1.80	0.24	0.60

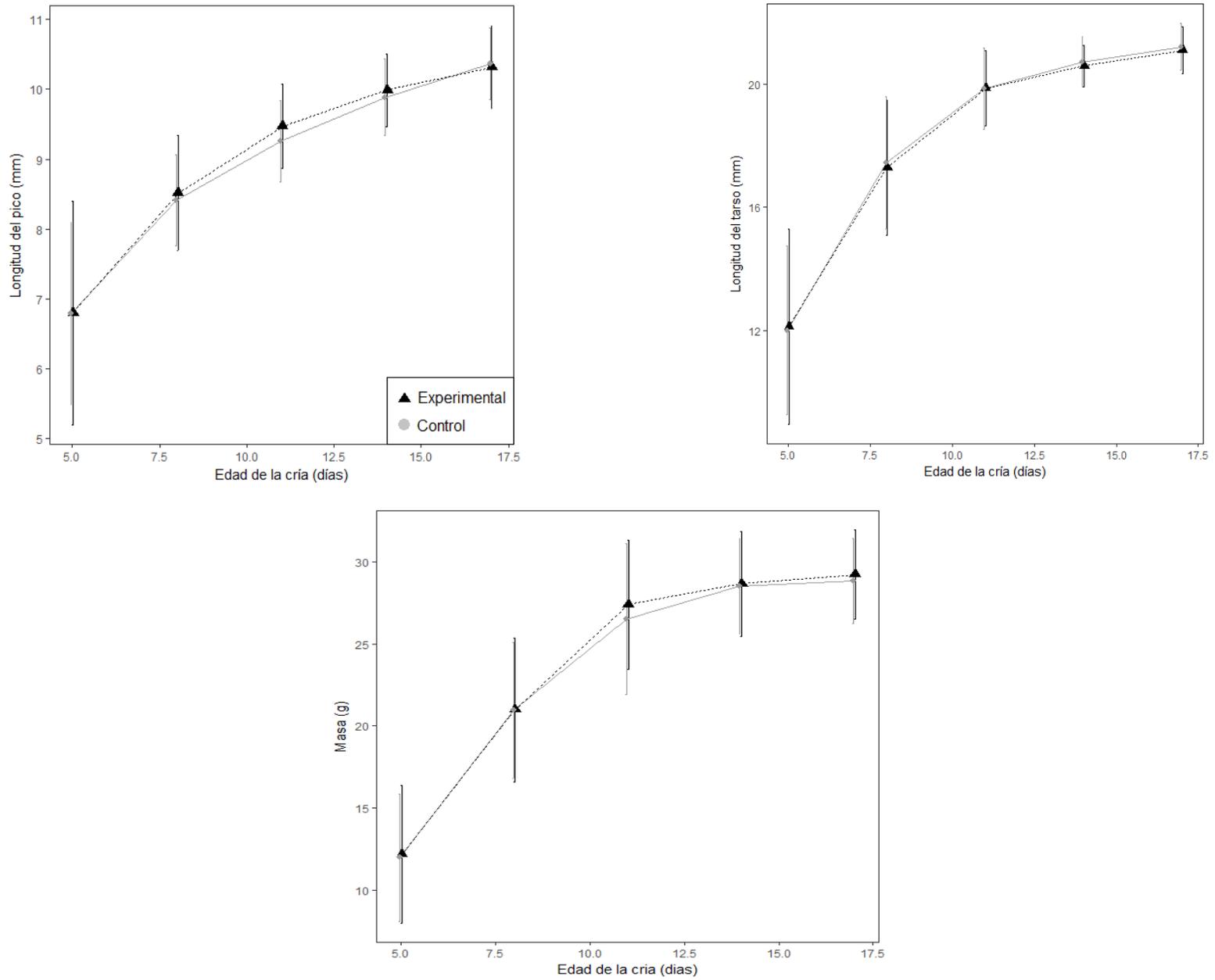


Figura 9. Cambio en las medidas morfométricas de las 51 crías de azulejo garganta azul incluidas en el grupo control (línea gris) y 53 crías incluidas en el grupo experimental (línea negra) a las edades de 5, 8, 11, 14 y 17 días.

Daño oxidante

El incremento en la concentración de hidroperóxidos en plasma entre los 8 y 14 días de edad no fue estadísticamente diferente entre las crías a las que se les activó experimentalmente el sistema inmune con PHA y aquellas crías asignadas al grupo control (tabla 4, figura 10). La interacción tratamiento \times presencia de ayudantes en el nido fue estadísticamente significativa: los pollos incluidos en el grupo experimental provenientes de nidos con ayudantes presentaron una concentración de hidroperóxidos en plasma 19% mayor que la que mostraron los pollos experimentales de nidadas sin ayudantes de crianza, pero las crías del grupo control con ayudantes y sin ayudantes en el nido no mostraron diferencias entre sí en la concentración de ROMs en plasma, ni tampoco presentaron niveles de ROMs estadísticamente diferentes a los que presentaron las crías experimentales sin ayudantes (tabla 4, figura 10). El sexo de las crías, la condición corporal inicial, el tamaño de la nidada, la fecha de eclosión y la presencia de ayudantes de crianza no influyeron en la concentración de hidroperóxidos en plasma (tabla 4).

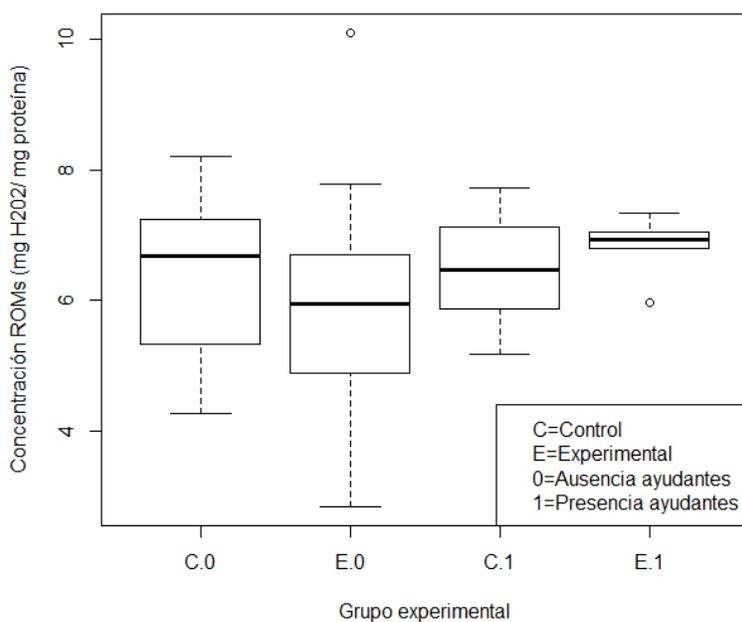


Figura 10. Concentración de daño oxidante en plasma de las crías de azulejo garganta azul incluidas en el grupo control (n = 32 crías) y el grupo experimental (n = 34 crías) en presencia o ausencia de ayudantes de crianza.

Tabla 4. Resultados de un Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM) utilizado para comparar la concentración de metabolitos reactivos del oxígeno entre los 8 y 14 días de edad entre 32 crías de azulejo garganta azul (*Sialia mexicana*) incluidas en el grupo control (inyección de búfer salino de fosfato) y 34 crías incluidas en el grupo experimental (reto inmunitario inducido por una inyección de fitohemaglutinina). La identidad de la caja nido fue incluida como una variable de efecto aleatorio en este GLMM.

(n= 66)	Coefficiente \pm EE	χ^2	P
Tratamiento	-0.09 \pm 0.20	0.17	0.67
Presencia de ayudantes	0.39 \pm 0.51	0.59	0.44
Sexo de la cría	-0.01 \pm 0.23	0.006	0.93
Tamaño de nidada	0.17 \pm 0.23	0.53	0.46
Condición inicial de la cría	0.03 \pm 0.11	0.08	0.76
Fecha de eclosión	-0.01 \pm 0.02	0.14	0.70
Tratamiento: Sexo de la cría	-0.46 \pm 0.54	0.72	0.39
Tratamiento: Presencia de ayudantes	1.23 \pm 0.51	5.23	0.02

Capacidad antioxidante total

El cambio en la concentración de equivalentes de Trolox en plasma (un indicador de la capacidad antioxidante) entre el día 8 y el día 14 de edad no fue estadísticamente diferente entre los pollos asignados al grupo control y aquellos sometidos al reto inmunitario con PHA (tabla 5). La presencia de ayudantes en el nido, el sexo de las crías, la condición corporal inicial, la fecha de eclosión y el tamaño de nidada no influyeron en la capacidad antioxidante de las crías. Las interacciones tratamiento \times ayudantes y tratamiento \times sexo no fueron estadísticamente significativas (tabla 5).

Tabla 5. Resultados de un Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM) utilizado para comparar la capacidad antioxidante total entre los 8 y a 14 días de edad entre 37 crías de azulejo garganta azul (*Sialia mexicana*) incluidas en el grupo control (inyección de búfer salino de fosfato) y 38 crías incluidas en el grupo experimental (reto inmunitario inducido por una inyección de fitohemaglutinina). La identidad de la caja nido fue incluida como una variable de efecto aleatorio en este GLMM.

(n= 75)	Coefficiente \pm EE	χ^2	P
Tratamiento	-0.27 \pm 0.12	2.26	0.13
Presencia de ayudantes	0.14 \pm 0.20	0.51	0.47
Fecha de eclosión	-0.008 \pm 0.008	0.95	0.32
Condición inicial de la cría	-0.07 \pm 0.07	0.98	0.32
Tamaño de nidada	-0.05 \pm 0.12	0.21	0.64
Sexo de la cría	0.09 \pm 0.18	0.29	0.58
Tratamiento: Sexo de la cría	-0.13 \pm 0.36	0.15	0.69
Tratamiento: Presencia de ayudantes	0.66 \pm 0.42	2.73	0.09

Acortamiento de telómeros

La tasa de acortamiento de los telómeros entre los 5 y 14 días de edad de las crías asignadas a ambos grupos experimentales no pudo ser estimada debido a que la cuantificación de la longitud telomérica requiere de la calibración con un gen unicopia como control interno, y la estimación de este no logró establecerse de forma precisa por dificultades técnicas. En consecuencia, no contamos con resultados relacionados con este parámetro fisiológico. En el apéndice 1 se encuentran los detalles de la técnica empleada y los resultados parciales obtenidos.

Supervivencia al emplumado

De las 51 crías que se incluyeron en el grupo control, cuatro murieron (7.83%), *i. e.* no fueron encontradas en su nido natal a los 14 días de edad. Mientras que, de las 53 crías pertenecientes al grupo experimental, cinco perecieron (9.43%; figura 11). La probabilidad de supervivencia al emplumado no fue estadísticamente diferente entre las crías sometidas experimentalmente al reto inmunitario con PHA y aquellas crías asignadas al grupo control (tabla 6). Asimismo, la condición corporal inicial (a la edad de 5 días), el sexo de las crías, el tamaño de la nidada y la fecha de eclosión no se relacionaron con la probabilidad de supervivencia de los pollos al emplumado (tabla 6). La interacción tratamiento \times sexo no fue estadísticamente significativa (tabla 6).

Tabla 6. Resultados de un Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM) utilizado para comparar la probabilidad de supervivencia al emplumado entre 51 crías de azulejo garganta azul (*Sialia mexicana*) incluidas en el grupo control (inyección de búfer salino de fosfato) y 53 crías incluidas en el grupo experimental (reto inmunitario inducido por una inyección de fitohemaglutinina). La identidad de la caja nido fue incluida como una variable de efecto aleatorio en este GLMM.

(n= 104)	Coefficiente \pm EE	X^2	<i>P</i>
Tratamiento	-0.31 \pm 1.34	0.05	0.81
Sexo de la cría	3.871 \pm 3.72	1.63	0.20
Tamaño de nidada	-0.46 \pm 2.04	0.05	0.82
Condición inicial de la cría	-0.03 \pm 0.91	0.11	0.73
Fecha de eclosión	0.04 \pm 1.45	0.0007	0.97
Tratamiento: Sexo de la cría	-3.16 \pm 4.22	0.62	0.43

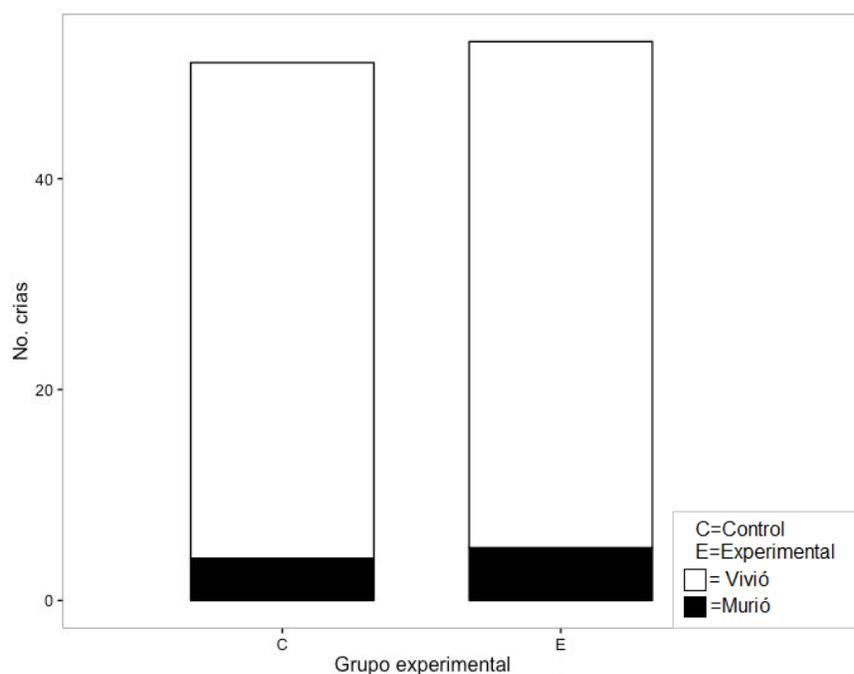


Figura 11. Proporción de crías de azulejo garganta azul incluidas en el grupo control (n = 51 crías) y el grupo experimental (n = 53 crías) que sobrevivieron y no sobrevivieron hasta al emplumado (*i. e.* a la edad de 14 días).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Este estudio experimental arrojó dos resultados principales. Primero, la activación de la respuesta inmunitaria de las crías de azulejo garganta azul a la edad de 8 días por medio de una inyección de PHA no comprometió la tasa de crecimiento, ni dio lugar a incrementos en los niveles de daño oxidante ni a reducciones en la capacidad antioxidante y en la probabilidad de supervivencia al emplumado. Por otro lado, las crías sometidas al reto inmunitario con PHA provenientes de nidos con ayudantes de crianza mostraron niveles más altos de daño oxidante en plasma que las crías retadas inmunitariamente y que no contaron con la presencia de ayudantes en el nido, y que las crías pertenecientes al grupo control procedentes de nidos con ayudantes y sin ayudantes de crianza.

En cada nidada focal, las crías retadas inmunitariamente mostraron una tasa de crecimiento similar a la de las crías que no fueron retadas inmunitariamente. Este resultado sugiere que la inyección de PHA podría no haber tenido un impacto en el crecimiento, probablemente porque montar una respuesta inmunitaria contra el mitógeno no implica un

costo energético muy alto, como parece ocurrir en el carbonero común (*Parus major*; Hõrak y cols. 2000). Es posible también que el crecimiento no se vea comprometido por la activación de la respuesta inmunitaria si la talla al emplumado es un atributo canalizado en esta población (Duckworth 2006). El tamaño corporal al emplumado tiene implicaciones importantes para la adecuación de las aves, ya que se correlaciona positivamente con la probabilidad de supervivencia antes y después de la madurez sexual, como se ha visto en el avión común (*Delichon urbica*) y el piquero de Nazca (*Sula granti*; Christe y cols. 2001, Maness y Anderson 2013, respectivamente), así como con la fecundidad en hembras y el éxito reproductivo en machos (Amundsen y cols. 1997, Barbraud 2000, van Dijk y cols. 2015). En el azulejo garganta azul, el tamaño corporal es crucial para la selección de pareja, defensa del nido y estrategias de forrajeo, pues se ha encontrado que las hembras de azulejo de las montañas (*Sialia currucoides*) tienen una ganancia de masa mayor antes de la puesta probablemente como un mecanismo de prevención por si la disponibilidad de recursos baja (Merkle y Barclay 1996), además de que machos de azulejo garganta azul con tarsos y colas más largos tienen una mayor eficiencia en el forrajeo en áreas abiertas (Duckworth 2006). Por lo tanto, no encontrar una disminución en la tasa de crecimiento de las crías retadas con PHA podría sugerir que, a pesar de las variaciones ambientales que experimenten los individuos de esta especie, pueden ser capaces de alcanzar la talla óptima para abandonar el nido.

La ausencia de efecto de la aplicación del reto inmunitario en el crecimiento podría derivar también de un ajuste en el cuidado parental en respuesta a la estimulación del sistema inmune de la progenie. Por ejemplo, los padres podrían aumentar sus tasas de alimentación o incrementar su esfuerzo para buscar alimentos de alta calidad nutricional y contrarrestar así los impactos de una posible enfermedad en su progenie, como se ha documentado en crías de carbonero garrapinos (*Parus palustris*) y en el herrerillo común (*Parus caeruleus*; Nilsson 2003 y Bañbura y cols. 2004, respectivamente). Si este último fuera el caso, los pollos inyectados con PHA podrían haber recibido más presas o presas de mayor calidad nutricional que las crías que no fueron retadas inmunitariamente y, de esta manera, podrían haber activado su respuesta inmunitaria sin comprometer los recursos que requieren para crecer. Sin embargo, no tenemos datos que nos permitan evaluar si los adultos de *Sialia mexicana* podrían responder de forma similar cuando el sistema inmune de su progenie está siendo

comprometido. Tampoco contamos con observaciones que nos permitan evaluar si la aplicación de PHA podría inducir cambios conductuales en las crías que pudieran inducir ajustes en el cuidado parental. Datos de campo adicionales en esta población son necesarios también para investigar si el posible impacto de la activación de la respuesta inmunitaria en el crecimiento solo es evidente cuando las crías son obligadas a activar su respuesta inmune bajo condiciones de escasez de alimento o cuando están expuestas a otras condiciones adversas (Brzęk y Konarzeski 2007).

Alternativamente, la ausencia de un impacto de la inyección de PHA en el crecimiento de las crías de azulejo podría atribuirse a que la PHA no logró activar la respuesta inmunitaria de las crías, o a que esta manipulación podría haber generado una respuesta muy ligera que no fue suficiente para comprometer otras funciones. La aplicación de este reto pudo haber tenido lugar a una edad en la que aún no se encontraba completamente maduro el sistema inmune de los azulejos. No contamos con datos que nos permitan estimar la edad a la que madura el sistema inmunitario en las crías de azulejos, aunque algunos estudios en otras especies de aves paserinas, como la golondrina bicolor (*Tachycineta bicolor*), encontraron que las crías alcanzan niveles de linfocitos semejantes a los que presentan los adultos hasta la edad de 18 días pos-eclosión (Palacios y cols. 2009). Sin embargo, se han reportado incrementos en los niveles de heterófilos y linfocitos en respuesta a la PHA desde los 8 días de edad en el carbonero común (*Parus major*; Hõrak y cols. 2000), lo que sugiere que las crías de especies de aves similares al azulejo pueden montar una respuesta inmunitaria a una edad temprana. De manera que, aun cuando la respuesta inmune adquirida de los azulejos podría no haber estado desarrollada por completo en la primera semana de vida, al menos la respuesta inmunitaria innata podría haberlo estado y haber sido activada por la PHA, como lo sugiere el incremento de los ROMs en crías retadas con el mitógeno provenientes de nidos con ayudantes de crianza.

Una explicación adicional a este resultado negativo es que la dosis de PHA empleada no haya sido la adecuada para inducir una respuesta en nuestro modelo de estudio. Nosotros definimos la dosis de PHA que suministramos a los azulejos a los 8 días de edad con base en la dosis utilizada por Smits y cols. (1999) en crías de golondrina bicolor, las cuales a esa misma edad presentan un peso similar al de las crías de azulejo (15 gramos para crías de

golondrina bicolor y 20 gramos para crías de azulejo). Sin embargo, en estudios posteriores, sería necesario hacer una estimación de la dosis de PHA adecuada para estimular una respuesta inmunitaria en crías de diferente edad. Esto último puede hacerse partiendo de una dosis recomendada por la literatura y continuar con una curva dosis-respuesta que permita determinar la cantidad idónea de mitógeno para activar el sistema inmune.

Nuestros análisis de crecimiento también sugieren que la inyección de PHA no indujo crecimiento compensatorio en los azulejos. Los procesos fisiológicos que promueven un crecimiento acelerado en un periodo de tiempo corto pueden dar lugar a incrementos en la producción de agentes oxidantes y, por lo tanto, a altos niveles de daño oxidante (Alonso-Álvarez y cols. 2007, Geiger y cols. 2011). De haber ocurrido un ajuste en los programas de desarrollo de las crías de azulejo en respuesta a la inyección de PHA que les permitiera crecer rápido y alcanzar una talla similar a la de las crías que no fueron retadas inmunitariamente, esperaríamos que estos ajustes se vieran reflejados en una mayor concentración de hidroperóxidos en plasma. Sin embargo, los niveles de daño oxidante y la capacidad antioxidante no difirieron entre las crías retadas con PHA y las crías que no fueron sometidas a dicho reto, por lo que puede descartarse la posibilidad de que la ausencia de diferencias en las tasas de crecimiento de crías retadas y no retadas inmunitariamente en nuestro estudio se deba a un proceso de compensación en las crías inyectadas con PHA.

La activación experimental de la respuesta inmunitaria podría promover daño en las biomoléculas al producir un desbalance entre la producción de ROMs y la capacidad de la defensa antioxidante de los organismos para neutralizarlos (Costantini y Møller 2009). Esto se ha encontrado en individuos adultos y juveniles en diferentes estudios experimentales y correlativos (Costantini y Dell’Omo 2006, van de Crommenacker y cols. 2011, Isaksson y cols. 2013, van Rooyen y cols. 2013). La acción rápida de la PHA podría promover la producción de agentes oxidantes como consecuencia de un incremento en la tasa metabólica y la actividad citotóxica de las células de defensa y la neutralización de estos agentes oxidantes debería darse de forma inmediata para evitar el daño en las biomoléculas (Costantini y Møller 2009). Sin embargo, la aplicación de PHA no influyó en los niveles de daño oxidante ni en la capacidad antioxidante de las crías de los azulejos garganta azul, lo que parece aportar evidencia adicional a la hipótesis de que nuestra manipulación no indujo

la activación de la respuesta inmunitaria, como sugerimos anteriormente. Aunque la ausencia de diferencias en el nivel de daño oxidante y la capacidad antioxidante entre crías retadas y no retadas con PHA podría también indicar que los azulejos de esta población son capaces de obtener una buena cantidad de antioxidantes de su dieta. En las crías de otras especies de paserinos como el herrerillo común (*Parus caeruleus*) y el carbonero común (*Parus major*), los antioxidantes obtenidos de la dieta podrían ser suficientes para contrarrestar el efecto de los compuestos oxidantes (Biard y cols. 2009). Durante la temporada reproductiva, los azulejos garganta azul se alimentan principalmente de insectos como saltamontes, polillas, orugas, escarabajos y hormigas (Jorgensen 2006), los cuales suelen ser una fuente importante de agentes antioxidantes como carotenoides y α -tocoferol (Arnold y cols. 2010). Estudios experimentales posteriores podrían examinar si el impacto de diferentes retos inmunitarios en el balance oxidante-antioxidante podría ser mitigado por un ajuste en la dieta de estos azulejos. Asimismo, la mediación del estrés oxidante por medio de diferentes técnicas (*i. e.* producción de radicales libre, daño a lípidos y proteínas, concentración de ácido úrico y triglicéridos) podría evidenciar posibles efectos que no fueron explorados en este trabajo.

La probabilidad de supervivencia al emplumado en crías de *Sialia mexicana* no se vio afectada por la aplicación de PHA en la primera semana de vida. Se esperaba que el aumento en la tasa metabólica promoviera la producción de ROMs (hidroperóxidos) como consecuencia de la activación de la respuesta inmunitaria y que, dicho incremento, acelerara el deterioro celular y afectara la tasa de acortamiento de los telómeros (Beaulieu y cols. 2011). Al no haber un impacto de la activación de la respuesta inmunitaria por PHA en el balance oxidante ni en la supervivencia al emplumado, se podría inferir que el reto con PHA no influyó en la tasa de acortamiento de telómeros. La tasa de acortamiento de los telómeros es utilizada como un predictor de la supervivencia en aves juveniles y adultas (Heidinger y cols. 2012, Barrett y cols. 2013) y puede ser afectada por incrementos en los niveles de daño oxidante (Oikawa y cols. 2001). Es necesario estimar la longitud y dinámica de acortamiento de telómeros en estudios posteriores para confirmar si la activación de la respuesta inmunitaria puede afectar o no estas estructuras en los azulejos. Desafortunadamente, algunas dificultades técnicas nos impidieron incorporar la estimación de este importante parámetro fisiológico en este trabajo.

Una consideración importante que rebasa los objetivos de este estudio es que los costos de la activación de la respuesta inmunitaria durante el desarrollo temprano podrían ser evidentes en etapas más avanzadas de la vida de los individuos. Experimentar condiciones de estrés durante la infancia podría afectar negativamente las probabilidades de reclutamiento y supervivencia durante la adultez (Lindström 1999). Diversos estudios en vertebrados e invertebrados, principalmente en condiciones controladas, sugieren que los impactos de experimentar condiciones adversas en el desarrollo temprano pueden tener repercusiones importantes para la adecuación (Koella y Boëte 2002, Auer 2010, Bleu y cols. 2012, Ancona y Drummond 2013). Aunque varios estudios en poblaciones silvestres también sugieren que las aves podrían experimentar ajustes en sus trayectorias de desarrollo cuando están expuestas a algunas condiciones adversas y estos ajustes podrían amortiguar los impactos de un desarrollo temprano pobre en su supervivencia o su éxito reproductivo de por vida (Drummond y Ancona 2015).

Por otro lado, nuestros análisis indican que las crías sometidas al reto inmunitario provenientes de nidadas con ayudantes de crianza presentan una mayor concentración de hidroperóxidos en plasma que las crías sometidas al mismo reto inmunitario pero que fueron criadas sin ayudantes en el nido. Este resultado podría deberse a que los pollos criados por más de dos adultos reciben más alimento (Dickinson y cols. 1996) o que la presencia de ayudantes permite a los padres buscar alimentos de mejor calidad nutricional que favorecen el desarrollo de su progenie (Nilsson 2003, Bañbura y cols. 2004). Estos nutrimentos adicionales podrían permitir a las crías retadas con PHA desplegar una respuesta inmunitaria óptima sin comprometer la asignación de recursos hacia el crecimiento u otros aspectos fundamentales de su desarrollo, pero al mismo tiempo, podría derivar en un incremento en los niveles de agentes oxidantes porque la respuesta inmunitaria podría ser más intensa, como se ha visto en pollos de rabilargo (*Cyanopica cyanus*) y golondrina ribereña (*Riparia riparia*; Valencia y cols. 2006, Brzęk y Konarzewski 2007). Una respuesta inmunitaria más intensa podría dar lugar a una mayor producción de ROMs debido a la energía invertida en la proliferación de células inmunes y a la liberación de radicales libres, la cual les confiere su actividad citotóxica. Si este último fuera el caso, la respuesta inmunitaria sería más intensa en crías retadas con PHA que crecieron con ayudantes que en aquellas crías retadas inmunitariamente pero que crecieron sin ellos. Una comparación formal de la intensidad de

la respuesta inmunitaria de crías provenientes de nidadas con ayudantes y sin ayudantes sería necesaria para confirmar esta hipótesis. Además, conocer la intensidad de la respuesta montada permitiría establecer si una respuesta inmunitaria más intensa promueve compromisos más acentuados entre diferentes rasgos, así como niveles más altos de daño oxidante, valiéndose de herramientas como la estimación por medio de la prueba de la piel (Smits y cols. 1999), concentración de proteínas plasmáticas asociadas a infecciones (Tella y cols. 2008), análisis inmunológicos como hemaglutinación y hemólisis (Matson y cols. 2005) o pruebas histológicas (Martin y cols. 2006, Vinkler y cols. 2014). Asimismo, un incremento en el tamaño de muestra para los análisis de estrés oxidante podría reforzar nuestro hallazgo pues, a pesar de que el tamaño de efecto de nuestro resultado es de valor medio, solo se incluyeron 13 crías provenientes de nidos con ayudantes y de las cuales cinco fueron retadas con PHA.

En conclusión, la aplicación del reto inmunitario con PHA no tuvo un impacto directo en el crecimiento, niveles de estrés oxidante y probabilidad de supervivencia al emplumado en las crías de azulejo. Sin embargo, el incremento en la concentración de hidroperóxidos en crías sometidas al reto inmunitario provenientes de nidos con ayudantes sugiere que el efecto de la PHA depende de la presencia de ayudantes de crianza en el nido. Los ayudantes podrían estar proveyendo alimentos adicionales a las crías o permitiendo que los padres tengan más tiempo para buscar alimentos de mejor calidad. Sin embargo, el efecto de la presencia de estos en diferentes parámetros fisiológicos de las crías debe ser explorado más adelante, lo cual podría convertirse en una línea de investigación fructífera. Asimismo, el seguimiento de las crías retadas inmunitariamente durante su vida adulta podría evidenciar los efectos de largo plazo en su adecuación, o bien, podría revelar si estas aves son resistentes al estrés experimentado durante el desarrollo temprano, como se ha encontrado en otras especies de aves silvestres (Honarmand y cols. 2010, Cartwright y cols. 2014).

REFERENCIAS

Alonso-Alvarez C., Bertrand S., Faivre B., Sorci G. 2007. Increased susceptibility to oxidative damage as a cost of accelerated somatic growth in zebra finches. *Functional Ecology* 21: 873-879.

- Amundsen T., Forsgren E., Hansen L. T. 1997. On the function of female ornaments: male bluethroats prefer colourful females. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 264: 1579-1586.
- Ancona S., y Drummond H. 2013. Life history plasticity of a tropical seabird in response to El Niño anomalies during early life. *PloS one* 8: e72665.
- Arnold K. E., Ramsay S. L., Henderson L., Larcombe S. D. 2010. Seasonal variation in diet quality: antioxidants, invertebrates and blue tits *Cyanistes caeruleus*. *Biological Journal of the Linnean Society* 99: 708-717.
- Arriero E., Majewska A., Martin T. E. 2013. Ontogeny of constitutive immunity: maternal vs. endogenous influences. *Functional Ecology* 27: 472-478.
- Asghar M., Hasselquist D., Hansson B., Zehndjiev P., Westerdahl H., Bensch S. 2015. Hidden costs of infection: chronic malaria accelerates telomere degradation and senescence in wild birds. *Science* 347: 436-438.
- Auer S. K. 2010. Phenotypic plasticity in adult life-history strategies compensates for a poor start in life in Trinidadian guppies (*Poecilia reticulata*). *The American Naturalist* 176: 818-829.
- Auer S. K., Arendt J. D., Chandramouli R., Reznick D. N. 2010. Juvenile compensatory growth has negative consequences for reproduction in Trinidadian guppies (*Poecilia reticulata*). *Ecology Letters* 13: 998-1007.
- Baich P. J. y Harrison C. J. O. 2005. Nests, eggs, and nestlings of North American birds (p. 480). Princeton, NJ: Princeton University Press.
- Bañbura J., Perret P., Blondel J., Thomas D. W., Cartan-Son M., Lambrechts M. M. 2004 Effects of *Protocalliphora* parasites on nestling food composition in Corsican Blue Tits *Parus caeruleus*: consequences for nestling performance. *Acta Ornithologica* 39: 93-103.
- Barbraud C. 2000. Natural selection on body size traits in a long-lived bird, the snow petrel *Pagodroma nivea*. *Journal of Evolutionary Biology* 13: 81-88.
- Barrett E. L., Boner W., Mulder E., Monaghan P., Verhulst S., Richardson D. S. 2012. Absolute standards as a useful addition to the avian quantitative PCR telomere assay. *Journal of Avian Biology* 43: 571-576.
- Barrett E. L., Burke T. A., Hammers M., Komdeur J., Richardson D. S. 2013. Telomere length and dynamics predict mortality in a wild longitudinal study. *Molecular Ecology* 22: 249-259.
- Beamonte-Barrientos R., y Verhulst S. 2013. Plasma reactive oxygen metabolites and non-enzymatic antioxidant capacity are not affected by an acute increase of metabolic rate in zebra finches. *Journal of Comparative Physiology B* 183: 675-683.

- Beaulieu M., Reichert S., Le Maho Y., Ancel A., Criscuolo F. 2011. Oxidative status and telomere length in a long-lived bird facing a costly reproductive event. *Functional Ecology* 25:577-585.
- Biard C., Surai P. F., Møller, A. P. 2006. Carotenoid availability in diet and phenotype of blue and great tit nestlings. *Journal of Experimental Biology* 209: 1004-1015.
- Birkhead T. R., Fletcher F., Pellatt E. J. 1999. Nestling diet, secondary sexual traits and fitness in the zebra finch. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 266: 385-390.
- Bize P., Criscuolo F., Metcalfe N. B., Nasir L., Monaghan P. 2009. Telomere dynamics rather than age predict life expectancy in the wild. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 276: 1679-1683.
- Bleu J., Massot M., Haussy C., Meylan S. 2011. Experimental litter size reduction reveals costs of gestation and delayed effects on offspring in a viviparous lizard. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, rspb20110966.
- Boonekamp J. J., Mulder G. A., Salomons H. M., Dijkstra C., Verhulst S. 2014. Nestling telomere shortening, but not telomere length, reflects developmental stress and predicts survival in wild birds. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 281: 20133287.
- Bourke C. D., Maizels R. M., Mutapi F. 2011 Acquired immune heterogeneity and its sources in human helminth infection. *Parasitology* 138: 139-159.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72: 248-254.
- Brommer J. E. 2004. Immunocompetence and its costs during development: an experimental study in blue tit nestlings. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 271: S110-S113.
- Brzęk P., y Konarzewski M. 2007. Relationship between avian growth rate and immune response depends on food availability. *Journal of Experimental Biology* 210: 2361-2367.
- Carleton R. E., Mertins J. W., Yabsley M. J. 2012. Parasites and pathogens of eastern bluebirds (*Sialia sialis*): A field survey of a population nesting within a grass-dominated agricultural habitat in Georgia, USA, with a review of previous records. *Comparative Parasitology* 79: 30-43.
- Cartwright S. J., Nicoll M. A., Jones C. G., Tatayah V., Norris K. 2014. Anthropogenic natal environmental effects on life histories in a wild bird population. *Current Biology* 24: 536-540.

- Charmantier A., Keyser A. J., Promislow D. E. L. 2007. First evidence for heritable variation in cooperative breeding behaviour. *Proceedings of The Royal Society Biological Sciences* 274:1757-1761.
- Charmantier A., Kruuk L. E., Lambrechts M. M. 2004. Parasitism reduces the potential for evolution in a wild bird population. *Evolution* 58: 203-206.
- Christe P., De Lope F., González G., Saino N., Møller A. P. 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 A. P., de Lope F. 1998. Immunocompetence and nestling survival in the house martin: the tasty chick hypothesis. *Oikos* 83: 175-179.
- Chylinski C., Boag B., Stear M. J., Cattadori I. M. 2009. Effects of host characteristics and parasite intensity on growth and fecundity of *Trichostrongylus retortaeformis* infections in rabbits. *Parasitology* 136: 117-123.
- Costantini D. y Dell'Omo G. 2006. Effects of T-cell-mediated immune response on avian oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 145: 137-142.
- Costantini D. y Møller A. P. 2009. Does immune response cause oxidative stress in birds? A meta-analysis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 153: 339-344.
- Crawley M. J. 2012. *The R book*. John Wiley & Sons.
- Criscuolo F., Bize P., Nasir L., Metcalfe N. B., Foote C. G., Griffiths K., Gault E. A., Monaghan P. 2009. Real-time quantitative PCR assay for measurement of avian telomeres. *Journal of Avian Biology* 40: 342-347.
- Cuatianquiz-Lima C. y Macías-García C. 2016. Pre-and post-experimental manipulation assessments confirm the increase in number of birds due to the addition of nest boxes. *PeerJ* 4: e1806.
- De Block M. y R. Stoks. 2008. Compensatory growth and oxidative stress in a damselfly. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 275: 781-785.
- Demas G. E., Zysling D. A., Beechler B. R., Muehlenbein M. P., French S. S. 2011. Beyond phytohaemagglutinin: assessing vertebrate immune function across ecological contexts. *Journal of Animal Ecology* 80: 710-730.
- Descamps S., Boutin S., Berteaux D., Gaillard J. M. 2006. Best squirrels trade a long life for an early reproduction. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 273: 2369-2374.
- Dickinson J. L. y Akre J. J. 1998. Extrapair paternity, inclusive fitness, and within-group benefits of helping in western bluebirds. *Molecular Ecology* 7: 95-105.

Dickinson J. L., Koenig W. D., Pitelka F. A. 1996. Fitness consequences of helping behavior in the western bluebird. *Behavioral Ecology* 7: 168-177.

van Dijk R. E., Robles R., Groothuis T. G., Vries B., Eising C. M. 2015. Reproductive effort of both male and female Bar-throated Apalis *Apalis thoracica* is predicted by ornamentation of self and mate. *Ibis* 157: 731-742.

Duckworth R. A. 2006. Aggressive behaviour affects selection on morphology by influencing settlement patterns in a passerine bird. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 273: 1789-1795.

Duckworth R. A. y Badyaev A. V. 2007. Coupling of dispersal and aggression facilitates the rapid range expansion of a passerine bird. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 15017-15022.

Drummond H. y Ancona S. 2015. Observational field studies reveal wild birds responding to early-life stresses with resilience, plasticity, and intergenerational effects. *The Auk* 132: 563-576.

Einum S. y Fleming I.A. 2000 Selection against late emergence and small offspring in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Evolution* 54: 628-639.

Finkel T. y Holbrook N. J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239-247.

Fridolfsson A. K. y Ellegren H. 1999. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of Avian Biology* 30: 116-121.

Gaona I. 2014. Historia natural del azulejo (*Sialia mexicana*) en el Parque Nacional La Malinche (PNLM): sistema de apareamiento y crianza (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. México.

Geiger S., Le Vaillant M., Lebard T., Reichert S., Stier A., Le Maho Y., Criscuolo F. 2012. Catching-up but telomere loss: half-opening the black box of growth and ageing trade-off in wild king penguin chicks. *Molecular Ecology* 21: 1500-1510.

Germaine H. L. y Germaine S. S. 2002. Forest restoration treatment effects on the nesting success of Western Bluebirds (*Sialia mexicana*). *Restoration Ecology* 10: 362-367.

Gluckman P. D. y Hanson M. A. 2004. Developmental origins of disease paradigm: a mechanistic and evolutionary perspective. *Pediatric Research* 56: 311-317.

Gluckman P. D., Hanson M. A., Spencer H. G., Bateson P. 2005. Environmental influences during development and their later consequences for health and disease: implications for the interpretation of empirical studies. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 272: 671-677.

Gorman H. E. y Nager R. G. 2004. Prenatal developmental conditions have long-term effects on offspring fecundity. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 271: 1923–1928.

Groothuis T. G., Müller W., von Engelhardt N., Carere C., Eising C. 2005. Maternal hormones as a tool to adjust offspring phenotype in avian species. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 29: 329-352.

Hakkarainen H. y Korpimäki E. 1994 Does feeding effort of Tengmalm's owls reflect offspring survival prospects in cyclic food conditions? *Oecologia* 97: 209–214.

Hall M. E., Nasir L., Daunt F., Gault E. A., Croxall J. P., Wanless S., Monaghan P. 2004. Telomere loss in relation to age and early environment in long-lived birds. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 271: 1571-1576.

Hasselquist D., y Nilsson J. Å. 2012. Physiological mechanisms mediating costs of immune responses: what can we learn from studies of birds? *Animal Behaviour* 83: 1303-1312.

Hausmann M. F., Winkler D. W., Vleck C. M. 2005. Longer telomeres associated with higher survival in birds. *Biology Letters* 1: 212-214.

Hayward A. D. 2011. Parasites and life history variation in a wild mammal (Tesis de doctorado). Universidad de Edimburgo.

Heidinger B. J., Blount J. D., Boner W., Griffiths K., Metcalfe N. B., Monaghan P. 2012. Telomere length in early life predicts lifespan. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 1743-1748.

Honarmand M., Goymann W., Naguib M. 2010. Stressful dieting: nutritional conditions but not compensatory growth elevate corticosterone levels in zebra finch nestlings and fledglings. *PLoS One* 5: e12930.

Hörak P., Ots I., Tegelmann L., Møller A. P. 2000. Health impact of phytohaemagglutinin-induced immune challenge on great tit (*Parus major*) nestlings. *Canadian Journal of Zoology* 78: 905-910.

Isaksson C., Sepil I., Baramidze V., Sheldon B. C. 2013. Explaining variance of avian malaria infection in the wild: the importance of host density, habitat, individual life-history and oxidative stress. *BMC Ecology* 13: 15-25.

Jennings B. J., Ozanne S. E., Dorling M. W., Hales C. N. 1999. Early growth determines longevity in male rats and may be related to telomere shortening in the kidney. *FEBS letters* 448: 4-8.

Jorgensen J. 2006. Life History Endangered, Threatened, and Sensitive Species of Fishlake National Forest. [En línea]. Disponible en:
https://www.fs.usda.gov/Internet/FSE_DOCUMENTS/fsm9_019843.pdf

Kaiser P., Kaspers B., Schat K. A. (Eds.) 2014. Avian Immunology. Segunda edición. Academic Press.

Klasing K. C. 2004. The cost of immunity. *Acta Zoológica Sinica* 50: 961-969.

Koella J. C. y Boëte C. 2002. A genetic correlation between age at pupation and melanization immune response of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Evolution* 56: 1074-1079.

Krause E. T. y Naguib M. 2011. Compensatory growth affects exploratory behaviour in zebra finches, *Taeniopygia guttata*. *Animal Behaviour* 81: 1295-1300.

Lindström J. 1999. Early development and fitness in birds and mammals. *Trends in Ecology & Evolution* 14: 343-348.

López-Rull I., Celis P., Salaberria C., Puerta M., Gil D. 2011. Post-fledging recruitment in relation to nestling plasma testosterone and immunocompetence in the spotless starling. *Functional Ecology* 25: 500-508.

Maddox J. D. y Weatherhead P. J. 2008. Egg size variation in birds with asynchronous hatching: is bigger really better? *The American Naturalist* 171: 358-365.

Maness T. J. y Anderson D. J. 2013. Predictors of juvenile survival in birds. *Ornithological Monographs* 78: 1-55.

Martin L. B., Han P., Lewittes J., Kuhlman J. R., Klasing K. C., Wikelski M. 2006. Phytohemagglutinin-induced skin swelling in birds: histological support for a classic immunoeological technique. *Functional Ecology* 20: 290-299.

Martin L. B., Scheuerlein A., Wikelski M. 2003. Immune activity elevates energy expenditure of house sparrows: a link between direct and indirect costs? *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 270: 153-158.

Matson K. D., Ricklefs R. E., Klasing K. C. 2005. A hemolysis–hemagglutination assay for characterizing constitutive innate humoral immunity in wild and domestic birds. *Developmental & Comparative Immunology* 29: 275-286.

McDade, T. W., Reyes-García, V., Tanner, S., Huanca, T., Leonard, W. R. 2008. Maintenance versus growth: investigating the costs of immune activation among children in lowland Bolivia. *American journal of physical anthropology* 136: 478-484.

McDonald P. G., Olsen P. D., Cockburn, A. 2005. Sex allocation and nestling survival in a dimorphic raptor: does size matter? *Behavioral Ecology* 16: 922-930.

Merino S., Møller A. P., De Lope F. 2000. Seasonal changes in cell-mediated immunocompetence and mass gain in nestling barn swallows: a parasite-mediated effect? *Oikos* 90: 327-332.

Merkle M. S. y Barclay R. M. 1996. Body mass variation in breeding mountain bluebirds *Sialia currucoides*: evidence of stress or adaptation for flight? *Journal of Animal Ecology* 65: 401-413.

- Metcalfé N. B. y Monaghan P. 2001. Compensation for a bad start: grow now, pay later? *Trends in Ecology & Evolution* 16: 254-260.
- Monaghan P. 2008. Early growth conditions, phenotypic development and environmental change. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363: 1635-1645.
- Monaghan P., Metcalfé N. B., Torres R. 2009. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology Letters* 12: 75-92.
- Mora J. O., Sánchez R., De Paredes B., Herrera M. G. 1981. Sex related effects of nutritional supplementation during pregnancy on fetal growth. *Early Human Development* 5: 243–251.
- Morgan I. J. y Metcalfé N. B. 2001. Deferred costs of compensatory growth after autumnal food shortage in juvenile salmon. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 268: 295-301.
- Mousseau T. A. y Fox C. W. 1998. The adaptive significance of maternal effects. *Trends in Ecology & Evolution* 13: 403-407.
- Nager R. G., Monaghan P., Griffiths R., Houston D. C., Dawson R. 1999. Experimental demonstration that offspring sex ratio varies with maternal condition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 570–573.
- Navarro C., Marzal A., De Lope F., Møller A. P. 2003. Dynamics of an immune response in house sparrows *Passer domesticus* in relation to time of day, body condition and blood parasite infection. *Oikos* 101: 291-298.
- Nilsson J. Å. (2003). Ectoparasitism in marsh tits: costs and functional explanations. *Behavioral Ecology* 14: 175-181.
- Norris K., y Evans M. R. 1999. Ecological immunology: life history trade-offs and immune defense in birds. *Behavioural Ecology* 11:19–26.
- Nussey D. H., Wilson A. J., Brommer J. E. 2007. The evolutionary ecology of individual phenotypic plasticity in wild populations. *Journal of Evolutionary Biology* 20: 831-844.
- O'Callaghan N, Dhillon V, Thomas P, Fenech M. 2008. A quantitative real-time PCR method for absolute telomere length. *Biotechniques* 44: 807-809.
- Oikawa S., Tada-Oikawa S., Kawanishi S. 2001. Site-specific DNA damage at the GGG sequence by UVA involves acceleration of telomere shortening. *Biochemistry* 40: 4763-4768.
- Owen J. P., Nelson A. C., Clayton D. H. 2010. Ecological immunology of bird-ectoparasite systems. *Trends in parasitology* 26: 530-539.
- Palacios M. G., Cunnick J. E., Vleck D., Vleck C. M. 2009. Ontogeny of innate and adaptive immune defense components in free-living tree swallows, *Tachycineta bicolor*. *Developmental & Comparative Immunology* 33: 456-463.

- Pihlaja M., Siitari H., Alatalo R. V. 2006. Maternal antibodies in a wild altricial bird: effects on offspring immunity, growth and survival. *Journal of Animal Ecology* 75: 1154-1164.
- Pravosudov V. V., Lavenex P., Omanska A. 2005. Nutritional deficits during early development affect hippocampal structure and spatial memory later in life. *Behavioral neuroscience* 119: 1368.
- Rauw W. M. 2012. Immune response from a resource allocation perspective. *Frontiers in Genetics* 3: 1-14.
- Reid J. M., Arcese P., Keller L. F. y Hasselquist D. 2006. Long-term maternal effect on offspring immune response in song sparrows *Melospiza melodia*. *Biology Letters* 2: 573-576.
- Richner H., Schneiter P., Stirnimann H. 1989. Life-history consequences of growth rate depression: an experimental study on carrion crows (*Corvus corone corone* L.). *Functional Ecology* 3: 617-624.
- Saino N., Calza S., Møller A. P. 1998. Effects of a dipteran ectoparasite on immune response and growth trade-offs in barn swallow, *Hirundo rustica*, nestlings. *Oikos*, 217-228.
- Saino N., Ferrari R. P., Romano M., Rubolini D., Moller A. P. 2003. Humoral immune response in relation to senescence, sex and sexual ornamentation in the barn swallow (*Hirundo rustica*). *Journal of Evolutionary Biology* 16: 1127-1134.
- Salomons H. M., Mulder G. V., van de Zande L., Haussmann M. F., Linskens M. H., Verhulst S. 2009. Telomere shortening and survival in free-living corvids. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 276: 3157-3165.
- Schneeberger K., Czirjak K. A., Voigt C. C. 2013. Inflammatory challenge increases measures of oxidative stress in a free-ranging, long-lived mammal. *Journal of Experimental Biology* 216: 4514-4519.
- Siefferman L., Hill G. E. 2005. UV-blue structural coloration and competition for nestboxes in male Eastern Bluebirds. *Animal Behaviour* 69: 67-72.
- Smith S. M., Nager R. G., Costantini D. 2016. Meta-analysis indicates that oxidative stress is both a constraint on and a cost of growth. *Ecology & Evolution* 6: 2833-2842.
- Smits J. E., Bortolotti G. R., Tella JL. 2002. Simplifying the phytohaemagglutinin skin-testing technique in studies of avian immunocompetence. *Functional Ecology* 13:567-572.
- Soler J. J., de Neve L., Pérez-Contreras T., Soler M., Sorci G. 2003. Trade-off between immunocompetence and growth in magpies: an experimental study. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 270: 241-248.
- Stambaugh T., Houdek B. J., Lombardo M. P., Thorpe P. A., Hahn D. C. 2011. Innate immune response development in nestling tree swallows. *Wilson Journal of Ornithology* 123: 779-787.

- Taborsky B. 2006. The influence of juvenile and adult environments on life-history trajectories. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 273: 741-750.
- Tella J. L., Lemus J. A., Carrete M., Blanco G. 2008. The PHA test reflects acquired T-cell mediated immunocompetence in birds. *PLoS One* 3: e3295.
- Thompson-Cowley L. L., Helfer D. H., Schmidt G. D., Eltzroth E. K. 1979. Acanthocephalan parasitism in the western bluebird (*Sialia mexicana*). *Avian diseases* 23: 768-771.
- Valencia J., Solís E., Sorci G., De La Cruz C. 2006. Positive correlation between helpers at nest and nestling immune response in a cooperative breeding bird. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 60: 399-404.
- van de Crommenacker J., Horrocks N. P., Versteegh M. A., Komdeur J., Tieleman B. I., Matson K. D. 2010. Effects of immune supplementation and immune challenge on oxidative status and physiology in a model bird: implications for ecologists. *Journal of Experimental Biology* 213: 3527-3535.
- van de Crommenacker J., Richardson D. S., Koltz A. M., Hutchings K., Komdeur J. 2011. Parasitic infection and oxidative status are associated and vary with breeding activity in the Seychelles warbler. In *Proceedings of the Royal Society B* (p. rspb20111865)
- van Rooyen J., Lalubin F., Glairot O., Christe P. 2013. Avian haemosporidian persistence and co-infection in great tits at the individual level. *Malaria Journal* 12: 40-47.
- Verboven N. y Visser M. E. 1998. Seasonal variation in local recruitment of great tits: the importance of being early. *Oikos* 81: 511-524.
- Vinkler M., Svobodová J., Gabrielová B., Bainová H., Bryjová A. 2014. Cytokine expression in phytohaemagglutinin-induced skin inflammation in a galliform bird. *Journal of Avian Biology* 45: 43-50.

APÉNDICE 1

Protocolo para la estimación de la longitud de telómeros

La cuantificación de la longitud de los telómeros es llevada a cabo por medio de PCR cuantitativa absoluta (qPCR) en tiempo real (Criscuolo y cols. 2009) empleando oligonucleótidos de tamaño y concentración conocidos para la amplificación de la región telomérica, así como de un gen unicopia como control interno, el gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa o GAPDH del pinzón cebra (*Taeniopygia guttata*), el cual permite la normalización de la cantidad de telómeros amplificados en una concentración de ADN conocida.

Los primers (Macrogen Inc.) para la amplificación de los télomeros utilizados para los azulejos de garganta azul fueron *Tel1b* y *Tel2b* en una concentración de 10 nM (tabla 1). La curva estándar fue hecha con base en diluciones seriadas 1:3 de búfer AE (Quiagen) y de los oligonucleótidos de télomeros (333 ng/μl). Los primers (Macrogen Inc.) utilizados para la amplificación del gen fueron *GAPDH-F* y *GAPDH-R* en una concentración de 10 nM (tabla 1).

La amplificación de télomeros y GAPDH se realizó en rondas independientes en el termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen) usando 2 ng de ADN por reacción. El volumen final fue de 10 μl, conteniendo 5 μl de Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen). Las condiciones de ciclado para cada PCR de télomeros fueron 5 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de 10 segundos a 95°C, 10 segundos a 45°C y 20 segundos a 70°C. Al completarse la PCR se realizó una curva de disociación por calentamiento (*melting*) con un rampeo de temperatura de 65°C-90°C (Barrett y cols. 2012), lo cual nos permitió verificar la identidad de los productos obtenidos.

Tabla 1. Secuencia de iniciadores y oligonucleótidos utilizados en la PCR cuantitativa en tiempo real para la estimación de la longitud de telómeros de crías azulejo garganta azul (*Sialia mexicana*).

Tipo de secuencia	Nombre	Secuencia	Referencia
Amplificación de telómeros			
Iniciador	<i>Tel1b</i>	5'-CGGTTTGTGGTTTGGGTTTGGGTTTGGTTTGGGTTTGGGTT-3'	Criscuolo y cols. 2009
Iniciador	<i>Tel2b</i>	5'-GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT-3'	Criscuolo y cols. 2009
Estándar	Telómero	84mer: TTAGGG repetido 14 veces	Barrett y cols. 2012
Amplificación del gene gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa			
Iniciador	GAPDH-F	5'- AAACCAGCCAAGTACGATGACAT-3'	Criscuolo y cols. 2009
Iniciador	GAPDH-R	5'- CCATCAGCAGCAGCCTTCA-3'	O'Callaghan y cols. 2008
Estándar	GAPDH	53mer: AAACCAGCCAAGTATGACGACATCAAGAGGGTAGTGAAGGCTGCTGCTGATGG	Barrett y cols. 2012

Se obtuvo la eficiencia de amplificación de cada corrida y los valores de C_t de los amplicones de cada muestra, los cuales indican el ciclo en el que la fluorescencia alcanza el valor umbral, es decir, el momento en el que se da un aumento exponencial de esta, y nos permiten obtener el coeficiente de determinación del ensayo (>0.99), la pendiente y el intercepto de la recta de los estándares. La cuantificación absoluta de la longitud telómerica fue hecha por triplicado para cada muestra y expresada en kilobases (Kb) la cual es corregida matemáticamente por el software con base en la eficiencia de la corrida en base a las siguientes fórmulas (Barrett y cols. 2012):

$$e = \left(10^{\left(\frac{1}{m}\right)} - 1\right) * 100$$

Donde:

e = Porcentaje de eficiencia de amplificación

m = Pendiente de la recta de la curva estándar

Longitud de telómeros corregida en base a la eficiencia de amplificación de la curva estándar vs muestra

$$X_0 = E_{AMP_s}^{b \log E_{AMP_s} (E_{AMP_s}) - C_{ts}}$$

Donde:

X_0 = Kilobases de telómero amplificadas, número de cromosomas diploides de GAPDH amplificadas.

s = Muestra

a = Curva estándar

C_{ts} = Valores de C_t de la curva estándar

$$E_{AMP} = 10^{\left(\frac{-1}{m}\right)}$$

b = Intercepto de la recta de la curva estándar

m = Pendiente de la recta de la curva estándar

Si bien la estimación de la longitud de telómeros fue montada exitosamente (tabla 2), la normalización con base al gen unicopia GAPDH no pudo concretarse, ya que las muestras no lograron entrar en la curva patrón pese a que se modificó la concentración de primers, ADN y ciclado de temperatura.

Tabla 2. Resultado de la estimación de la longitud de telómeros en kilobases (kb), por triplicado, de las muestras de crías de azulejo garganta azul a los 5 y 14 días de edad entre crías de azulejo garganta azul (*Sialia mexicana*) incluidas en el grupo control (inyección de búfer salino de fosfato) y crías incluidas en el grupo experimental (reto inmunitario inducido por una inyección de fitohemaglutinina).

Muestra	Ct 1	Longitud 1	Ct 2	Longitud 2	Ct 3	Longitud 3	Promedio Ct	Promedio longitud
T112X	10.52	2550107740	8.49	2598125556	8.4	2817552554	9.14	2655261949.83
T442P	7.96	4093280236	7.77	4839785013	9.87	4042238755	8.53	4325101334.69
T27T	10.44	2689650989	8.26	3154899556	8.09	3679847819	8.93	3174799454.71
T323X	10.57	2453497505	8.29	3079028051	9.5	2171652124	9.45	2568059226.71
T71X	10.1	3438131528	8.02	3897649936	7.98	4047250891	8.70	3794344118.38
T4C2P2T	9.83	4156911733	8.07	3720985406	7.11	8582197274	8.34	5486698137.29
T626T	9.95	3817493126	7.9	4319377955	8.54	2494188800	8.80	3543686626.85
T67X	10.39	2793803327	8.41	2773082795	7.98	4051519796	8.93	3206135306.20
T47X	9.77	4349721798	7.83	4609802163	7.99	4015954430	8.53	4325159463.76
T234T	9.84	4128590838	7.79	4778028911	7.99	3997522698	8.54	4301380815.76
T37X*	9.29	6075740029	7.42	6552273411	7.65	5351643187	8.12	5993218875.40
T130T	9.3	6043837007	6.88	1.0496E+10	7.99	3992927999	8.06	6844094475.63
T81X	9.85	4097725057	7.74	4984296941	8.08	3711013731	8.56	4264345243.15
T41X*	9.76	4368217785	7.64	5439026860	7.86	4489466345	8.42	4765570329.87
T33X	9.88	4003672957	8.24	3212257868	8.06	3782830529	8.73	3666253784.71
T331X	9.86	4076528680	8.11	3598932016	7.92	4251612156	8.63	3975690950.66
T434T*	10.37	2825817395	8.04	3828053213	9.29	2557329432	9.23	3070400013.35
T339T	9.81	4202894001	7.67	5275766044	7.97	4064743079	8.48	4514467708.22
T430T	10.16	3283406663	7.41	6637597751	8.14	3520470182	8.57	4480491531.95
T47T	10.58	2430089415	8.48	2628177719	8.36	2909758126	9.14	2656008420.16
T322X	10.06	3519727858	8.05	3789724994	7.94	4197763477	8.68	3835738776.48
T410T	9.85	4083261062	7.47	6284127456	8.68	2207302012	8.67	4191563509.81
T510T	10.35	2875318318	8.37	2876486203	9.18	2788149251	9.30	2846651257.12
T630T	7.98	4049190745	8.94	3343879511	9.21	2727566148	8.71	3373545467.83

T330T	6.46	1.5109E+10	7.14	1.3535E+10	7.29	1.2112E+10	6.96	13585448248.74
T222X	9.75	1787732988	9.99	2926868990	11.24	2577859417	10.33	2430820465.00
T13X	8.77	3818442863	9.61	3876213985	10.76	3652711255	9.71	3782456034.25
T426T	8.3	5519957145	9.24	5068442966	10.09	5970282017	9.21	5519560709.03
T61X	9.47	2233262511	10.12	2654000538	11	3064906233	10.20	2650723093.96
T326T*	7.89	7594511555	8.88	6621992241	9.91	6821148213	8.89	7012550669.68
T3C2P3	7.94	7304949770	8.77	7164185905	9.73	7791062961	8.81	7420066212.07
T228T	9.65	1940745429	NA	NA	10.99	3082499852	10.32	2511622640.75
T334T	9.06	3058117383	9.91	3093057336	10.79	3582806229	9.92	3244660316.20
T37P	8.47	4851171977	9.28	4916206067	10.59	4146434078	9.45	4637937373.95
T838T	8.79	3773004699	9.84	3258344994	10.76	3664295642	9.80	3565215111.46
T63X	9.16	2826452579	NA	NA	11.09	2877996289	10.13	2852224433.88
T428T	9.46	2246525225	10.31	2305554143	11.28	2491335110	10.35	2347804826.17
T21X	9.69	1873328609	NA	NA	NA	NA	9.69	1873328609.41
T239T	9.2	2750364999	10.08	2747430453	11	3077123746	10.09	2858306399.15
T57T	9.44	2274653379	10.28	2368277500	11.38	2316157734	10.37	2319696204.57
T639T	9.24	2658471578	10.05	2798892820	11.22	2612307740	10.17	2689890712.94
T77P	9.53	2116276698	9.93	3066170308	11.25	2562625869	10.24	2581690958.41
T31X	9.27	2592684258	10.21	2483210678	11.22	2606904922	10.23	2560933285.79
T7C2P2T	8.09	6501954578	8.96	6232191406	10.16	5695886547	9.07	6143344177.07
T142P	8.93	3377621888	9.81	3346717521	10.96	3157605221	9.90	3293981543.25
T2C2P3	8.36	5270906028	9.02	5940603131	10.18	5620090794	9.19	5610533317.44
T5C2P3	9.33	2484645727	9.82	3324638441	10.74	3727307571	9.96	3178863912.99
T51X	9.51	2149219504	NA	NA	11.25	2556287861	10.38	2352753682.84
T328T	9.35	2434623716	9.8	3368396051	10.86	3394769441	10.00	3065929736.07
T312X	8.97	3280216318	9.5	4180327731	11.02	3017009214	9.83	3492517754.36
T539T	9.69	1873971750	NA	NA	11.36	2349873689	10.53	2111922719.20
T242P	9.53	2130855142	NA	NA	11.16	2732712659	10.35	2431783900.71

T526T	9.4	2348236454	10.35	2242760930	NA	NA	9.88	2295498692.32
T37T	8.55	4544882292	9.27	4950462786	10.33	5033581110	9.38	4842975395.73
T326T	7.98	7081512903	8.47	8901185072	9.65	8236642625	8.70	8073113533.33
T642P	9.18	2787909999	10.1	2689695922	10.34	4988219026	9.87	3488608316.04
T542P	8.67	4144730642	9.53	4095973703	10.23	5409670971	9.48	4550125105.34
T6C2P3	9.2	2740234871	10.27	2374151194	11.14	2777448968	10.20	2630611677.57
T342P	8.95	3329848431	10.1	2704152066	10.93	3226802695	9.99	3086934397.05
T439T	9.33	2474857083	10.38	2199736725	11.35	2367491855	10.35	2347361887.57
T423X	9.76	1776721365	NA	NA	NA	NA	9.76	1776721364.92
T136P	7.7	8785807742	8.64	7853742557	9.75	7681147581	8.70	8106899293.57
T226T	8.35	5292207833	9.07	5751649906	10.23	5403964201	9.22	5482607313.22
T738T	8.99	3239375471	9.86	3223862318	10.85	3436784212	9.90	3300007333.71
T41X	8.59	4391900815	9.34	4711375949	10.73	3753576514	9.55	4285617759.15
T11X*	8.29	5569919192	8.86	6710238218	10.48	4478728147	9.21	5586295185.64
T6C2P2T	8.81	3711667549	9.81	3347397106	10.81	3529680298	9.81	3529581650.96
T128T	8.93	3370094277	10.22	2476162037	11.38	2330115326	10.18	2725457213.63
T27P	8.9	3470168760	9.61	3872909888	10.42	4711479597	9.64	4018186081.77
T47P	9.15	2841043027	10.01	2887205223	12.18	1288803245	10.45	2339017165.20
T134T	9.12	2914132375	NA	NA	11.15	2749403704	10.14	2831768039.69
T1C2P3	9.29	2563041610	9.84	3256493115	11.09	2882205352	10.07	2900580025.91
T212X	8.4	5111000174	9.05	5850587503	10.05	6141124525	9.17	5700904067.32
T223X	9.01	3177429223	9.63	3805715883	10.82	3496025730	9.82	3493056945.15
T5C2P2	7.35	1.1561E+10	8.75	7242873114	9.95	6619016062	8.68	8474368300.88
T230T	8.35	5313139766	9.13	5493241829	10.68	3893726409	9.39	4900036001.02
T131X	7.73	8586793446	8.34	9853893697	9.73	7816406512	8.60	8752364551.59
T126T*	8.53	4610087883	8.93	6375537886	10.15	5714878673	9.20	5566834814.06
T139T	9.77	3443074986	10.92	3259982331	9.9	3129443253	10.20	3277500190.01
T17P	9.05	5841092007	10.58	4169897471	9.12	5523438863	9.58	5178142780.17

T142T	9.46	4318887366	10.6	4130138602	10.06	2786305257	10.04	3745110408.28
T538T	10.4	2164382539	11.53	2083898035	NA	NA	10.97	2124140286.80
T530T	9.73	3534878405	10.91	3275369954	9.89	3156244210	10.18	3322164189.66
T3C2Pt2T	9.08	5708370915	10.3	5116607245	9.1	5610015517	9.49	5478331225.63
T231T	6.08	7839966864	8.9	9498237231	5.19	1.6344E+10	6.72	11227434024.29
T620T	7.23	3031216557	10.76	2426834756	6.94	3851805009	8.31	3103285440.55
T111T	5.12	1.7275E+10	8.81	1.0084E+10	5.24	1.5608E+10	6.39	14322463392.37
T531T	6.15	7379797738	9.96	4354289852	6.32	6397070544	7.48	6043719377.91
T236P	5.87	9312706664	8.97	8991670469	6.23	6906134235	7.02	8403503789.39
T129X	5.59	1.175E+10	8.5	1.2677E+10	6.1	7695184050	6.73	10707214057.14
T121X	5.35	1.4264E+10	8.58	1.1934E+10	5.32	1.4596E+10	6.42	13597999372.21
T420T	6.31	6490093652	9.36	6754367264	5.95	8707022279	7.21	7317161065.25
T520T	5.95	8692713618	9.33	6913537923	5.86	9353640630	7.05	8319964056.80
T231X	5.97	8599492961	9.06	8401812251	5.92	8932658600	6.98	8644654604.12
T229X	5.93	8825567792	9.37	6691729855	5.94	8804625984	7.08	8107307876.89
T436P	NA	NA	13.03	460583707	9.43	490441738	11.23	475512722.48
T442T	6.46	5725411039	9.8	4901625928	6.84	4165928556	7.70	4930988507.58
T729X	7.03	3569838036	10.12	3871677131	7.11	3351719271	8.09	3597744812.75
T611T	NA	NA	11.16	1807256118	NA	NA	11.16	1807256118.48
T431T	7.43	2572922392	10.67	2581479873	7.48	2459368276	8.53	2537923513.86
T210T	5.71	1.0591E+10	8.8	1.0194E+10	5.87	9275341248	6.79	10020326063.63
T731T	7.83	1841573242	10.87	2240242599	NA	NA	9.35	2040907920.57
T629X	6.5	5552305767	10.23	3562576281	10.18	3707448917	8.97	4274110321.86
T429X	5.6	1.1641E+10	8.88	9627619147	8.8	1.0155E+10	7.76	10474515993.74
T131T	6.28	6647337970	9.46	6274315476	9.46	6267964663	8.40	6396539369.67
T421X*	6.74	4539555197	10.26	3491993972	10.61	2709845550	9.20	3580464906.20
T311T	7.07	3466970412	10.84	2278129141	10.81	2329076939	9.57	2691392163.80
T636P	NA	NA	9.63	5531189565	10.18	3698149314	9.91	4614669439.02

T831T	6.99	3682481201	NA	NA	10.45	3032117925	8.72	3357299562.89
T531X	NA	NA	NA	NA	11.3	1630684641	11.30	1630684640.70
T120T	5.97	8552476699	9.71	5212704990	9.48	6202547319	8.39	6655909669.19
T211T	7.03	3580291194	10.73	2483420885	9.49	6146521001	9.08	4070077693.40
T431X	6.91	3947291365	10.67	2585247178	10.88	2212645054	9.49	2915061199.14
T411T	6.61	5048057391	9.95	4382780545	10.06	4051049312	8.87	4493962416.04
T43X	7.25	2968178437	10.59	2736319054	NA	NA	8.92	2852248745.80
T628T	7.18	3156142462	11.05	1963582306	10.86	2258100037	9.70	2459274934.93
T534T	7.15	3228478069	NA	NA	10.8	2358891010	8.98	2793684539.05
T1C2P2T	6.26	6734148127	10.16	3772592906	9.69	5315267568	8.70	5274002867.07
T528T	7.43	2556051217	10.88	2214617798	10.87	2236434416	9.73	2335701143.67
T438T	6.26	6742768032	9.59	5699041187	9.33	6886425897	8.39	6442745038.58
T638T	6.36	6213869489	10	4229812508	9.91	4526587653	8.76	4990089883.71
T238T	7.07	3455584902	10.28	3447579269	NA	NA	8.68	3451582085.12
T57X	6.94	3837752793	10.8	2352021116	NA	NA	8.87	3094886954.12
T122X	6.85	4133320945	10.64	2647456668	NA	NA	8.75	3390388806.90
T138T	6.56	5274385268	9.97	4326860643	NA	NA	8.27	4800622955.28
T523X	7.05	3520600800	10.78	2391410515	NA	NA	8.92	2956005657.72
T412X	6.91	3946570086	10.76	2422414985	10.62	3002147173	9.43	3123710748.00
T57P	7.12	3301868082	10.65	2620887215	9.75	5319724726	9.17	3747493340.71
T320T	5.55	1.2129E+10	8.92	9359971652	9.22	7579651695	7.90	9689657600.36
T220T	5.56	1.201E+10	7.92	1.9416E+10	NA	NA	6.74	15712911155.58
T529X	9.61	5864985992	10.19	3997415544	NA	NA	9.90	4931200767.81
T521X	10.36	3562634374	10.77	2726517072	NA	NA	10.57	3144575722.65
T110T	10.47	3317470804	9.45	6514633949	NA	NA	9.96	4916052376.13
T5C3PX	NA	NA	11.19	2066946808	NA	NA	11.19	2066946808.40
t226X	9.92	4766767911	NA	NA	NA	NA	9.92	4766767911.36
t336P	9.22	7588497930	NA	NA	NA	NA	9.22	7588497929.87

t326X	10.51	3240030133	NA	NA	NA	NA	10.51	3240030133.39
t742T	10.98	2375319567	NA	NA	NA	NA	10.98	2375319567.02
t842T	10.64	2959339731	NA	NA	NA	NA	10.64	2959339731.23
t832T	9.76	5304428051	NA	NA	NA	NA	9.76	5304428051.10
t426X	11.08	2219695721	NA	NA	NA	NA	11.08	2219695721.18
t132T	11.12	2163460079	NA	NA	NA	NA	11.12	2163460079.51
t642T	10.51	3234602022	NA	NA	NA	NA	10.51	3234602021.94
t432T	9.64	5748995293	NA	NA	NA	NA	9.64	5748995292.68
t1C3PX	10.58	3089628669	NA	NA	NA	NA	10.58	3089628669.43
t232T	9.75	5330594648	NA	NA	NA	NA	9.75	5330594647.75
t532T	10.73	2794534856	NA	NA	NA	NA	10.73	2794534856.11
t331T	11.09	2213071050	NA	NA	NA	NA	11.09	2213071049.84
t332T	11.15	2120982968	NA	NA	NA	NA	11.15	2120982967.59
t631X	10.73	2789446356	NA	NA	NA	NA	10.73	2789446356.34
t242T	10.4	3469592155	NA	NA	NA	NA	10.40	3469592155.38
t126X	10.32	3664844882	NA	NA	NA	NA	10.32	3664844881.68
t338T	10.23	3880975413	NA	NA	NA	NA	10.23	3880975412.94
t632T	9.39	6787085495	NA	NA	NA	NA	9.39	6787085495.01

APÉNDICE 2

Cajas nido en el Parque Nacional La Malinche ocupadas por el azulejo de garganta azul (Sialia mexicana)

Localidad	Caja	Fecha puesta	Eclosión	Emplumado	Inclusión en Experimento
Javier Mina	S31X	21/04/2015	1	1	SÍ
Teacalco	S13T	24/04/2015	1	1	SÍ
Pilares	S37P	26/04/2015	0	0	No, abandonada
Pilares	S42P	27/04/2015	1	1	SÍ
Pilares	S30P	27/04/2015	1	NA	No, solo un pollo
Teacalco	S15T	28/04/2015	0	0	No, abandonada
Pilares	S20P	30/04/2015	1	1	SÍ*
Javier Mina	S12X	01/05/2015	1	1	SÍ
Teacalco	S1T	02/05/2015	1	0	No, depredada
Teacalco	S39T	03/05/2015	1	1	SÍ
Teacalco	S38T	03/05/2015	1	1	SÍ
Teacalco	S32T	03/05/2015	1	1	SÍ
Teacalco	S11T	04/05/2015	1	1	SÍ
Teacalco	C10P4	04/05/2015	1	NA	No, solo un pollo
Javier Mina	S3X	05/05/2015	1	1	SÍ*
Pilares	C2P3	05/05/2015	1	1	SÍ
Teacalco	S20T	06/05/2015	1	1	SÍ
Javier Mina	C3PX (S5X)	07/05/2015	1	1	SÍ
Javier Mina	S21X	07/05/2015	1	1	SÍ
Pilares	C2P1	07/05/2015	1	0	No, muerte causas indeterminadas
Pilares	C1P1	07/05/2015	1	0	No, muerte causas indeterminadas
Pilares	S36P	07/05/2015	1	1	SÍ
Pilares	S33P	07/05/2015	1	0	No, muerte causas indeterminadas
Pilares	S7P	07/05/2015	1	1	SÍ
Javier Mina	S17X	08/05/2015	1	0	No, muerte causas indeterminadas
Javier Mina	S20X	08/05/2015	1	1	No, depredada
Javier Mina	S1X	09/05/2015	1	1	SÍ*
Javier Mina	S22X	09/05/2015	1	1	SÍ
Javier Mina	S19X	09/05/2015	1	0	No, muerte causas indeterminadas
Teacalco	S42T	09/05/2015	1	1	SÍ
Teacalco	S34T	09/05/2015	1	1	SÍ

Javier Mina	S37X	10/05/2015	1	0	No, depredada
Teacalco	C2P2	10/05/2015	1	1	SÍ
Teacalco	S22T	10/05/2015	0	0	No, abandonada
Teacalco	S30T	10/05/2015	1	1	SÍ
Teacalco	S10T	11/05/2015	1	1	SÍ
Javier Mina	S7X	12/05/2015	1	1	SÍ
Teacalco	S7T	14/05/2015	1	1	SÍ*
Teacalco	S31T	15/05/2015	1	1	SÍ
Pilares	S29P	15/05/2015	0	0	No, abandonada
Javier Mina	S23X	16/05/2015	1	1	SÍ
Teacalco	S19T	16/05/2015	1	NA	No, solo un pollo
Teacalco	S28T	16/05/2015	1	1	SÍ
Javier Mina	S29X	17/05/2015	1	1	SÍ
Javier Mina	S25X	18/05/2015	1	0	No, depredada
Teacalco	S18T	19/05/2015	0	0	No, solo un pollo
Teacalco	S26T	20/05/2015	1	1	SÍ*
Javier Mina	S26X	31/05/2015	1	1	SÍ*

0: Nido no eclosionado o pollos no emplumados, 1: Nido eclosionado o emplumado, *cajas nido que presentaron ayudantes de crianza.