



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Influencia de la edad de los padres sobre la
respuesta inmune innata de la progenie en el bobo
de patas azules (*Sula nebouxi*)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Wendoly Rojas Abreu

Codirectores

Dr. Sergio Ivan Ancona Martínez

Dr. Hugh Drummond

Tlaxcala, Tlax.

Enero, 2019



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Influencia de la edad de los padres sobre la
respuesta inmune innata de la progenie en el bobo
de patas azules (*Sula nebouxi*)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Wendoly Rojas Abreu

Comité Tutorial

Dr. Sergio Ivan Ancona Martínez

Dr. Hugh Drummond

Dra. Robyn Elizabeth Hudson

Dr. Amando Bautista Ortega

Tlaxcala, Tlax.

Enero, 2019

Este trabajo de investigación se realizó bajo la asesoría del Dr. Sergio Ivan Ancona Martínez y el Dr. Hugh Drummond, 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, por medio de una beca de Maestría (No. 780598).

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

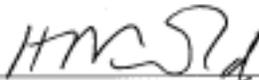


COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E

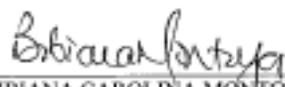
Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que **Wendoly Rojas Abreu** realiza para la obtención del grado de Maestra en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es: **"Influencia de la edad de los padres sobre la respuesta inmune innata de la progenie en el bobo de patas azules"**.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

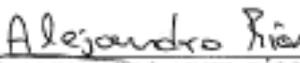
ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., DICIEMBRE 4 DE 2018


DR. HUGH DRUMMOND


DR. AMANDO BAUTISTA ORTEGA


DRA. BIBIANA CAROLINA MONTOYA LOAIZA


DRA. ESTELA CUEVAS ROMERO


DR. ALEJANDRO ARIEL RÍOS CHELÉN



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



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).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero brindado al proyecto de la UNAM con número 255826 y por la beca de Maestría (No. 780598) y a la National Geographic por el apoyo financiero brindado al proyecto con número 9974-16.

A mis directores de tesis, el Dr. Sergio Ivan Ancona Martínez y el Dr. Hugh Drummond por haberme aceptado como su alumna y por su compromiso en mi formación académica.

A los integrantes de cada comité evaluador de este proyecto: la Dra. Robyn E. Hudson, el Dr. Amando Bautista Ortega, la Dra. Bibiana C. Montoya Loaiza, la Dra. Estela Cuevas Romero, el Dr. Alejandro A. Ríos Chelén, el Dr. Isaac González Santoyo y el Dr. Jorge Vázquez Pérez, por sus comentarios y correcciones en mi escrito y en cada uno de mis exámenes tutorales.

Al Dr. Isaac González Santoyo por su asesoría en el tema de sistema inmune y por su apoyo para que el trabajo de campo se realizará de la manera más adecuada.

A la M.C. Araceli Lima Melo por su paciencia y apoyo durante sus asesorías sobre la identificación de los leucocitos.

Al M.C. Ubaldo Quiroz López por brindarme un espacio en su laboratorio para realizar los conteos de leucocitos y por su total disposición para resolver mis dudas.

A la M.C. Ma Cristina Rodríguez Juárez, por su apoyo en el desarrollo de esta tesis.

A Santiago y el resto de los integrantes del laboratorio de Conducta Animal del Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México, por sus comentarios y apoyo en la estadística.

A todos los que participaron en el muestreo del 2017 por que siempre me enseñaron algo y me apoyaron cuando fue necesario: Sam, Beca, Ema, Mitzi, Lorena, Marisol, Mike, Daniel, y en especial a ti Aldo por ser mi compañero, tenerme paciencia en cada dificultad, por guiarme y por escucharme, platicarme y aconsejarme.

A los pescadores por estar al pendiente siempre y apoyarnos en todo para que nos mantuviéramos vivos y con gusto.

A la Armada de México por su apoyo con el transporte que permitió que llegamos a la isla Isabel.

Este estudio es parte de un estudio experimental del laboratorio de Conducta Animal del Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México, que investigó el efecto de la combinación de edades parentales sobre eclosión, peso al eclosionar, sobrevivencia, crecimiento, respuesta inmune innata y adquirida, infestación por garrapatas y telomeros en la progenie.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres, porque ahora se que realmente lo que soy es gracias a ustedes, que de hecho, soy parte de ustedes. A ti Rocio Abreu, mi madre, por apoyarme en todo momento en la mejor manera que ha sabido, a pesar de todo, por pensar en nosotras antes que todo, incluso antes de usted misma, pero principalmente por mantenerse firme a mi lado a pesar de mis momentos de locura. A ti Armando Rojas, mi padre, por ser mi ejemplo a seguir, por no olvidarse de nosotras a pesar de sus adversidades, porque, aunque se que le ha costado estoy consciente que somos su prioridad, por enseñarme que las cosas se aprecian por su valor y no por su precio, por enseñarme a apasionarme en lo que hago y lo que soy. Por ser los mejores maestros en la vida que yo haya podido tener, sin sus enseñanzas este trabajo no hubiera podido ocurrir.

A mis hermanas Iliana y Rocio, por ser mis compañeras y confidentes hasta el momento, por sus atenciones hacia mi persona cuando yo mas apoyo necesito, incluyendo esta tesis, por hacerme sentir util y por que se que los mejores consejos que pueden sacar de su cabecita los guardan para mi. Gracias porque mi responsabilidad y otras características de mi personalidad se deben en parte a su existencia. Tambien agradezco a Armandito y a Santi por ser unas de las personas que me han enseñado a perdonar y amar.

Ademas agradezco a Sergio y Hugh por darme la oportunidad de seguirme apasionando de la investigación, han sido parte de la formación de mi carácter, por enseñarme a tomar el camino correcto a pesar de las mil correcciones que se tengan que hacer, por apoyar mis capacidades profesionales aún en los momentos en que yo dudé, por tenerme paciencia y sacarme de cada uno de los obstaculos academicos que se presentaron durante la realizacion de este proyecto.

A Robyn Hudson, Bibiana Montoya, Estela Cuevas Araceli Lima, Isaac Santoyo, Amando Bautista y Ubaldo Quiroz por su apoyo en el desarrollo de esta tesis, a los que se involucraon sus revisiones y sugerencias, como a los que me guiaron y prestaron espacio y material. Gracias a su apoyo se logró un proyecto más completo.

Agradezco a mis amigos que me han ayudado sin prejuicios a ver que para empezar una vida mas util y feliz se requiere de una nueva creacion y el esfuerzo constante por mantenerla y por estar ahi para demostrarmelo y recordarmelo. A ti P. Fernando, M. Raquel, Miriam, Marco, Viena, Vianet, Fanicienta, Ori, Gael, Alex, Poncho, Miguelin, Miguel H, Alonso, Amelia, Jesus, Raquel, Consuelo, Ernesto, David, Salim, Aurora, Less, Julia, Braulio.

A ti Fredy, ademas, por ser parte de mi crecimiento, por ser la persona que siempre me hace ver mi verdad, en especial en los momentos difciles durante el desarrollo de esta tesis y por dejarme ser libre siempre.

Especialmente les agradezco a M. Raquel, P. Fernando, Linda y Vianet por tener como nadie, la voluntad genuina de escucharme y ser el conducto que me pone los pies en la tierra y por guiarme.

A Sandi, Esme y Mota por apoyarme siempre (incluso cuando yo estoy mal), por permitirme saber que no estoy sola y que puedo ser genuina.

De igual manera agradezco a los que me apoyaron en mi muestreo y convivieron conmigo durante esta fase: Aldo, Sam, Beca, Erick, Ema, Mitzi, Marisol, Mike, Daniel y Lore, así como a todos los pescadores, con su apoyo el muestreo se llevo con eficiencia y la convivencia en la isla fue de lo mas agradable. Gracias además por su paciencia y enseñanzas.

Finalmente, pero no menos importante, agradezco a Bélgica, Migue, Saúl y Raúl por su amistad, paciencia y comprensión, por permitirme sentir parte de algo y por darme ideas siempre que tuve dificultades en la realización de este proyecto.

DEDICADA A:

Mis padres y hermanos por ser los seres humanos que me han enseñado el amor por lo que hago (y por todo).

Conoceremos una "nueva" libertad, que no es la vieja libertad para hacer lo que más me complaciera, sin consideración alguna de los demás, sino una nueva libertad que hace posible que las promesas de mi vida se hagan realidad. ¡Qué alegría ser libre!



INFLUENCIA DE LA EDAD DE LOS PADRES SOBRE LA RESPUESTA INMUNE INNATA DE LA PROGENIE EN EL BOBO DE PATAS AZULES

RESUMEN

Varios estudios en vertebrados han documentado una reducción en el éxito reproductivo conforme aumenta la edad de las hembras o de los machos, pero muy pocos han explorado el efecto de la combinación de edades parentales en componentes de calidad de la descendencia. Estudios recientes en el bobo de patas azules *Sula nebouxii*, encontraron que las crías de madres jóvenes apareadas con padres viejos, y de madres viejas apareadas con padres jóvenes, presentan una menor infestación por garrapatas y tienen una mayor probabilidad de regresar a su población natal como adultos reproductores que las crías de padres similarmente jóvenes o similarmente viejos. Sin embargo, se desconocen las causas de estas diferencias. En este estudio utilizamos el mismo modelo de estudio para evaluar, por medio de un experimento de intercambio recíproco de puestas entre parejas con diferentes combinaciones de edades parentales, la influencia de la interacción de las edades parentales en la respuesta inmune innata de la progenie y si este impacto podría atribuirse a mecanismos genéticos o efectos maternos versus cuidados parentales. Nuestros resultados mostraron que los valores de los cocientes heterófilos/linfocitos (H:L), y el conteo de heterófilos y eosinófilos, en la sangre periférica de la progenie no se vieron afectados por la combinación de edades de los padres biológicos ni por la combinación de edades de los padres adoptivos, a ninguna edad a la cual estos indicadores fueron evaluados (20 y 35 días). Sin embargo, a los 35 días de edad, las crías con padres biológicos viejos presentaron un mayor conteo de heterófilos que las crías con padres biológicos jóvenes, y las crías cuidadas por madres viejas presentan valores mayores de H:L y del conteo de heterófilos que las crías cuidadas por madres jóvenes. Estos resultados sugieren que la respuesta inmune innata de la descendencia disminuye con la senescencia reproductiva de los machos y con la senescencia del aprovisionamiento de alimentos por parte de las hembras. Se sugieren estudios futuros que evalúen el efecto en combinación y por separado de las edades parentales en otros indicadores de calidad, y en diferentes momentos del desarrollo de la progenie, para dilucidar los mecanismos que subyacen al efecto de las combinaciones de edades parentales en la sobrevivencia de la progenie.

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Variación en el éxito reproductivo con la edad en las poblaciones silvestres..	1
1.2 La relevancia de los impactos de la edad en la reproducción en animales silvestres.....	5
1.3 Edad, elección de pareja y viabilidad de la progenie.....	8
1.4 Influencia de la edad parental en la respuesta inmune innata de la progenie...	10
1.5 Indicadores celulares de la capacidad inmune innata en vertebrados.....	16
1.6 El bobo de patas azules como modelo de estudio.....	17
2. ANTECEDENTES.....	19
3. OBJETIVOS.....	21
4. HIPÓTESIS Y PREDICCIONES.....	21
5. JUSTIFICACIÓN	22
6. METODOLOGÍA	
6.1 Área de estudio.....	23
6.2 Procedimientos generales.....	23
6.3 Diseño experimental.....	25
6.4 Recolección de muestras de sangre.....	26
6.5 Conteo de leucocitos.....	27
6.6 Análisis estadísticos.....	28
6.6.1 Selección de modelos.....	31

7. RESULTADOS.....	31
7.1 Efecto de las edades de ambos padres biológicos sobre la inmunidad innata de la progenie.....	33
7.2 Efecto de las edades de ambos adultos adoptivos sobre la inmunidad innata de la progenie.....	38
8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.....	45
9. REFERENCIAS.....	52

INTRODUCCIÓN

Variación en el éxito reproductivo con la edad en poblaciones silvestres

La variación en el éxito reproductivo con la edad es un fenómeno ampliamente observado en animales (Nussey et al. 2006; Angelier et al. 2007 *a* y *b*; Festa-Bianchet y King 2007; Mauck et al. 2012). En vertebrados iteróparos, es decir, aquellos que se reproducen varias veces en su vida, (e.g., el conejo europeo *Oryctolagus cuniculus*, el ciervo común *Cervus elaphus* y el bobo de patas azules *Sula nebouxii*) la relación entre edad y éxito reproductivo suele seguir un patrón de “U” invertida, en el que el éxito reproductivo aumenta conforme avanza la edad de los individuos hasta alcanzar un punto máximo y después comienza a decaer (Rödel et al. 2004; Nussey et al. 2006; Beamonte-Barrientos et al. 2010).

El aumento en el éxito reproductivo, tanto en el número de la progenie producida como en la calidad de esta, conforme avanza la edad, podría atribuirse a dos procesos no mutuamente excluyentes. El primero, es la adquisición de experiencia reproductiva, es decir, un mejoramiento en habilidades clave para la reproducción, tales como la selección de pareja o del sitio de reproducción, o la protección y alimentación de la descendencia (Bradley y Safran 2014). Por ejemplo, en el carricero de Seychelles (*Acrocephalus sechellensis*) se ha observado que los individuos con más eventos reproductivos previos, construyen nidos en sitios donde están más seguros de las inclemencias del ambiente, dedican más tiempo a la incubación y protección de los huevos y presentan mayor éxito de eclosión (Komdeur 1995). En los elefantes marinos del sur (*Mirounga leonina*), las hembras de mayor edad son las que presentan mayor masa y crías destetadas más pesadas, lo cual podría deberse a que tienen más experiencia y capacidad para buscar alimento y proveérselo adecuadamente a su descendencia (Postma et al. 2013). De manera similar, en el papamoscas acollarado (*Ficedula albicollis*) se ha observado que las madres con mayor experiencia de crianza (i.e., con un número mayor de eventos reproductivos) producen progenie más pesada y con tarsos más largos que las madres con menor experiencia de crianza, probablemente porque la eficiencia para ajustar las habilidades de forrajeo en función de la demanda nutricional de la progenie incrementa con el número de eventos reproductivos (Cichoń 2003), y por lo tanto, con la edad (Angelier et al. 2007 *a* y *b*; Mauck et al. 2012).

El otro proceso por el cual podría incrementar el éxito reproductivo con la edad es el mejoramiento progresivo en habilidades que no están relacionadas directamente con la reproducción, pero que podrían tener un impacto positivo indirecto en el desempeño reproductivo. Por ejemplo, podría haber una progresión en la fecha de llegada al sitio de reproducción o un incremento en las habilidades competitivas con la edad (Nol y Smith. 1987; Balbontín et al. 2007; McElligott et al. 2002; Drea 2005). En varias especies de aves, se ha observado que los individuos arriban más temprano a los sitios de reproducción conforme avanza su edad, lo cual se traduce en un alto éxito de apareamiento y una probabilidad alta de que sus crías regresen como adultos reproductores a la población natal (reclutamiento) (Lozano et al. 1996; Balbontín et al. 2007). La evidencia de que las habilidades competitivas pueden incrementar con la edad, y que esto puede representar beneficios en términos de éxito reproductivo, proviene de diferentes estudios en ungulados, pinnípedos, primates y aves (Reiter et al 1981; Robinson 1982; Komers y Dhindsa 1989; Mainguy et al. 2008). Por ejemplo, en la cabra blanca (*Oreamnos americanus*), en el macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) y en la urraca común (*Pica pica*) los machos jóvenes tienen menor probabilidad de reproducirse con hembras de buena calidad porque son excluidos agresivamente de los sitios donde estas se encuentran, por adultos de edad media o avanzada (Robinson 1982; Komers y Dhindsa 1989; Mainguy et al. 2008). De forma similar, en el elefante marino del norte (*Mirounga angustirostris*), las hembras de mayor edad suelen desplazar agresivamente a las hembras más jóvenes hacia la periferia de los harems, lo cual confiere una ventaja reproductiva para las hembras viejas en términos de acceso a cópulas y de producción de progenie más temprano durante la temporada reproductiva (Reiter et al 1981).

La disminución en el éxito reproductivo a edades avanzadas o senescencia reproductiva (Nussey et al. 2006; Beamonte-Barrientos et al. 2010), es decir, la parte negativa del patrón de “U” invertida documentado en vertebrados iteróparos, podría atribuirse a la aparición de alteraciones premutagénicas en el ADN de la lineal germinal o al decaimiento en la viabilidad de las células gaméticas conforme aumenta la edad (Harris et al. 2011; Velando et al. 2011; Selvaratnam et al. 2015). Por ejemplo, en humanos se ha encontrado una disminución en la motilidad espermática

conforme avanza la edad de los hombres, lo cual se asocia con una disminución en su fertilidad (Sloter et al. 2006). En el bobo de patas azules, el aumento en la edad de los machos se relaciona con un incremento en la ocurrencia de daño premutagénico en el ADN de las células germinales (i.e., ausencia de bases púricas o pirimidínicas), probablemente como resultado de un incremento en el nivel de agentes prooxidantes (Velando et al. 2011). Los estudios que documentan una reducción en la viabilidad de los gametos y en la fecundidad conforme avanza la edad han sido más abundantes en las hembras. Diversos estudios han documentado decrementos en la cantidad y calidad de los ovocitos (Healy et al. 1994; Olooto et al. 2012), así como en el número de folículos (Wallace y Kelsey 2010) en mujeres mayores de 35 años de edad. En otros animales se ha observado una disminución en la fertilidad de las hembras, medida como un decaimiento en el número de óvulos fertilizados e implantados, por ejemplo, en el corzo (*Capreolus capreolus*) (Hewison y Gaillard 2001), o bien, como un número menor de partos en el babuino (*Papio cynocephalus*) y otros primates (Bronikowski et al. 2016). En el ratón casero (*Mus musculus*) y en el hámster (*Mesocricetus auratus*), se ha evaluado la actividad mitocondrial de los ovocitos como indicador de fertilidad, y de manera similar en ambas especies, se encontró una disminución de esta, conforme aumenta la edad de las hembras (Simsek-Duran et al. 2013).

Además del deterioro en la línea germinal y la reducción en la viabilidad de los gametos, la senescencia podría implicar un debilitamiento corporal o cambios en conductas clave para la reproducción, y estos cambios también podrían explicar la disminución en el éxito reproductivo en edades avanzadas (Ericsson et al. 2001; Nussey et al. 2013; Lecomte et al. 2010). El decaimiento en la condición corporal y el deterioro somático con la edad podrían redundar en una disminución en la calidad de los efectos maternos (i.e., la influencia de la exposición de la madre a las condiciones ambientales sobre el fenotipo de la progenie a través de la transferencia de sustancias como hormonas, nutrientes o anticuerpos maternos; Mousseau y Fox 1998), o en una deficiencia en las capacidades competitivas y en los cuidados parentales (Mc Elligot et al. 2002; Clay et al. 2018). Al avanzar la edad, diversos animales pueden experimentar reducciones en sus capacidades competitivas (Mc Elligot et al. 2002), o en su habilidad para buscar y proveer alimento suficiente a sus crías (Laubach et al. 2015; Clay et al. 2018) o para protegerlas

de depredadores, parásitos o de las inclemencias del ambiente (Nur 1984; Montgomerie y Weatherhead 1988; Ortega et al. 2017). Por ejemplo, en el gamo común (*Dama dama*) se ha observado que los machos jóvenes suelen desplazar a los machos senescentes de las peleas que se suscitan por acceder a las hembras, lo cual podría deberse a una disminución en el tamaño corporal y en el vigor de la cornamenta con la edad (McElligott et al. 1998 y 2002). En el albatros errante (*Diomedea exulans*), los machos viejos recorren mayores distancias para encontrar alimento y presentan niveles más altos de hormonas relacionadas con el estrés cuando regresan de estos viajes que los machos más jóvenes, lo que refleja una reducción en la eficiencia de forrajeo con la edad (Lecomte et al. 2010).

De forma similar, la calidad de los efectos maternos podría verse afectada por la edad (Réale y Boussés 1995; Ericsson et al 2001; Beamonte-Barrientos et al. 2010). Por ejemplo, las hembras senescentes de alces (*Alces alces*) experimentan una disminución en su producción de leche y un consecuente incremento en la mortalidad de sus crías (Ericsson et al. 2001). Asimismo, en el muflón común (*Ovis musimon*) se ha observado una disminución en la frecuencia de lactancia y en la duración total de la succión por parte de las crías conforme aumenta la edad de sus madres, y este patrón también se ha relacionado con una disminución en la producción de leche materna en edades avanzadas (Réale y Boussés 1995). En aves, se ha encontrado que los ovarios de las gallinas domésticas (*gallus gallus*) viejas tienen una cantidad menor de anticuerpos que los ovarios de gallinas de edad intermedia, lo cual podría conllevar a una deficiencia en la transferencia de anticuerpos de las madres senescentes hacia sus huevos (Barua et al 1998). En el bobo de patas azules, los huevos producidos por hembras senescentes (> 11 años) son más pequeños, y esta reducción se traduce en un menor tamaño estructural en las crías, probablemente debido a una deficiencia en la transferencia de anticuerpos y otras sustancias hacia los huevos por parte de las madres senescentes (Beamonte-Barrientos et al. 2010).

La relevancia de los impactos de la edad en la reproducción en poblaciones silvestres

Hasta hace relativamente poco, se pensaba que las poblaciones silvestres no envejecían porque los individuos sufrían una alta mortalidad extrínseca (e.g., por depredación, enfermedades, impactos climáticos) antes de alcanzar edades avanzadas (Williams y Day 2003; Nussey et al. 2013; Berger et al. 2016). Sin embargo, en las últimas dos décadas ha habido un interés creciente en estudiar los impactos de las edades parentales sobre la viabilidad de la progenie y la dinámica poblacional (Wilson et al. 2007; Schroeder et al. 2015) debido a un incremento en los programas de monitoreo de largo plazo en poblaciones silvestres, los cuales proveen información completa de las historias de vida individuales. Estos programas de monitoreo han revelado que los individuos senescentes suelen estar bien representados entre las parejas reproductivas en diversas poblaciones silvestres (e.g., alce *Alces alces*, gamo común *Dama dama*, ardilla roja *Sciurus vulgaris*, charrán común *Sterna hirundo*, bobo de patas azules *Sula nebouxii*, entre otros; Ericsson et al. 2001; McElligott et al. 2002; Descamps et al. 2008; Beamonte-Barrientos et al. 2010; Rebke et al. 2010) y dejan descendencia viable. Por ejemplo, el monitoreo de más de 30 años de la colonia reproductiva del bobo de patas azules en Isla Isabel, Nayarit, ha revelado que en promedio, el 18% de los adultos que se reproducen año con año son senescentes (> 11 años de edad; datos obtenidos de 15 temporadas reproductivas, del 2002 al 2016). La contribución de los individuos de edades avanzadas a la reproducción también suele ser sustancial en el papamoscas acollarado, donde los individuos senescentes aportan el 4% de la variación genética aditiva observada en el éxito reproductivo anual en la isla de Gotland (Brommer et al. 2007). En general, el seguimiento de las historias de vida completas de animales marcados ha permitido que los ecólogos evolutivos tengan una mejor apreciación de los efectos de la edad sobre la adecuación en poblaciones silvestres, y estos esfuerzos sugieren que a pesar de que la senescencia implica decaimientos físicos importantes (Monaghan et al. 2008; Roach y Carey 2014), los individuos senescentes son capaces de dejar descendencia viable y contribuir a la variación fenotípica en sus poblaciones (Réale y Boussés 1995; Nussey et al. 2006; Festa-Bianchet y King 2007; Lecomte et al. 2010).

Los efectos negativos de la edad en el éxito reproductivo podrían ser mitigados si los individuos de edad avanzada logran aparearse con individuos más jóvenes y con ello compensan los

decaimientos en sus propias capacidades fisiológicas o competitivas (Ramos et al. 2014 *a y b*; Drummond y Rodríguez et al. 2015). Además este beneficio podría surgir no solo de efectos aditivos de la inversión de los miembros de la pareja sino también de efectos interactivos, ya que la inversión reproductiva de cada consorte podría depender de su propia edad y de la de su pareja en un evento reproductivo dado (Hansen y Price 1995; Kokko 1998; Johnson y Gemmell 2012; Ramos et al. 2014 *b*). Tradicionalmente, los estudios enfocados en senescencia reproductiva en poblaciones humanas y en otros animales se limitaban a la examinación de los efectos separados de la edad de la madre o del padre en parámetros reproductivos o en la viabilidad de la progenie, habiendo por lo general un mayor interés en los efectos de la edad de la madre (Réale y Boussés et al. 1995; Price y Hansen 1998; Ericsson et al. 2001; McElligott et al. 2002; Rödel et al. 2004; Harris et al. 2011; Postma et al. 2013). Hasta hace relativamente poco, los programas de investigación comenzaron a indagar si las edades de ambos progenitores pueden tener efectos combinados en parámetros reproductivos y en la calidad de la progenie (Bille et al. 2005; Colines et al. 2015; Drummond y Rodríguez 2015; Bowers et al. 2017; Tidière et al. 2018).

El posible efecto combinado de las edades parentales podría tener implicaciones importantes para la elección de pareja porque los efectos de la edad propia en la progenie que actúan a nivel genético o de cuidados parentales, podrían verse mitigados (o potenciados) por los efectos de la edad de la pareja (Beck et al. 2002; Hsu et al. 2015). De esta manera, las hembras muy jóvenes (inexpertas) podrían ver beneficiada su adecuación al aparearse con machos de mayor edad, si estos representan buenos genes (Loffredo y Borgia 1986; Grant y Grant 1987) o una elevada experiencia reproductiva (Burley y Moran 1979; Siefferman y Hill 2003). Por el contrario, las hembras de mayor edad podrían preferir aparearse con machos jóvenes si esto les permite mitigar los efectos negativos de su propia edad en la viabilidad de sus cigotos o en la probabilidad de que su descendencia presente malformaciones o enfermedades generadas por el emparejamiento de dos individuos viejos (Bowers et al. 2017). Igualmente, estos efectos interactivos de las edades parentales en la calidad de la progenie podrían tener implicaciones importantes para la dinámica de las poblaciones porque podrían ser una fuente importante de

variación fenotípica, con impactos consecuentes en las tasas de sobrevivencia y en el crecimiento poblacional.

Los pocos estudios enfocados en examinar los efectos interactivos de las edades parentales en parámetros reproductivos y en la viabilidad de la progenie han sido mayormente abordados en humanos. Estos estudios sugieren que la probabilidad de que la descendencia presente malformaciones ocasionadas por mutaciones en el genoma, aumenta cuando alguno de los padres tiene más de 35 años, pero solo si sus parejas también tienen más de 35 años (Fisch et al. 2003; Bille et al. 2005). Estudios recientes en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), en el chochín criollo (*Troglodytes aedon*), en el lémur rufo rojo (*Varecia rubra*) y en el lémur rufo blanco y negro (*Varecia variegata*), sugieren que estos efectos interactivos de las edades parentales no son exclusivos de nuestra especie, y que merecen ser estudiados con mayor detalle en una diversidad de taxa (Colines et al. 2015; Bowers et al. 2017; Tidière et al. 2018).

Además de los estudios observacionales realizados en estas poblaciones, es necesario realizar estudios experimentales que permitan analizar los mecanismos que median los efectos de las edades parentales sobre la calidad de la progenie. Esto con el fin de poder identificar si dichos impactos pueden atribuirse a efectos de las edades parentales relacionados con la genética, o a los cuidados parentales no directamente asociados con la genética. Los pocos estudios experimentales que existen han realizado intercambios de crías entre madres y padres con diferentes edades. Estos estudios han comparado indicadores de calidad de la progenie como longevidad de las crías, peso al nacer, crecimiento estructural y sobrevivencia, entre crías engendradas y cuidadas por madres y padres de diferentes edades (Bogdanova et al. 2006; Ivimey-Cook y Moorad 2018). Aunque estos estudios en invertebrados han fallado en detectar si los efectos de la edad en ambos padres se deben a mecanismos genéticos o de cuidados parentales (Ivimey-Cook y Moorad 2018), los estudios en vertebrados sugieren que la calidad de las crías depende tanto de la edad de los padres biológicos como de la edad de los padres adoptivos (Bogdanova et al. 2006; Beamonte-Barrientos et al. 2010). En un estudio en la gaviota argéntea (*Larus argentatus*) se hizo un intercambio de huevos entre madres y padres de diferentes edades y se encontró que los huevos producidos por ambos padres jóvenes

presentaron un tamaño menor que los huevos producidos por ambos padres de edad madura, aunque la ganancia en masa de las crías eclosionadas de los huevos provenientes de ambos padres jóvenes fue similar a la de las crías eclosionadas de los huevos puestos por ambos padres de edad madura, pero solo cuando fueron cuidados por ambos padres de edad madura (Bogdanova et al. 2006). Un estudio similar en el bobo de patas azules reveló que al incrementar la edad de la madre biológica, disminuye el tamaño de los huevos y de las crías que eclosionan de estos, y que al aumentar la edad de la madre adoptiva, el tamaño estructural y la capacidad inmune de las crías decaen (únicamente en las segundas crías en eclosionar). Estos resultados en la gaviota argéntea y en el bobo de patas azules sugieren que tanto la calidad de los efectos parentales pre-eclosión como los cuidados parentales después de la eclosión pueden influir en la calidad de la descendencia (Bogdanova et al. 2006; Beamonte-Barrientos et al. 2010). Sin embargo, aún falta explorar experimentalmente los mecanismos que subyacen a los probables efectos combinados de las edades de ambos progenitores en estas y otras poblaciones de vertebrados de vida larga.

Edad, elección de pareja y viabilidad de la progenie

Algunos estudios, principalmente en aves (e.g., en el gorrión común *Passer domesticus* y el azulejo de garganta azul *Sialia mexicana*), sugieren que las hembras podrían utilizar la edad de los machos como un indicador de su calidad genética o de su experiencia reproductiva (Veiga 1993; Budden y Dickinson 2009). Esto podría deberse a que la edad se correlaciona con ciertos rasgos morfológicos y conductuales sujetos a selección sexual (Hansen y Price 1995). Por ejemplo, en diferentes especies de aves se ha observado que la expresión de caracteres como los cantos de cortejo, el largo de la cola y el brillo del plumaje mejoran con la edad (Loffredo y Borgia 1986; Grant y Grant 1987; Manning 1989).

Las hembras (o los machos) que eligen a una pareja cuya edad maximiza su propio éxito reproductivo en función de su propia edad podrían tener una ventaja adaptativa (Ratikainen y Kokko 2009; Johnson y Gemmell 2012; Colines et al. 2015; Drummond y Rodríguez 2015; Bowers et al. 2017). Si la elección de pareja es una conducta dinámica que depende de la edad del elector (Hansen y Price 1995), entonces algunas veces será conveniente elegir una pareja

mas joven que el elector, y algunas otras veces una pareja de mayor edad que la edad del elector. Sin embargo, los estudios enfocados en el papel de la edad como criterio para elegir pareja suelen omitir la edad del propio elector como un factor clave (Drummond y Rodríguez 2015; Ramos y Drummond 2018), y esto ha derivado en resultados aparentemente contradictorios. Por un lado, numerosos estudios proveen evidencia de que las hembras suelen preferir a los machos de mayor edad en una población. Este resultado ha sido considerado como evidencia de la teoría de los buenos genes, según la cual las hembras prefieren machos de edad avanzada porque estos reflejan una alta capacidad genética para sobrevivir (e.g., una baja cantidad de mutaciones deletéreas precigóticas y una alta viabilidad en las condiciones ambientales prevalentes) y podrían heredar esta capacidad a su progenie (Manning 1989; Hansen y Price 1995; Kokko 1998; Brooks y Kemp 2001). Sin embargo, esta hipótesis es controversial porque si bien los individuos senescentes podrían presentar genes de alta calidad, tmbn pueden presentar una acumulación de mutaciones en su línea germinal, lo que podría disminuir la viabilidad de sus gametos (Harris et al. 2011; Velando et al. 2011; Selvaratnam et al. 2015). La predicción de que una edad avanzada puede revelar buenos genes podría cumplirse solo si las hembras son capaces de distinguir a machos de edad intermedia de los muy viejos, si el atributo evaluado por las hembras se relaciona con la edad de los machos y si existe algún mecanismo que mantenga la relación entre la calidad genética expresada por el atributo evaluado por las hembras y la adecuación total de los machos (Hansen y Price 1995).

Las hembras también podrían preferir machos de edades avanzadas si estos son los que tienen mayor experiencia reproductiva, y esta experiencia se traduce en beneficios más altos para las hembras (Brooks y Kemp 2001). Por ejemplo, en el papamoscas cerrojillo (*Ficedula hypoleuca*) se encontró que los machos viejos entregan mayor alimento a sus crías que los machos jóvenes. De esta manera, las hembras apareadas con machos viejos se ven beneficiadas con una progenie con mejor estado nutricional y mayores probabilidades de sobrevivir (Saetre et al. 1995). En cambio, otros estudios tanto en vertebrados como en invertebrados, sugieren que las hembras podrían preferir machos de edad media, y que con ello evitarían aparearse con machos jóvenes inexpertos o machos de edad avanzada, ya que estos últimos podrían presentar alteraciones en

el material genético de su línea germinal y perjudicar la viabilidad de su progenie (Alatalo et al. 1986; Hansen y Price 1995; Beck y Promislow 2007; Jones et al. 2000).

La falta de consistencia en los resultados de diferentes estudios que evalúan el papel de la edad de los machos como criterio de elección por parte de las hembras podría ser resultado también de que los estudios pocas veces consideran toda la variación de edades existente en una población. Esto puede derivar en dos problemas: el desconocimiento de las posibles preferencias que las hembras de diferentes edades podrían tener por machos de diversas edades, y conclusiones equivocadas sobre el éxito reproductivo de individuos aparentemente senescentes que en realidad podrían ser individuos de edad media (Ericsson et al. 2001; Drummond y Rodríguez 2015). Es necesario analizar el efecto combinado de la edad materna y paterna sobre diferentes parámetros de calidad y viabilidad de la progenie considerando una variación amplia (incluyendo la vejez) en edades parentales para tener un mejor entendimiento de cómo la edad puede influir en la elección de pareja y el éxito reproductivo en poblaciones silvestres (Drummond y Rodríguez 2015; Bowers et al. 2017; Ramos y Drummond 2018). En este estudio investigué cómo las combinaciones de edades parentales influyen en la respuesta inmune innata, un importante componente de calidad de la progenie, usando el bobo de patas azules como modelo de estudio. Indagué si existe una influencia interactiva de las edades materna y paterna en la capacidad inmune de la progenie, y si los efectos de dichas edades podrían atribuirse a (1) mecanismos genéticos o efectos maternos y/o (2) cuidados parentales, por medio de un experimento de intercambio recíproco de puestas entre parejas con combinaciones de edades maternas y paternas contrastantes.

Influencia de la edad parental en la respuesta inmune innata de la progenie

La respuesta inmune innata es fundamental para la adecuación de los individuos, ya que esta determina su capacidad para hacerle frente a cualquier agente externo que pueda poner en riesgo su supervivencia (Juul-Madsen et al. 2008; Owen et al. 2010). La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa ante cualquier parásito o patógeno; es inespecífica, y efectiva desde el nacimiento (Juul-Madsen et al. 2008; Rollings-Smith y Woodhams 2012). Está formada por barreras externas constituidas por la piel y las membranas mucosas, así como por un conjunto

de componentes celulares que combaten a los agentes infecciosos que atraviesan las barreras externas, entre los que se cuentan los macrófagos, granulocitos (heterófilos o neutrófilos en el caso de aves y reptiles, eosinófilos y basófilos), linfocitos, monocitos, trombocitos y células NK (Natural Killer) (Juul-Madsen et al. 2008). La inflamación inducida por agentes infecciosos y daño tisular es un mecanismo esencial de la respuesta inmune, la cual involucra la presencia y producción acelerada de componentes de la respuesta inmune innata, así como algunos componentes de la respuesta inmune adquirida, como los anticuerpos (Stewart 2009; Sam Xiao 2017). Las funciones de los componentes de respuesta inmune innata producidos en la inflamación son:

- Heterófilos: son los principales fagocitos que se presentan en la sangre circulante en respuesta a infecciones, inflamaciones y presencia de estrés.
- Eosinófilos: juegan un papel en el proceso de inflamación y están asociados a la defensa contra parásitos.
- Basófilos: involucrados en el proceso inflamatorio y la resistencia contra ectoparásitos.
- Linfocitos: su función es producir y modular la defensa inmune innata y adaptativa.
- Monocitos: son fagocitos asociados a la defensa en contra de infecciones (Davis et al. 2008; Karasuyama, 2011).

La información genética transferida de padres a hijos puede incidir en el desarrollo y mantenimiento de una respuesta inmune innata adecuada en la progenie (Al-Murrani et al. 1997; Owen et al. 2008). Además, la respuesta inmune innata de la progenie también puede ser influida por factores ambientales como la disponibilidad de alimento, el grado de competencia entre hermanos, la temperatura ambiental, la exposición a contaminantes, la experiencia inmune en los padres (i.e., capacidad inmune generada por la exposición a determinados patógenos a lo largo de la vida) y la transferencia de anticuerpos de la madre a los huevos (Al-Murrani et al. 1997; Ruíz et al. 2002; Lobato et al. 2005; Beamonte-Barrientos et al. 2010; Müller et al. 2011; Banbura et al. 2013). Es así que esta primera línea de defensa contra agentes infecciosos podría ser afectada de forma sustancial por la calidad genética, el estado fisiológico y la condición de los padres, y por lo tanto por las edades parentales (Dardillat et al. 1978; Barua et al. 1998). Sin embargo, solamente un estudio en ganado vacuno y dos estudios en aves silvestres han evaluado

el efecto de la edad materna en la respuesta inmune de la progenie.

En tres razas de ganado vacuno (Salers, Aubrac y Charolais) se ha documentado que las crías de madres de edad intermedia tienen mayor cantidad de anticuerpos que las crías de madres jóvenes o viejas (Dardillat et al. 1978). En el bobo de patas azules, se encontró que las segundas crías en eclosionar, cuidadas por una madre vieja, tienen una menor respuesta inflamatoria ante fitohemaglutinina (PHA por sus siglas en inglés), un mitógeno que induce la activación de la respuesta inmune inflamatoria (Hoi-Leitner 2001; Müller et al. 2011), que las crías cuidadas por una madre joven o una madre de edad intermedia (Beamonte-Barrientos et al. 2010). Un estudio reciente en el chochín criollo (*T. aedon*), documentó que las crías de madres viejas (de tres años o más) apareadas con padres jóvenes (de un año) tienen una respuesta inmune más elevada ante PHA que las crías de madres jóvenes apareadas con padres viejos o de padres similarmente jóvenes y similarmente viejos (Bowers et al. 2017). Sin embargo, estos estudios no permiten vislumbrar si estos efectos podrían atribuirse a procesos que operan a nivel genético o de efectos maternos versus cuidados parentales.

Existe evidencia que sugiere que la edad de ambos padres podría influir en la respuesta inmune innata de su progenie a través de procesos que actúan a nivel genético. Uno de estos procesos podría ser una disminución en el nivel de heterocigosis individual (cantidad de genes con alelos no idénticos) en la progenie, al avanzar la edad de alguno de los padres. A pesar de que no existen estudios que evalúen directamente la influencia de las edades parentales en la heterocigosis de la progenie, algunos estudios sugieren que esta relación podría existir. Por ejemplo, en vertebrados, la heterocigosis individual disminuye con la edad (Carr y Gottschling 2008; Cohas et al. 2009), y existe una correlación de hasta el 32% entre la heterocigosis de los adultos y la heterocigosis de su descendencia (Mitton et al. 1993). Además, dos estudios, uno realizado con crías del carbonero común (*Parus major*) y otro con crías del león marino (*Zalophus wollebaeki*), encontraron que algunos indicadores de respuesta inmune, como el nivel de la respuesta inflamatoria y la cantidad de anticuerpos, se correlacionan positivamente con el nivel de heterocigosis individual (Voegeli et al. 2013; Brock et al. 2015). Estos resultados sugieren que la edad del padre y de la madre podrían influir en la heterocigosis heredada a su

progenie y ésta a su vez, podría afectar su capacidad inmune. De hecho, también se ha sugerido que la heterocigosis de la descendencia podría mediarse por las combinaciones de edades parentales (Drummond y Rodríguez 2015).

En lo referente a los efectos de las edades parentales en la respuesta inmune innata de la progenie que podrían ser mediados por procesos parentales no genéticos, tres procesos podrían ser relevantes: la influencia de la experiencia inmunológica de ambos padres, proceso conocido como "transgenerational immune priming" (TGIP, por sus siglas en inglés) (Roth et al. 2010, 2012 y 2018), la transferencia de anticuerpos maternos a la descendencia (Grindstaff et al. 2003; Gasparini et al. 2006), y los cuidados parentales (Lobato et al. 2005; Owen et al. 2010). El TGIP ha sido documentado en numerosos organismos. Por ejemplo, en el chochín criollo, las madres inyectadas antes de la puesta con un lipopolisacárido que funciona como antígeno, producen crías hembra con una mayor respuesta inmune ante PHA, en comparación con las crías hembra engendradas por madres que no son expuestas a ningún reto inmune (Bowers et al. 2012). En la gaviota de patas negras (*Rissa tridactyla*) las madres infestadas por ectoparásitos del género *Ixodes* producen descendencia con mayor cantidad de anticuerpos que las madres no infestadas por ectoparásitos (Gasparini et al. 2006). De forma similar, las crías del pez aguja (*Syngnathus typhle*) cuyos padres y madres fueron infectados por bacterias del género *Vibrio* producen una mayor cantidad de linfocitos cuando son infectadas por la misma bacteria, a diferencia de las crías que son producidas por parejas donde un solo progenitor es infectado (Roth et al. 2012). Además, estudios similares en la misma especie de pez han encontrado que cuando uno o ambos padres están infectados por bacterias del género *Vibrio* se activan genes relacionados con la respuesta inmune innata en etapas neonatales tempranas de la progenie, y que únicamente cuando ambos padres están infectados por estas bacterias se expresan genes relacionados con la defensa inmune adquirida en etapas neonatales más tardías de la descendencia (Roth et al. 2010; Beemelmans y Roth 2016). Es decir, la interacción de la condición inmunológica del padre y de la madre podría tener una influencia en la expresión de genes relacionados con la capacidad inmune de la progenie en diferentes etapas de su desarrollo.

"The transgenerational immune priming" podría ser muy relevante porque, aunque estos

estudios no evalúan directamente la relación entre la edad de los padres y la capacidad inmune de la progenie, se sabe que los individuos senescentes podrían tener mayor probabilidad de ser infectados por patógenos (Williams y Day 2003; Palacios et al. 2011), y esta condición podría permitir que su progenie se vea dotada de una defensa inmune más preparada en contra de una mayor variedad de antígenos. Es decir, el TGIP podría favorecer a la descendencia de los individuos senescentes a pesar de que la respuesta inmune disminuya con la edad en la mayoría de los vertebrados (Palacios et al. 2007, 2011; Montgomery y Shaw 2015).

La transferencia de anticuerpos maternos hacia las crías es también un proceso bien documentado en aves (Gasparini et al. 2006; Hasselquist y Nilson 2009) y mamíferos (Reuman et al. 1983; Van Maanen et al. 1992), incluyendo humanos (Macchiaverni 2011). Aunque es de esperarse que la capacidad de transferir componentes inmunitarios a las crías durante su desarrollo prenatal varíe en relación con la edad materna (Beamonte-Barrientos et al. 2010), no hay estudios que hayan evaluado esta posibilidad empíricamente. Hasta ahora, algunos estudios en vertebrados y varios estudios en invertebrados, han documentado una influencia de la edad de las madres en el tamaño de los huevos o de las crías en etapas neonatales, y han asociado esta influencia con la calidad de los efectos maternos, específicamente con la provisión de sustancias nutritivas o inmunitarias de las madres hacia sus crías en etapas prenatales. Por ejemplo, en la avispa *Eupelmus vuilletti*, el tamaño y contenido nutricional de los huevos disminuye conforme avanza la edad de las madres (Giron y Casas 2003). En la carpa oceánica (*Sebastes alutus*) las madres viejas provisionan a sus crías con glóbulos de aceite más grandes que las madres jóvenes (Arnold et al. 2018). Y en el bobo de patas azules parece que la calidad de los efectos maternos pre-eclosión, relacionada con la edad de las hembras, influye en la calidad de la progenie: después de intercambios recíprocos de puestas entre madres de diferentes edades el éxito reproductivo (i.e., número de volantones) de las hembras adoptivas senescentes fue mayor cuando los huevos adoptados provinieron de madres de edades intermedias (en su pico reproductivo) que cuando provinieron de madres jóvenes o senescentes. Este estudio sugiere que las madres senescentes ajustan sus cuidados en función de la calidad prenatal de la descendencia, transfiriendo mayores componentes maternos al huevo cuando las crías provinieron de madres biológicas de edades intermedias (Beamonte-Barrientos et al. 2010).

Finalmente, la calidad de los cuidados parentales es otro factor no genético que podría subyacer al efecto de la edad de los padres en el desarrollo de la respuesta inmune innata de la progenie (Lobato et al. 2005; Owen et al. 2010). La capacidad de los padres para conseguir alimento y sitios reproductivos de calidad puede mejorar o empeorar con la edad (Komdeur 1995; Bradley y Safran 2014; Lecomte et al. 2010). La capacidad de los padres para proveer alimentos podría impactar en el estado nutricional y crecimiento de las crías, lo que podría afectar la producción de las macromoléculas que necesitan para la construcción de sus leucocitos (e.g., aminoácidos y lípidos), y por lo tanto, su respuesta inmune innata (Lobato et al. 2005; Owen et al. 2010). Por ejemplo, en el papamoscas cerrojillo se documentó que las crías con una menor masa corporal presentaron una respuesta inmune innata deficiente, reflejada como cocientes heterófilos/linfocitos y cantidades de heterófilos más altos, que las crías con mayor masa corporal (Lobato et al. 2005).

En adición a la habilidad de los padres para alimentar a sus crías, la capacidad de los padres para elegir sitios reproductivos que protejan a su descendencia de las inclemencias del ambiente (e.g., altas temperaturas, exposición a contaminantes) y de la incidencia de patógenos, podría influir en el desarrollo de la respuesta inmune innata de la progenie (Al-Murrani et al. 1997; Ruíz et al. 2002; Banbura et al. 2013). Por ejemplo, en dos especies de aves, el herrerillo común (*Cyanistes caeruleus*) y el carbonero común, se documentó que las crías eclosionados en hábitats con cobertura vegetal abundante y temperatura ambiental baja, presentaron cocientes de heterófilos/linfocitos menores que las crías nacidas en ambientes con poca cobertura vegetal y alta temperatura ambiental (Banbura et al. 2013). Estos estudios sugieren que el cambio en los cuidados parentales con la edad podría afectar la respuesta inmune innata de la progenie. Además, debido a que la inversión reproductiva de uno de los padres podría verse afectada por la edad del otro padre (Ramos et al. 2014 *b*; Drummond y Rodríguez 2015; Bowers et al. 2017), las combinaciones de edades parentales podrían tener impactos sobre diversos componentes de la respuesta inmune innata de la progenie que podrían ser mediados por cambios en los cuidados parentales (Ramos y Drummond 2018).

Indicadores celulares de la capacidad inmune innata en vertebrados

Algunos estudios biomédicos han utilizado la cantidad de leucocitos como indicador de la eficiencia de la respuesta inmune y se han enfrentado con la dificultad de interpretar si la cantidad de cualquier tipo de leucocito en un momento dado refleja la causa o la consecuencia de la exposición a un agente extraño (Duvfa y Allander 1995; Figuerola et al. 1999; Saks et al. 2003). Sin embargo, algunos estudios ecológicos, principalmente en aves, han documentado que ciertos tipos de leucocitos se correlacionan con diferentes parámetros fisiológicos que son afectados por la exposición a factores estresantes y que por lo tanto, podrían funcionar como indicadores de la inmunocompetencia mediada por estrés en animales (Davis et al. 2008). En estos estudios se ha observado que la cantidad de heterófilos y linfocitos en sangre periférica se ve influida por la exposición a temperaturas altas y otros factores estresantes (Al-Murrani et al. 1997; Ruiz et al. 2002; Davis et al. 2004; Krams et al. 2012). La exposición a condiciones de estrés se correlaciona, por separado, con un aumento en la cantidad de heterófilos y una disminución en el número de linfocitos en sangre periférica (Davis et al. 2008). Con base en estas observaciones, varios estudios ecológicos posteriores utilizaron la cantidad de heterófilos relativa a la cantidad de linfocitos (H:L) en sangre periférica como un indicador de la respuesta inmune innata en vertebrados, ya que valores bajos de este cociente reflejan una adecuada movilización de ambos tipos celulares en el organismo ante algún factor estresante, movilización que es fundamental para activar la respuesta inmune innata (Vleck et al. 2000; Lobato et al. 2005; Davis et al. 2008; Müller et al. 2011; Banbura et al. 2013). Durante la exposición a factores estresantes, los heterófilos fluyen desde la médula ósea hacia los vasos sanguíneos periféricos, mientras que los linfocitos se redistribuyen en otros compartimientos del cuerpo, por ejemplo, en los nódulos linfáticos, el bazo, la médula espinal y la piel (Davis et al. 2008). En algunas especies de aves como la gallina, el carbonero común y el gorrión mexicano (*Carpodacus mexicanus*), valores bajos de H:L están relacionados con una baja susceptibilidad a agentes infecciosos como *Salmonella typhimurium* y *Brucella abortus* (Al-Murrani et al. 2002; Davis et al. 2004; Krams et al. 2012), y con una baja infestación por garrapatas (Lobato et al. 2005). Asimismo, valores bajos de H:L se correlacionan con tasas altas de crecimiento y una probabilidad alta de reclutamiento en algunas especies de aves como el papamoscas cerrojillo (Moreno et al. 2002; Lobato et al. 2005).

En adición a los valores de H:L, se ha sugerido utilizar otros indicadores celulares, como la cantidad de eosinófilos en sangre circulante, para evaluar la capacidad inmune innata en vertebrados (Davis et al. 2008). Esto último porque el sistema inmunitario en vertebrados es sumamente complejo e involucra muchos tipos celulares con funciones diversas (Gordon 1955; Wojtaszek 2002; Belden y Kiesecker 2005), los cuales no han sido caracterizados ni entendidos en muchas poblaciones silvestres. La cantidad de eosinófilos suele relacionarse con varios agentes estresores como la presencia de parásitos. Por ejemplo, en la rana arbórea gris (*Hyla versicolor*) se encontró que altos niveles de estrés provocan una disminución en la cantidad de eosinófilos y a su vez, una alta susceptibilidad frente a endoparásitos del género *Alaria* (Belden y Kiesecker 2005); mientras que en el cobayo (*Cavia porcellus*) se ha observado que los individuos infectados por garrapatas (*Amblyomma americanum*) presentan bajas cantidades de eosinófilos (Brown et al. 1982). En esta tesis, utilicé los valores de H:L y la cantidad de eosinófilos en sangre circulante de crías de bobos de patas azules a los 20 y 35 días de edad como indicadores de la capacidad inmune innata.

El bobo de patas azules como modelo de estudio

El bobo de patas azules (*Sula nebouxii*) es un ave marina colonial que se reproduce estacionalmente en algunas islas del Pacífico tropical oriental. Estas aves presentan monogamia social (Nelson 1978). Las hembras ponen de uno a tres huevos y ponen sus huevos a intervalos de cuatro días (Drummond et al. 1986; Drummond y García Chavelas 1989). Ambos padres participan en la incubación durante 40 - 48 días, y cuidan y alimentan a los pollos durante tres o cuatro meses (Guerra y Drummond 1995). Este estudio se realizó en la colonia reproductiva de isla Isabel, México, en la cual se ha documentado que el intervalo de eclosión confiere ventajas competitivas a las crías que eclosionan primero, las cuales llegan a expulsar a sus hermanos menores del nido cuando la comida es escasa (fratricidio facultativo; Drummond et al. 1986; Drummond y García Chavelas 1989). A pesar de las desventajas competitivas que las segundas crías enfrentan respecto a sus hermanos mayores, ambos tipos de crías alcanzan masas y tamaños similares al emplumado (Drummond et al. 1991 y 2003). Ambos sexos contribuyen de forma similar al cuidado y alimentación de las crías, pero a partir de los 10 días de edad de

la nidada, las hembras, las cuales son 30% más pesadas que los machos, proporcionan a sus pollos una mayor cantidad de alimento y con mayor frecuencia durante el día que los machos; mientras los machos parecen dedicar más tiempo a la defensa del territorio (Guerra y Drummond 1995). Las crías comienzan su transición a la independencia a los 70 días de edad (Drummond et al. 2003) y, aproximadamente, un 35 % de los volantones producidos en Isla Isabel regresan a su población natal como individuos reproductores (Drummond et al. 2003). Los machos y hembras reclutas que regresan a reproducirse a Isla Isabel anidan en sitios que se encuentran hasta 39.4m y 42.2m de su sitio natal, respectivamente (Sin-Yeon et al. 2007).

Los bobos de patas azules pueden vivir más de 20 años y, en ambos sexos, el éxito reproductivo (número de volantones) incrementa con la edad hasta los 8-10 años, y a partir de entonces comienza a decaer (Beamonte-Barrientos et al. 2010; Velando et al. 2011). La proporción promedio de adultos senescentes (>12 años) en Isla Isabel, por temporada reproductiva es del 18%; la menor proporción de adultos reproductores senescentes registrada fue del 5% en el 2016, y la máxima fue del 36%, en el 2012 (datos obtenidos de 15 temporadas reproductivas, del 2002 al 2016). El lazo de pareja dura en promedio 1.7 años y puede durar hasta nueve años seguidos (Sánchez-Macouzet et al. 2014) y en 2011 el 11% de 423 crías provinieron de un macho fuera del lazo de pareja (Ramos et al. 2014 *a*). En esta población, es frecuente la formación de parejas donde los adultos tienen edades diferentes (Drummond y Rodríguez 2015; Ramos y Drummond 2018).

Una de las principales amenazas a las que se enfrentan las crías del bobo de patas azules y de otras aves es la infestación por ectoparásitos, debido a que presentan un sistema inmune inmaduro y una movilidad restringida (Ramos y Drummond 2017). *Carios denmarki* es el ectoparásito más común en la población de bobos de patas azules en la Isla Isabel. Esta garrapata presenta una movilidad limitada, su transmisión es pasiva y varía con la densidad de la población de hospederos (Ramos y Drummond 2017). Las hembras pueden poner de 5 a 500 huevos que eclosionan como larvas y pasan de 4 a 7 instares ninfales antes de convertirse en adultos. Las larvas usualmente toman varios días para extraer la sangre de sus hospederos, mientras que las ninfas toman una gran cantidad de sangre en tan solo 25 a 60 minutos. Las larvas son las que

infestan a las crías y se presentan en mayor abundancia cuando estas alcanzan cuatro semanas de edad (Ramos y Drummond 2018). El grado de infestación por estas garrapatas en las crías se relaciona con la combinación de edades parentales: las crías provenientes de padres con edades disímiles presentan una menor cantidad de garrapatas que las crías de padres similarmente jóvenes o similarmente viejos. (Ramos y Drummond 2018). Este resultado sugiere que la inmunocompetencia en las crías, en específico la eficiencia de su respuesta inmune innata, que es la primera en activarse ante cualquier patógeno, podría ser un mecanismo que module el efecto de la combinación de edades parentales tanto en la infestación por garrapatas como en la probabilidad de reclutamiento de las crías.

ANTECEDENTES

Hasta ahora, en pocas especies se ha evaluado el impacto de las diferentes combinaciones de edades parentales sobre componentes de calidad de la progenie (Drummond y Rodríguez 2015). En invertebrados, un solo estudio en *Drosophila melanogaster* ha explorado el efecto combinado de la edad de ambos padres en la calidad de la progenie. Sugiere que el nivel de asimetría en estructuras bilaterales (longitud y ancho de las alas y longitud de los fémures) incrementa conforme aumenta la edad de ambos progenitores, y que esto podría tener implicaciones para la supervivencia de la progenie (Colines et al. 2015). Algunos estudios en humanos han revelado que la probabilidad de que los recién nacidos presenten labio leporino aumenta conforme avanza la edad de la madre, después de los 35 años, pero solo si la edad del padre también es mayor a 35 años (Bille et al. 2005). Así mismo, se ha observado que la probabilidad de que la progenie presente síndrome de Down aumenta cuando el padre tiene más de 35 años, pero solo si la hembra tiene más de 35 años (Fisch et al. 2003).

Hasta ahora, únicamente cuatro estudios en animales silvestres han evaluado cómo la combinación de edades parentales afecta diferentes atributos relacionados con la adecuación en la progenie. Un estudio en el pájaro bobo de patas azules en la Isla Isabel, Nayarit, demostró que la combinación de edades de los padres influye en la probabilidad de reclutamiento de los volantones: las crías de madres jóvenes apareadas con padres viejos y de madres viejas apareadas con padres jóvenes tienen mayor probabilidad de reclutar que las crías de padres

similarmente jóvenes o similarmente viejos (Drummond y Rodríguez 2015). Otro estudio reciente en dos especies de lémures en cautiverio documentó que existe una disminución en el tamaño de la camada cuando la madre es 4 años más vieja que el padre, pero que la sobrevivencia de las crías hasta el destete es mayor cuando las madres viejas se aparean con padres jóvenes (Tidière et al. 2018). Otro estudio reciente en el chochín criollo evaluó cómo la capacidad inmunitaria de la descendencia se ve afectada por la combinación de las edades parentales, lo cual puede tener implicaciones directas para la supervivencia juvenil (Juul-Madsen et al. 2008; Owen et al. 2010). La respuesta inflamatoria de las crías ante fitohematoglutina (PHA) es mayor cuando la madre es vieja (i.e., tres o más años) y el padre joven (1 año) (Bowers et al. 2017). Además de mostrar que la respuesta inmune de las crías se ve afectada por la interacción de la edad de ambos padres, este estudio sugiere que puede haber emparejamientos selectivos con base en la combinación de edades parentales que pueden favorecer la respuesta inflamatoria de las crías ante PHA y, posiblemente, la capacidad inmune de la descendencia (madre vieja y padre joven). La combinación de edades parentales donde la hembra es vieja y el padre joven es común en la población de chochines y se mantiene constante a lo largo de la temporada reproductiva (Bowers et al. 2017), y se ha sugerido que las hembras podrían estar evaluando un rasgo en los machos que está relacionado con proporcionar una mayor inmunocompetencia, y por lo tanto, mayores probabilidades de sobrevivir a su descendencia (Bowers et al. 2017).

El cuarto estudio enfocado en entender cómo la combinación de edades parentales podría influir en las capacidades de la prole proviene también del programa de monitoreo de largo plazo de la biología reproductiva del bobo de patas azules, en Isla Isabel, Nayarit. Las crías de parejas con un padre joven y el otro viejo presentan un menor nivel de infestación por garrapatas *Carios denmarki* que las crías de parejas donde ambos padres son jóvenes o viejos (Ramos y Drummond 2018). Sugiere que las crías de un progenitor viejo y el otro joven tienen mayores probabilidades de reclutar que las crías de padres similarmente jóvenes o similarmente viejos (Drummond y Rodríguez 2015). Podría ser mediado por una interacción de las edades parentales sobre la capacidad inmune de las crías. Estos dos últimos estudios del bobo de patas azules son la base que fundamenta mis siguientes objetivos e hipótesis de trabajo.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar cómo las edades de ambos padres en el bobo de patas azules influyen en la respuesta inmune innata de la progenie, e identificar si esta influencia de las edades parentales en la respuesta inmune innata de la progenie podría deberse a mecanismos que actúan a nivel (1) genético o de efectos maternos (antes del nacimiento) versus (2) a nivel de cuidados parentales.

Objetivos específicos

- Evaluar mediante un experimento de intercambio recíproco de puestas si la edad de la madre biológica y la edad del padre biológico tienen un efecto de interacción sobre diferentes indicadores celulares de la respuesta inmune innata de las crías (i.e, efectos de la edad parental vía genética o por medio de efectos maternos no genéticos).
- Evaluar mediante el mismo experimento de intercambio recíproco de puestas si la edad de la hembra adoptiva y la edad del macho adoptivo tienen un efecto de interacción sobre diferentes indicadores celulares de la respuesta inmune innata de las crías adoptadas (i.e, efectos de la edad parental mediados por los cuidados parentales).

HIPÓTESIS Y PREDICCIONES

Hipótesis 1. Efecto de las edades de ambos padres biológicos sobre la inmunidad innata de la progenie

Las crías engendradas por parejas donde un consorte es joven y el otro viejo tienen una mayor respuesta inmune innata que las crías engendradas por parejas donde ambos consortes son jóvenes o viejos.

Predicciones

Las crías engendradas por parejas donde un consorte es joven y el otro viejo y que estuvieron bajo el cuidado de parejas adoptivas jóvenes, tendrán:

- 1A. Valores del cociente heterófilos: linfocitos (H:L) más bajos
- 1B. Conteos de heterófilos más bajos
- 1C. Conteos de eosinófilos mayores

que las crías engendradas por parejas donde ambos consortes son jóvenes y que estuvieron bajo el cuidado de parejas adoptivas igualmente jóvenes.

Hipótesis 2. Efecto de las edades de ambos adultos adoptivos sobre la inmunidad innata de la progenie

Las crías cuidadas por parejas donde un consorte es joven y el otro viejo tienen una mayor respuesta inmune innata que las crías cuidadas por parejas donde ambos consortes son jóvenes o viejos.

Predicciones

Las crías adoptadas por parejas donde un consorte es joven y el otro viejo y que fueron engendradas por una hembra y un macho joven tendrán:

- 2A. Valores del cociente heterófilos: linfocitos (H:L) más bajos
- 2B. Conteos de heterófilos más bajos
- 2C. Conteos de eosinófilos mayores

que las crías adoptadas por parejas donde ambos consortes son jóvenes y que fueron engendradas por una madre y un padre joven.

JUSTIFICACIÓN

Este estudio será la primera evaluación de cómo la combinación de edades parentales influye en la respuesta inmune innata de la progenie en una población silvestre donde ambos padres contribuyen con el cuidado de las crías. Permitirá tener un mejor entendimiento de los mecanismos que podrían mediar la influencia de la edad de ambos padres en la viabilidad de la descendencia, ya que por primera vez se evaluará experimentalmente si el posible efecto combinado de las edades parentales puede atribuirse a procesos que actúan a (1) nivel genético o de efectos maternos versus (2) nivel de cuidados parentales. En particular, los resultados de este estudio permitirán entender si la relación entre las edades parentales y la probabilidad de reclutamiento y la infestación por garrapatas en las crías del bobo de patas azules podría atribuirse a un efecto combinado de las edades parentales en la respuesta inmune innata de la progenie.

Además de la relevancia que este trabajo de investigación podría tener para el estudio de la senescencia en poblaciones silvestres, sus resultados podrían tener implicaciones importantes para la elección de pareja. Esto porque la respuesta inmune innata es un importante indicador de la calidad de las crías que influye en su sobrevivencia a corto y largo plazo, y si la edad propia y de la pareja pueden influir en esta cualidad de la descendencia, entonces los individuos deberían elegir a su pareja en función de atributos que reflejen su edad y que maximicen la viabilidad de la descendencia en un evento reproductivo dado. Asimismo, los resultados de este trabajo podrían tener implicaciones para la dinámica de las poblaciones, ya que las diferentes combinaciones de edades parentales podrían dar lugar a variación en la capacidad inmunitaria de la descendencia, y esta variación podría influir en las tasas de supervivencia y reclutamiento, y por lo tanto, en la tasa de crecimiento poblacional.

METODOLOGÍA

Área de estudio

El estudio se realizó del 17 de febrero al 01 de junio del 2017 en la colonia reproductiva de bobos de patas azules de Isla Isabel, una isla volcánica tropical de 194.17 ha, situada a 28 Km de la costa de Nayarit, en el Pacífico Mexicano (21°51' N, 105°53' O; CONANP 2005). Esta isla presenta un clima cálido con lluvias de mayo a septiembre (Ruiz 1977). La isla está cubierta principalmente por un bosque tropical caducifolio, conformado por el roache (*Crataeva tapia*) y el papelillo (*Euphorbia schlechtendalli*) como especies arbóreas o arbustivas (CONANP 2005). También hay pastizales compuestos por el camalote (*Trichachne insularis*), coquillo rojo (*Cyperus ligularis*) y el guachapure (*Cenchrus viridis*) (Mayani-Parás et al. 2015). Existen zonas sin vegetación: playas, isleos y litoral rocoso (CONANP 2005). La zona de monitoreo de la colonia de bobos de patas azules se localiza en la cara este de la isla. En esta zona, los nidos pueden establecerse dentro del bosque o en el borde de la playa, entre los manchones de pastizal o en la arena desnuda (Mayani-Parás et al. 2015).

Procedimientos generales

La colonia de bobos de patas azules de Isla Isabel ha sido monitoreada cada año desde 1988 en dos áreas de estudio de 20800 m² y 6089 m², separadas aproximadamente por 400 m. En estas

dos áreas de estudio se establece aproximadamente el 65% de todas las parejas reproductivas en la isla (Sánchez-Macouzet et al. 2014). En promedio, en la zona de estudio se establecen 825 nidos (\pm desviación estándar: 266 parejas) cada temporada reproductiva, entre diciembre y julio (Torres y Drummond 1999). Aproximadamente, el 90% de los adultos en la colonia están marcados con anillos de acero grabados con una identidad alfanumérica individual.

Durante el monitoreo de la biología reproductiva del bobo de patas azules, cada nido encontrado es marcado con una estaca numerada, y su contenido es revisado cada tercer día. Una vez que la mayoría de los pollos en la colonia alcanzan 30 días de edad, la revisión de nidos se realiza cada seis días (Drummond et al. 2003). De cada nido se registra la identidad de ambos adultos durante tres observaciones independientes de sus anillos; el sexo de los adultos se determina con base en sus vocalizaciones: los machos emiten un silbido agudo; mientras que las hembras emiten un graznido grave (Sánchez-Macouzet et al. 2014). La edad de los adultos reproductores es estimada con base en la diferencia (en años) entre su año de nacimiento y el año de reproducción corriente.

Durante el monitoreo, se registra la fecha de puesta y de eclosión de cada huevo, así como el destino de cada huevo o pollo, es decir, si los huevos son depredados, desaparecen, o eclosionan, y si los pollos son depredados, desaparecen, o se encuentran vivos o muertos en el nido o cercanos a este (Drummond et al 2003). Cuando no es posible conocer la fecha probable de puesta de los huevos durante el monitoreo, esta se estima por medio del método de flotación de huevos o a partir de la fecha de eclosión de los mismos (Drummond et al. 1991). Cuando no es posible estimar la fecha de eclosión durante el monitoreo, esta se estima contrastando las primeras medidas de longitud del pico y de la ulna, y la masa de los pollos con curvas de crecimiento estandarizadas para diferentes tipos de cría (primera, segunda o tercera cría en eclosionar) (Drummond et al. 1991). Cada cría recién eclosionada se mide (longitud de ulna y pico en mm), se pesa y se marca con un anillo de plástico con una identidad alfanumérica individual, y se monitorea su supervivencia hasta alcanzar los 70 días de edad, cuando son consideradas volantones y comienzan a hacer la transición a la independencia (Drummond et al. 2003). A los 70 días de edad, el anillo de plástico es reemplazado por un anillo de acero

(Drummond et al. 2003). El sexo de las crías no se determina ni visual ni auditivamente, ya que antes de la adultez las crías no presentan ningún tipo de dimorfismo; el sexo de las crías es determinado hasta que algunas de ellas (aproximadamente el 35 %; Drummond et al. 2003) regresan a la colonia como adultos reproductores, entre los 2 y 6 años de edad (Drummond et al 2003; Ancona y Drummond 2013).

Diseño experimental

Durante la temporada reproductiva de 2017, se realizó un intercambio recíproco de puestas entre parejas de adultos con diferentes combinaciones de edades, de la siguiente forma: (A) intercambios entre parejas donde el macho era joven y la hembra vieja versus parejas donde ambos adultos eran jóvenes; (B) intercambios entre parejas donde el macho era viejo y la hembra joven versus parejas donde ambos adultos eran jóvenes; (C) intercambios entre parejas donde ambos adultos eran jóvenes (Grupo control). No fue posible incluir la combinación de edades parentales macho viejo - hembra vieja en estos intercambios porque tales parejas son poco abundantes en la población. Los individuos se consideraban como jóvenes si tenían entre 4 y 10 años de edad, y como viejos si tenían >12 años de edad. Esta clasificación de clases de edad se hizo con base en el decaimiento en la probabilidad de reclutamiento de las crías con relación a la edad de ambos padres, reportado por Drummond y Rodríguez (2015).

Para realizar los intercambios de puestas se llevó a cabo el siguiente procedimiento. Se marcó con lápiz el orden en que cada huevo fue puesto por la hembra en nidos donde ambos padres estaban anillados, y eran adultos de edad conocida. Cuando el orden de puesta no se conocía con exactitud, este y la edad de la puesta se determinaron con base en la flotación de los huevos. Solamente se intercambiaron nidadas entre parejas con el mismo número de huevos y cuyas fechas de puesta de su primer huevo no diferían entre sí en más de seis días. Con base en este diseño experimental se generaron los tratamientos de intercambios entre padres biológicos y adoptivos presentados en la Tabla 1.

Tabla 1. Tratamientos experimentales generados con base en el intercambio recíproco de puestas. MJ = macho joven, HJ = hembra joven, MV = macho viejo y HV = hembra vieja.

Tratamientos	Padres biológicos	Padres adoptivos
Control	MJ-HJ	MJ-HJ
Grupo 1	MV-HJ	MJ-HJ
Grupo 2	MJ-HV	MJ-HJ
Grupo 3	MJ-HJ	MV-HJ
Grupo 4	MJ-HJ	MJ-HV

Recolección de muestras de sangre

Entre el 17 de febrero y el 01 de junio de 2017, se obtuvieron muestras de sangre de las crías resultantes de los intercambios recíprocos cuando estas tuvieron 20 y 35 días de edad, con el objetivo de estimar su respuesta inmune innata. La respuesta inmune innata pudo ser inducida, entre otras cosas, por la presencia de garrapatas *Carios denmarki* y otros ectoparásitos como moscas hipoboscidas o los patógenos que estas podrían transmitir (e.g., *Escherichia coli*, *Francisiella tularensis*; Lehmann 1993; Willadsen y Jongejan 1999). Las garrapatas son los ectoparásitos más comunes en las crías de los bobos de patas azules en Isla Isabel (Ramos y Drummond 2018), y suelen encontrarse principalmente debajo de las axilas (Ramos y Drummond 2017). La probabilidad de observar una activación de la respuesta inmune en las crías podría ser mayor durante los 20 y 35 días de edad, cuando la infestación por garrapatas es mayor en la colonia focal (Ramos y Drummond 2017).

De cada cría focal se recolectaron 10µl de sangre por medio de una punción en la vena braquial; esta sangre se depositó en un tubo microtainer con anticoagulante de ácido etilendiaminotetracético (EDTA) (Deschka, 2016; BD Vacutainer, 2016). Las muestras de sangre se transportaron en una hielera con bolsas de gel refrigerante para mantener una temperatura de 2-5 °C y evitar así que los leucocitos sufrieran precipitación, modificaciones estructurales o muerte (OIE 2008). En un lapso no mayor a dos horas después de la toma de sangre, se realizaron tres frotis por cada muestra, cada uno se hizo con 5µl de sangre, utilizando la técnica del portaobjetos en cuña (Naranjo, 2008, Carr y Rodak, 2010). A cada barrido de

sangre se le aplicó una tinción con colorante de Wright (Naranjo, 2008; MATERLAB, 2013; Carr y Rodak, 2010). Los frotis se almacenaron en un lugar seco y fresco durante 17 semanas y posteriormente se observaron en el microscopio y se hicieron los conteos de leucocitos (linfocitos, monocitos y granulocitos: heterófilos, eosinófilos y basófilos).

Este estudio se llevó a cabo bajo las normas éticas de la Animal Behavior Society y las normas mexicanas para la investigación en Parques Nacionales, y Conservación y Bienestar Animal. La especie de estudio no está clasificada como “en peligro” o protegida por la norma 059-2010 de la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). Los métodos de monitoreo fueron aprobados por la Dirección General de Vida Silvestre y la Secretaría de Gestión para la Protección Animal (permiso SEMARNAT SGPA/DGVS/11084/16). La toma de muestras de sangre se llevó a cabo bajo sombra y tomó menos de cinco minutos por individuo, tras lo cual, las crías fueron devueltas a sus nidos, donde fueron aceptados inmediatamente por los padres. Ninguna de las crías manipuladas pereció durante la manipulación ni en las 48 horas posteriores a la colecta de sangre.

Conteo de leucocitos

Se realizaron varias prácticas de identificación de los diferentes grupos de leucocitos y los conteos se hicieron siguiendo la metodología de Carr y Rodak (2010). Primero, se realizó una evaluación global de la calidad de los frotis mediante un barrido a lo largo de todo el frotis con un microscopio binocular modelo Primo Star usando el objetivo 10X. Se puso especial atención en la calidad de la coloración y la adecuada distribución de las células, y con base en estos dos criterios se eligió el mejor de los tres frotis que fueron obtenidos por cada muestra de sangre correspondiente a cada cría focal. Posteriormente, utilizando el objetivo 40X se localizó la monocapa del frotis, es decir, el área donde las células se encuentran distribuidas uniformemente y apenas se tocan unas con otras, o donde no más de dos o tres células se superponen. En esta zona de la monocapa del frotis se hizo el conteo de las células en 10 campos diferentes elegidos al azar, y se calculó el promedio de leucocitos por campo. El promedio se multiplicó por dos, una constante con la que se obtiene la aproximación de leucocitos totales por mm^3 . Después, usando el objetivo 100X sobre la monocapa del frotis, se hizo el recuento diferencial de

leucocitos. Para ello, se contaron y clasificaron 100 leucocitos consecutivos de modo sistemático, haciendo un recorrido en patrón de guarda griega. A partir de este conteo se obtuvo un porcentaje de cada tipo celular. Finalmente, se obtuvieron los valores absolutos de cada tipo de leucocito por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{Total de células de la línea celular} = \frac{\% \text{ de la línea celular} \times \text{total de leucocitos}}{100}$$

Antes de iniciar con los conteos formales, se realizaron pruebas de confiabilidad para estimar la consistencia intra-observador en los conteos de leucocitos por campo con el objetivo 40X. Estas pruebas se realizaron con el índice α de Conbrach (Gliem y Gliem 2003; Tovakol y Dennick 2011), el cual asume que los datos miden un mismo constructo y que están altamente correlacionados. Cuanto más cerca de 1 sea el valor de alfa de Conbrach, mayor es la consistencia interna de las mediciones. Las pruebas de confiabilidad se realizaron sobre tres conteos repetidos de 50 campos, y los valores obtenidos se analizaron en el programa de cómputo estadístico R versión 3.5.0 (R Core Team, 2018). Los valores de alfa de Conbrach obtenidos en estos tres conteos repetidos fueron 0.97, 0.98 y 0.99.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Como variables dependientes utilicé tres indicadores de la respuesta inmune innata de las crías: el cociente heterófilos: linfocitos, el número de heterófilos y el número de eosinófilos en sangre periférica, todos a los 20 y 35 días de edad de las crías focales. El cociente heterófilos:linfocitos se calculó dividiendo el número de heterófilos entre el número de linfocitos, y calculé el logaritmo decimal de estos cocientes para obtener una distribución normal (Osborne 2002; Benoit 2011). El número de heterófilos y el número de eosinófilos no fueron transformados y se utilizaron como conteos en los análisis.

Para poner a prueba mi primera hipótesis, la cual propone que las crías engendradas por parejas donde un consorte es joven y el otro viejo tendrán una mayor respuesta inmune innata que las crías engendradas por parejas donde ambos consortes son jóvenes, utilicé los datos de las crías cuyos padres biológicos eran joven-joven, viejo-joven o joven-vieja, pero que fueron adoptadas

por parejas de adultos jóvenes. De esta manera mantuve constante el efecto de la edad de los adultos adoptivos, y por lo tanto, los efectos de la edad parental que podrían ser mediados por la calidad de los cuidados parentales.

Para poner a prueba mi hipótesis dos, la cual propone que las crías adoptadas por parejas donde un consorte es joven y el otro viejo tendrán una mayor respuesta inmune innata que las crías adoptadas por parejas donde ambos consortes son jóvenes, utilicé los datos de las crías que fueron adoptadas por parejas con combinaciones de edades joven-joven, viejo-joven y joven-vieja, pero cuyos padres biológicos y madres biológicas eran todos y todas jóvenes. Así, pude evaluar el efecto de las combinaciones de edades de los adultos adoptivos mientras mantenía constante el efecto de las edades de los padres biológicos, y por lo tanto, los efectos de la edad parental que podrían ser mediados por procesos genéticos y/o maternos no genéticos.

En los análisis estadísticos la edad de los padres se incluyó como variable cuantitativa. Esto me permitió considerar el efecto de la variación en edades que existe dentro de cada categoría de edades parentales. Utilicé Modelos Lineales Generalizados (GLMs por sus siglas en inglés) asumiendo una distribución de errores tipo normal y una función de enlace identidad, para examinar el impacto de las edades de los padres biológicos o de los padres adoptivos (por separado) sobre el cociente heterófilos:linfocitos (\log_{10}) de las crías a los 20 y 35 días de edad (dos GLMs, uno por cada edad de las crías). En estos GLMs incluí la interacción edad de la madre biológica o adoptiva x edad del padre biológico o adoptivo, así como los efectos aditivos de los términos lineales y cuadráticos de las edades de ambos padres biológicos o adoptivos.

El término cuadrático de la edad calculado como x^2 no fue incluido en el modelo durante el procedimiento de selección de modelos porque podría presentar una alta colinealidad con el término lineal de la edad y producir resultados espurios. En su lugar, utilicé el polinomial ortogonal de segundo orden, calculado por medio de una regresión polinomial cuadrática (Crawley 2007). Además, incluí como covariables el número de garrapatas presentes en las crías focales a los 24 y 32 días de edad (las fechas más cercanas a las fechas de recolección de muestras de sangre periférica de las crías focales). El número de garrapatas presentes en las crías

focales fue estimado por Samantha Laguna, quien evaluó la infestación de las garrapatas entre los 24 y 32 días de edad (cerca del pico de aparición en las crías; Ramos y Drummond 2018).

En estos GLMs incluí la fecha Juliana de eclosión de las crías focales como covariable para tomar en consideración las fluctuaciones en las condiciones ambientales a lo largo de la temporada reproductiva sobre la respuesta inmune innata (Lobato et al. 2005; Owen et al. 2010). Incluí también como covariable el tamaño de la nidada (1 o 2 crías) porque este puede influir en la cantidad de alimento que recibe cada cría (Drummond et al. 2003), y por lo tanto, en el desarrollo y mantenimiento de su respuesta inmune innata (Lobato et al. 2005; Owen et al. 2010). Además, incluí como covariable el orden de eclosión de cada cría focal (primera o segunda) porque este afecta su alimentación y su experiencia social (Drummond et al. 2003), y esto a su vez puede repercutir en su respuesta inmune (Beamonte-Barrientos et al. 2010).

Respuesta inmune innata= padre biol * madre biol + padre biol² + madre biol² + garrap 20d + garrap 35d + fecha eclosión + orden de eclosión + tamaño de la nidada

Respuesta inmune innata= ♂ adopti * ♀ adopti + ♂ adopti² + ♀ adopti² + garrap 20d + garrap 35d + fecha eclosión + orden de eclosión + tamaño de la nidada

Utilicé un GLM con distribución Poisson y una función de enlace log para examinar el efecto de la interacción entre las edades de ambos padres biológicos o adoptivos (por separado) sobre el número de heterófilos (# células x 10⁹/litro) de las crías focales a los 35 días de edad. Además de incluir la interacción entre los términos lineales de las edades de los padres biológicos o adoptivos, y los efectos aditivos de los términos lineales y cuadráticos de las edades de ambos padres biológicos o adoptivos, incluí el número de garrapatas presentes en las crías focales a los 24 y 32 días de edad, el tamaño de la nidada, la fecha Juliana de eclosión y el orden de eclosión de las crías focales como covariables. Para examinar el efecto de la interacción entre las edades de ambos padres biológicos o adoptivos (por separado) sobre el número de heterófilos a los 20 días de edad y el número de eosinófilos (# células x 10⁹/litro) a los 20 y 35 días de edad de las crías, utilicé GLMs con distribución quasipoisson y una función de enlace log para considerar

la sobre-dispersión en estos conteos celulares, según lo sugerido por Crawley (2007). En estos GLMs con distribución quasipoisson también incluí los efectos aditivos de los términos lineales y cuadráticos de las edades de ambos padres biológicos o adoptivos y las mismas covariables que consideré en los GLMs descritos arriba.

Selección de modelos

En cada análisis, seleccioné un modelo mínimo adecuado mediante remoción secuencial de variables (Crawley 2007), partiendo de un modelo general que incluía la interacción de interés, los términos cuadráticos y las covariables. Para los GLMs con distribución normal, para la variable H:L, estimé la significancia estadística relacionada con el cambio en varianza ocasionado por la remoción de cada interacción y término de interés. Para la selección de modelos con distribución Poisson y quasipoisson para las variables número de heterófilos y eosinófilos, estimé la significancia estadística relacionada con el cambio en devianza causado por la remoción de las interacciones y términos de interés. Al final de cada proceso de remoción secuencial de variables, comparé el ajuste de cada modelo mínimo adecuado con el ajuste de un modelo nulo (sin variables explicativas), según lo sugerido por Crawley (2007). Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa de computo estadístico R versión 3.5.0 (R Core Team, 2018).

RESULTADOS

Se realizaron 93 intercambios recíprocos de puestas, los cuales involucraron 362 huevos. De los pollos eclosionados, solamente 62 pollos pertenecientes a 51 nidos sobrevivieron al menos hasta los 20 días de edad. De esta muestra, solamente un pollo del grupo control murió antes de cumplir 50 días de edad, y a tres pollos pertenecientes a dos nidos distintos, del grupo control, ya no se les dio seguimiento después de que cumplieron 20 días de edad debido a que el programa de monitoreo de 2017 terminó antes de que estos pollos cumplieran 35 días. Además, excluí un pollo perteneciente al grupo control, cuyos leucocitos no se fijaron correctamente en ninguno de sus frotis (Tabla 2). Por lo tanto, hice el conteo diferencial de leucocitos en 61 frotis de pollos de 20 días de edad y en 58 frotis de pollos de 35 días de edad. La reducción drástica en el tamaño de muestra de 362 huevos intercambiados a solamente 62 crías se debió a una alta

depredación de huevos por gaviotas pardas (*Larus heermanni*) y de pollos menores de cinco días de edad por culebras falsa coralillo (*Lampropeltis triangulum*) (Mendoza-Hernández y Drummond, datos no publicados).

Tabla 2. Total de nidos y pollos pertenecientes a cada tipo de intercambio en función de la combinación de edades de los padres biológicos y adoptivos. MJ = macho joven, HJ = hembra joven, MV = macho viejo y HV = hembra vieja

Tipos de intercambio	Padres biológicos	Padres adoptivos	Total de nidos	Total de pollos muestreados a los 20 días de edad	Total de pollos muestreados a los 35 días de edad
Control	MJ-HJ	MJ-HJ	25	29	26
1	MV-HJ	MJ-HJ	4	5	5
2	MJ-HV	MJ-HJ	7	9	9
3	MJ-HJ	MV-HJ	7	9	9
4	MJ-HJ	MJ-HV	8	9	9

Efecto de las edades de ambos padres biológicos sobre la inmunidad innata de la progenie (Hipótesis 1)

No se encontró ningún efecto de la combinación de las edades de los padres biológicos en ninguno de los indicadores de respuesta inmune innata de las crías (i.e., la interacción edad de la madre biológica x edad del padre biológico no fue estadísticamente significativa) en ninguna de las dos edades (20 y 35 días; Tabla 3 y 4). Tampoco se encontró efecto independiente de la edad de la madre biológica a los 20 y 35 días de edad de la progenie en ninguno de los indicadores de respuesta inmune innata (tabla 3 y 4). La edad del padre biológico se correlacionó positivamente con el número de heterófilos de las crías cuando estas alcanzaron los 35 días de edad, pero no a los 20 días (Tabla 3 y 4). Las crías engendradas por machos jóvenes, de entre 5 y 10 años de edad presentaron conteos de heterófilos hasta 33% más bajos que los que presentaron las crías engendradas por machos viejos, de entre 14 y 19 años (Figura 1). Sin embargo, la edad del padre biológico no influyó ni en los cocientes H:L ni en el número de eosinófilos de las crías, ni a los 20 ni a los 35 días de edad (Tabla 3 y 4).

Tabla 3. Resultados de tres modelos lineales generalizados utilizados para examinar el efecto de las edades de los padres biológicos sobre la respuesta inmune innata de 35 pollos a los 20 días de edad.

MODELO CON DISTRIBUCIÓN NORMAL

Variable de respuesta	Variabes explicativas	Coefficiente (error estándar)	Cambio en varianza	P
Cociente heterófilos: linfocitos	Edad del padre biológico* edad de la madre biológica	-0.002 (0.01)	0.06	0.80
	Edad del padre biológico ²	-0.26 (0.34)	0.60	0.44
	Edad de la madre biológica ²	0.40 (0.38)	1.12	0.29
	Edad del padre biológico	-0.007 (0.01)	0.18	0.67
	Edad de la madre biológica	-0.005 (0.01)	0.19	0.65
	No. de garrapatas a los 24d	-0.002 (0.005)	0.22	0.63
	No. de garrapatas a los 32d	-0.007 (0.006)	1.42	0.24
	Fecha de eclosión	0.02 (0.004)	27.65	<0.001
	Tamaño de la nidada	0.05 (0.14)	0.15	0.69
	Orden de eclosión	-0.05 (0.13)	0.15	0.69

MODELOS CON DISTRIBUCIÓN QUASI-POISSON

Variable de respuesta	Variabes explicativas	Coefficiente (error estándar)	Cambio en devianza	P
Conteo de heterófilos	Edad del padre biológico* edad de la madre biológica	-0.01 (0.02)	0.56	0.45
	Edad del padre biológico ²	-0.49 (0.59)	0.68	0.41
	Edad de la madre biológica ²	-0.10 (0.68)	0.02	0.87
	Edad del padre biológico	0.0008 (0.03)	0.0007	0.97
	Edad de la madre biológica	-0.02 (0.02)	1.65	0.20
	No. de garrapatas a los 24d	0.0008 (0.009)	0.008	0.92
	No. de garrapatas a los 32d	0.006 (0.01)	0.44	0.51
	Fecha de eclosión	0.01 (0.009)	3.73	0.06
	Tamaño de la nidada	-0.04 (0.28)	0.03	0.86
	Orden de eclosión	-0.49 (0.22)	4.80	0.03

Conteo de eosinófilos	Edad del padre biológico*	-0.007 (0.02)	0.08	0.77
	edad de la madre biológica			
	Edad del padre biológico ²	-1.13 (0.74)	2.36	0.13
	Edad de la madre biológica ²	-0.58 (0.86)	0.45	0.50
	Edad del padre biológico	0.02 (0.03)	0.34	0.56
	Edad de la madre biológica	0.01 (0.03)	0.14	0.70
	No. de garrapatas a los 24d	0.007 (0.01)	0.34	0.56
	No. de garrapatas a los 32d	-0.01 (0.01)	1.37	0.25
	Fecha de eclosión	0.02 (0.01)	3.85	0.05
	Tamaño de la nidada	-0.27 (0.33)	0.71	0.40
	Orden de eclosión	0.11 (0.33)	0.11	0.74

Los valores de P en negritas representan las variables explicativas retenidas en los modelos mínimos adecuados.

Tabla 4. Resultados de tres modelos lineales generalizados utilizados para examinar el efecto de las edades de los padres biológicos sobre la respuesta inmune innata de 33 pollos a los 35 días de edad.

MODELO CON DISTRIBUCIÓN NORMAL

Variable de respuesta	Variabes explicativas	Coficiente (error estándar)	Cambio en varianza	P
Cociente heterófilos: linfocitos	Edad del padre biológico* edad de la madre biológica	0.0002 (0.01)	0.0004	0.98
	Edad del padre biológico ²	-0.75 (0.39)	3.54	0.07
	Edad de la madre biológica ²	0.32 (0.38)	0.75	0.39
	Edad del padre biológico	0.01 (0.02)	0.22	0.64
	Edad de la madre biológica	0.01 (0.01)	1.47	0.23
	No. de garrapatas a los 24d	-0.0007 (0.007)	0.009	0.92
	No. de garrapatas a los 32d	-0.01 (0.008)	1.47	0.23
	Fecha de eclosión	0.005 (0.005)	0.96	0.33
	Tamaño de la nidada	-0.14 (0.17)	0.74	0.39
	Orden de eclosión	-0.18 (0.15)	1.40	0.24

MODELO CON DISTRIBUCIÓN POISSON

Variable de respuesta	Variabes explicativas	Coficientes (error estándar)	Cambio en devianza	P
Conteo de heterófilos	Edad del padre biológico* edad de la madre biológica	-0.01 (0.01)	0.55	0.45
	Edad del padre biológico ²	-0.49 (0.38)	1.62	0.20
	Edad de la madre biológica ²	0.62 (0.43)	2.10	0.14
	Edad del padre biológico	0.06 (0.01)	15.88	<0.001
	Edad de la madre biológica	0.006 (0.01)	0.14	0.70
	No. de garrapatas a los 24d	0.01 (0.006)	2.44	0.11
	No. de garrapatas a los 32d	-0.01 (0.008)	1.38	0.23
	Fecha de eclosión	-0.003 (0.007)	0.20	0.65
	Tamaño de la nidada	0.10 (0.16)	0.45	0.50
	Orden de eclosión	0.18 (0.13)	2.05	0.15

MODELO CON DISTRIBUCIÓN QUASI-POISSON

Variable de respuesta	Variables explicativas	Coefficientes (error estándar)	Cambio en devianza	P
Conteo de eosinófilos	Edad del padre biológico* edad de la madre biológica	-0.01 (0.02)	0.58	0.45
	Edad del padre biológico ²	-0.90 (0.65)	1.92	0.17
	Edad de la madre biológica ²	-0.43 (0.72)	0.37	0.54
	Edad del padre biológico	0.04 (0.03)	2.55	0.12
	Edad de la madre biológica	-0.01 (0.03)	0.16	0.68
	No. de garrapatas a los 24d	0.01 (0.009)	1.36	0.25
	No. de garrapatas a los 32d	0.02 (0.01)	5.11	0.03
	Fecha de eclosión	-0.006 (0.01)	0.39	0.53
	Tamaño de la nidada	-0.32 (0.33)	1.0004	0.32
	Orden de eclosión	0.05 (0.27)	0.04	0.83

Los valores de P en negritas representan las variables explicativas retenidas en los modelos mínimos adecuados

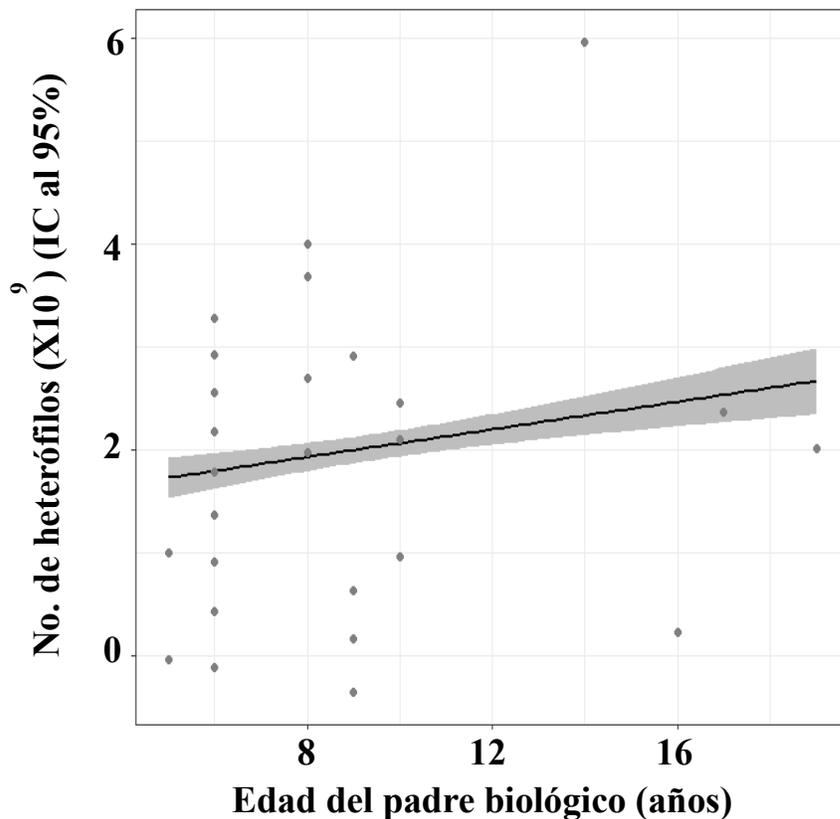


Figura 1. Efecto de la edad del padre biológico en el número de heterófilos de 33 pollos de 35 días de edad que fueron adoptados por adultos jóvenes.

Efecto de las edades de ambos adultos adoptivos sobre la inmunidad innata de la progenie (Hipótesis 2)

La interacción entre la edad de la hembra adoptiva y la edad del macho adoptivo no tuvo un efecto estadísticamente significativo en ninguno de los indicadores de la respuesta inmune innata de la progenie, en ninguna de las dos edades de las crías (i.e., 20 y 35 días) en las que estos indicadores fueron analizados (Tabla 5 y 6). Tampoco la edad del macho adoptivo influyó en el cociente H:L, el número de heterófilos y el número de eosinófilos a los 20 y 35 días de edad de las crías (Tabla 5 y 6). La edad de la hembra adoptiva tuvo una influencia estadísticamente significativa en los cocientes H:L y en el número de heterófilos de las crías únicamente a los 35 días de edad, pero no influyó en el número de eosinófilos de las crías ni a

los 20 ni a los 35 días de edad (Tabla 5 y 6). A continuación, describo los resultados estadísticamente significativos:

(i) Cociente heterófilos:linfocitos a los 35 días de edad

La edad de la hembra adoptiva se correlacionó positivamente con los cocientes H:L de las crías cuando estas alcanzaron 35 días de edad (Tabla 6). Las crías procedentes de huevos adoptados por hembras jóvenes, de entre 5 y 10 años de edad, presentaron cocientes H:L hasta 53% más bajos que los cocientes H:L de las crías procedentes de huevos adoptados por hembras viejas, de entre 13 y 18 años (Figura 2).

(ii) Número de heterófilos a los 35 días de edad

La edad de la madre adoptiva también se correlacionó positivamente con el número de heterófilos en la sangre periférica de las crías a los 35 días de edad (Tabla 6). Las crías procedentes de huevos adoptados por hembras jóvenes, de entre 5 y 10 años de edad, presentaron conteos de heterófilos en sangre periférica hasta 26% más bajos que los que presentaron las crías procedentes de huevos adoptados por hembras viejas, de entre 13 y 18 años (Figura 3).

Tabla 5. Resultados de tres modelos lineales generalizados utilizados para examinar el efecto de las edades de los adultos adoptivos sobre la respuesta inmune innata de 39 pollos de 20 días de edad.

MODELO CON DISTRIBUCIÓN NORMAL

Variable de respuesta	Variabes explicativas	Coefficientes (error estándar)	Cambio en varianza	P
Heterófilos: linfocitos	Edad del macho adoptivo* edad de la hembra adoptiva	0.005 (0.009)	0.33	0.56
	Edad del macho adoptivo ²	-0.08 (0.44)	0.03	0.85
	Edad de la hembra adoptiva ²	-0.35 (0.44)	0.65	0.42
	Edad del macho adoptivo	-0.02 (0.01)	2.55	0.11
	Edad de la hembra adoptiva	-0.008 (0.01)	0.27	0.60
	No. de garrapatas a los 24d	-0.0009 (0.006)	0.01	0.89
	No. de garrapatas a los 32d	-0.006 (0.008)	0.48	0.49
	Fecha de eclosión	0.01 (0.005)	12.57	0.001
	Tamaño de la nidada	0.14 (0.16)	0.79	0.37
	Orden de eclosión	-0.08 (0.15)	0.30	0.58

MODELOS CON DISTRIBUCIÓN QUASI-POISSON

Variable de respuesta	Variabes explicativas	Coefficientes (error estándar)	Cambio en devianza	P
Conteo de heterófilos	Edad del macho adoptivo* edad de la hembra adoptiva	0.009 (0.01)	0.54	0.46
	Edad del macho adoptivo ²	-0.81 (0.58)	1.95	0.17
	Edad de la hembra adoptiva ²	-0.70 (0.63)	1.25	1.27
	Edad del macho adoptivo	-0.03 (0.02)	1.68	0.20
	Edad de la hembra adoptiva	-0.03 (0.02)	1.94	0.17
	No. de garrapatas a los 24d	0.0009 (0.008)	0.01	0.91
	No. de garrapatas a los 32d	0.02 (0.009)	6.12	0.01
	Fecha de eclosión	0.01 (0.009)	1.78	0.19
	Tamaño de la nidada	-0.23 (0.28)	0.71	0.40
	Orden de eclosión	-0.28 (0.19)	2.12	0.15

Conteo de eosinófilos	Edad del macho adoptivo*	-0.02 (0.02)	0.93	0.34
	edad de la hembra adoptiva			
	Edad del macho adoptivo ²	-0.66 (1.001)	0.44	0.51
	Edad de la hembra adoptiva ²	0.61 (0.99)	0.37	0.54
	Edad del macho adoptivo	0.05 (0.03)	2.32	0.13
	Edad de la hembra adoptiva	-0.01 (0.04)	0.15	0.69
	No. de garrapatas a los 24d	0.01 (0.01)	0.98	0.32
	No. de garrapatas a los 32d	-0.005 (0.02)	0.06	0.79
	Fecha de eclosión	0.009 (0.01)	0.48	0.48
	Tamaño de la nidada	0.05 (0.41)	0.01	0.89
	Orden de eclosión	-0.16 (0.32)	0.26	0.61

Los valores de P en negritas representan las variables explicativas retenidas en los modelos mínimos adecuados.

Tabla 6. Resultados de tres modelos lineales generalizados utilizados para examinar el efecto de las edades de los adultos adoptivos sobre la respuesta inmune innata de 37 pollos de 35 días de edad.

MODELO CON DISTRIBUCIÓN NORMAL

Variable de respuesta	Variabes explicativas	Coefficientes (error estándar)	Cambio en varianza	P
Heterófilos: linfocitos	Edad del macho adoptivo* edad de la hembra adoptiva	0.008 (0.01)	0.69	0.41
	Edad del macho adoptivo ²	-0.70 (0.42)	2.75	0.10
	Edad de la hembra adoptiva ²	0.07 (0.45)	0.02	0.86
	Edad del macho adoptivo	0.02 (0.02)	1.10	0.30
	Edad de la hembra adoptiva	0.04 (0.01)	4.98	0.03
	No. de garrapatas a los 24d	-0.004 (0.006)	0.49	0.48
	No. de garrapatas a los 32d	-0.009 (0.009)	1.17	0.28
	Fecha de eclosión	0.01 (0.006)	3.56	0.06
	Tamaño de la nidada	-0.27 (0.18)	2.36	0.13
	Orden de eclosión	-0.07 (0.17)	0.20	0.65

MODELO CON DISTRIBUCIÓN POISSON

Variable de respuesta	Variabes explicativas	Coefficientes (error estándar)	Cambio en devianza	P
Conteo de heterófilos	Edad del macho adoptivo* edad de la hembra adoptiva	0.01 (0.009)	2.08	0.14
	Edad del macho adoptivo ²	0.06 (0.42)	0.02	0.88
	Edad de la hembra adoptiva ²	-0.32 (0.39)	0.67	0.41
	Edad del macho adoptivo	0.01 (0.01)	0.51	0.47
	Edad de la hembra adoptiva	0.04 (0.01)	6.88	<0.01
	No. de garrapatas a los 24d	-0.005 (0.005)	0.91	0.33
	No. de garrapatas a los 32d	-0.004 (0.01)	0.15	0.69
	Fecha de eclosión	-0.002 (0.007)	0.12	0.72
	Tamaño de la nidada	-0.13 (0.17)	0.64	0.42
	Orden de eclosión	0.05 (0.13)	0.15	0.69

MODELO CON DISTRIBUCIÓN QUASI-POISSON

Variable de respuesta	Variabes explicativas	Coefficientes (Error estándar)	Cambio en devianza	P
Conteo de eosinófilos	Edad del macho adoptivo*	-0.002 (0.01)	0.02	0.87
	edad de la hembra adoptiva			
	Edad del macho adoptivo ²	-0.60 (0.67)	0.81	0.37
	Edad de la hembra adoptiva ²	-0.92 (0.73)	1.62	0.21
	Edad del macho adoptivo	-0.03 (0.03)	0.89	0.35
	Edad de la hembra adoptiva	-0.02 (0.03)	0.52	0.47
	No. de garrapatas a los 24d	0.009 (0.009)	0.95	0.33
	No. de garrapatas a los 32d	2.40 (0.12)	6.87	0.01
	Fecha de eclosión	-0.001 (0.01)	0.01	0.90
	Tamaño de la nidada	-0.57 (0.37)	2.65	0.11
	Orden de eclosión	-0.08 (0.24)	0.11	0.73

Los valores de P en negritas representan las variables explicativas retenidas en los modelos mínimos adecuados.

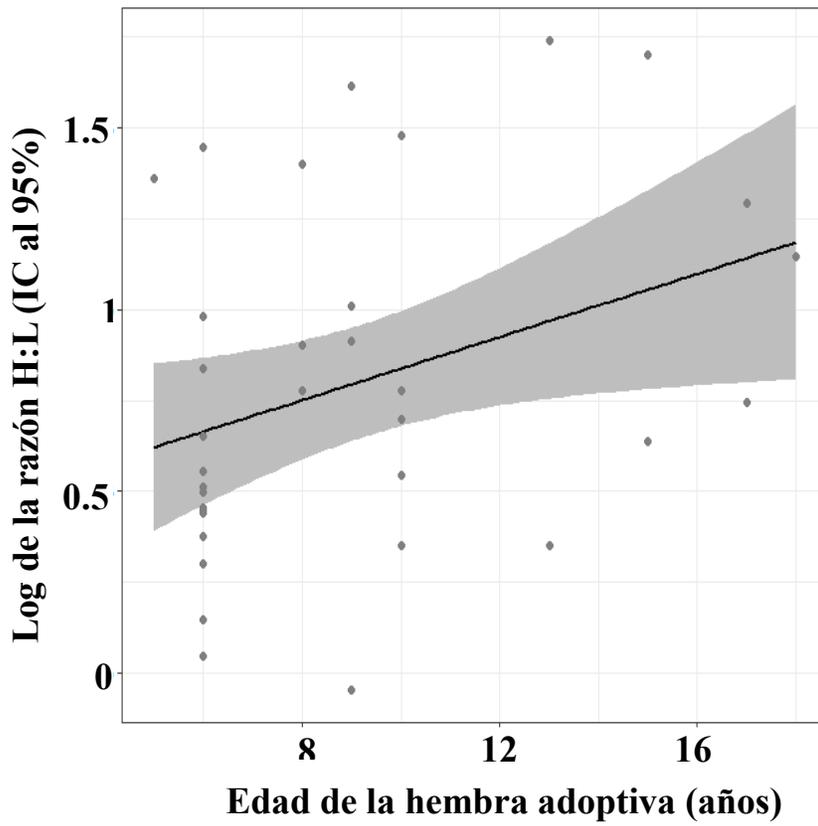


Figura 2. Efecto de la edad de la hembra adoptiva en el cociente H:L de 37 pollos de 35 días de edad cuyos padres y madres biológicos eran jóvenes.

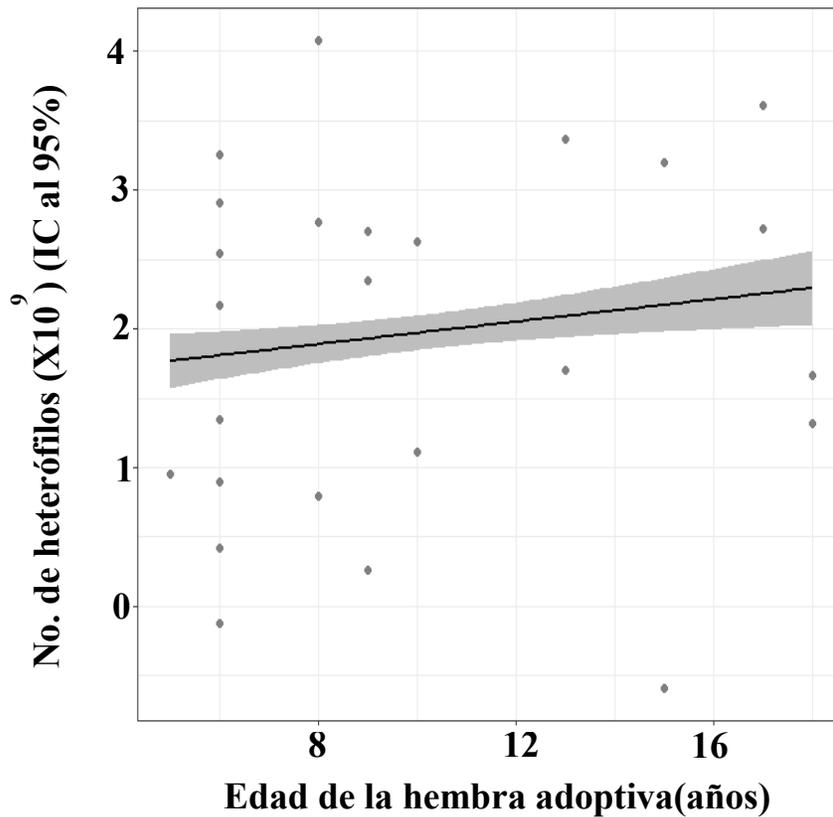


Figura 3. Efecto de la edad de la hembra adoptiva en el número de heterófilos de 37 pollos de 35 días de edad cuyos padres y madres biológicos eran jóvenes.

DISCUSIÓN

Este estudio reveló que la combinación de edades de los padres biológicos y la combinación de edades de los adultos adoptivos no influyen en ninguno de los indicadores celulares de la respuesta inmune innata de la progenie, a ninguna de las dos edades en las que estos indicadores fueron estimados en la progenie. Por lo tanto, nuestros datos no apoyan ninguna de las dos hipótesis planteadas en este estudio. Sin embargo, sugieren que la respuesta inmune innata de la progenie puede ser afectada negativamente por procesos de senescencia mediados por efectos genéticos paternos (Velandó et al 2011; Selvaratnam et al. 2015) y por senescencia de los cuidados maternos (Réale y Boussés 1995; Ericsson et al. 2001). Primero, al avanzar la edad del padre biológico incrementa la cantidad de heterófilos en la sangre periférica en las crías de 35 días de edad, lo que podría indicar que las crías engendradas por padres de edad avanzada sufren condiciones de estrés que podrían estar disminuyendo su capacidad inmune (Al-Murrani et al.

1997; Banbura et al. 2013). Por otro lado, las crías de huevos adoptados por hembras de edad avanzada presentan valores del cociente H:L y conteos de heterófilos más altos, y por lo tanto, un nivel de estrés fisiológico y una deficiencia en la respuesta inmune innata mayores (Lobato et al. 2005; Davis et al. 2008), que las que presentan las crías de huevos adoptados por hembras jóvenes.

La ausencia de una interacción entre las edades de la madre biológica y del padre biológico sobre la respuesta inmune innata de la progenie contrasta con los resultados documentados en el chochín criollo, donde las crías de hembras de tres o más años de edad apareadas con machos de un año de edad presentan una mayor respuesta inmune ante PHA que las crías engendradas por parejas con otras combinaciones de edades parentales (Bowers et al. 2017). Nuestra predicción era que en el bobo de patas azules, la edad de la madre biológica y la edad del padre biológico tendrían un efecto de interacción similar al documentado en el chochín criollo, específicamente, que las crías de parejas donde un padre es joven y el otro viejo tendrían una mayor respuesta inmune innata que las crías de parejas similarmente jóvenes o similarmente viejas. Se esperaba este efecto de interacción en nuestro estudio porque las crías de parejas donde un padre es joven y el otro viejo son menos infestadas por garrapatas y tienen mayor probabilidad de reclutar que las crías de padres similarmente jóvenes o similarmente viejos (Drummond y Rodríguez 2015; Ramos y Drummond 2018). Además, a diferencia del chochín criollo que vive 3 años en promedio (Bowers et al. 2017), los bobos de patas azules de ambos sexos pueden vivir y reproducirse excepcionalmente hasta los 25 años de edad (Promedio = 10 años; Ortega et al. 2017), y en la población de nuestro estudio, machos y hembras suelen aparearse con individuos de edad diferente a la suya (Drummond y Rodríguez 2015). Estos dos aspectos podrían dar lugar a una mucho mayor variación en términos de combinaciones de edades parentales en el bobo de patas azules, y por lo tanto, a un efecto de interacción entre edades parentales más acentuado que el documentado en el chochín criollo. Sin embargo, nuestro estudio no apoya esta predicción, probablemente por las siguientes tres razones.

Primero, la edad del padre biológico y de la madre biológica podrían influir de forma independiente sobre la calidad de la progenie (Yoccoz et al. 2002; Zanchi et al. 2011; Bowers

et al. 2012). En este estudio, la edad de la madre biológica no influyó en ninguno de los indicadores de la respuesta inmune innata de la progenie a ninguna de las dos edades en las que estos fueron analizados, pero la edad del padre biológico influyó en el conteo de heterófilos de las crías cuando estas alcanzaron los 35 días de edad. En relación a la inmunidad innata, la edad de la madre y del padre biológico influyen de forma independiente. Por otra parte, la edad de la madre biológica podría tener un impacto en otros componentes tanto de la respuesta inmune innata como de la respuesta inmune adquirida que no fueron evaluados en este estudio, tales como el conteo de basófilos, monocitos o en la cantidad de anticuerpos maternos (Gasparini et al. 2006; Beamonte-Barrientos et al. 2010; Bowers et al. 2017). Además, el posible efecto de la edad de la madre biológica sobre los indicadores celulares de la respuesta inmune innata de la progenie evaluados y no evaluados en este estudio, podría haberse desvanecido antes de los 20 días de edad de las crías, ya que se ha documentado que la transferencia de componentes inmunes por parte de la madre hacia sus crías por medio de la leche o de la transferencia de biomoléculas hacia los huevos, tiene mayor importancia en las etapas neonatales más tempranas de la progenie (Mousseau 1998; Lindström 1999; Boulinier y Staszewski 2008).

Otra razón por la cual podríamos no haber detectado un efecto interactivo entre las edades de ambos padres biológicos sobre la respuesta inmune innata de la descendencia podría ser que las diferencias entre las edades de los padres biológicos y las madres biológicas no fueron lo suficientemente contrastantes en nuestra muestra. Sin embargo, esta explicación podría ser descartada ya que, aunque nuestros intercambios recíprocos de puestas incluyeron parejas con una diferencia promedio de edades de 4 años, se incluyeron varias parejas cuya diferencia de edades fue de hasta 13 años. Por consiguiente, nuestra muestra incluyó una amplia variación en cuanto a la diferencia de edades de los padres biológicos y madres biológicas que podría haber dado lugar a un efecto de interacción significativo. Una tercera explicación posible, es que la reducción en el tamaño de nuestra muestra, inducida por una alta depredación de huevos y crías menores de cinco días de edad, disminuyó el poder estadístico de nuestro análisis e impidió que detectáramos un efecto estadísticamente significativo de la combinación de edades parentales en la respuesta inmune innata de la progenie. Estudios futuros que evalúen otros indicadores de la respuesta inmune tanto innata como adquirida en un rango todavía más amplio de edades en

las crías y con tamaños de muestras más grandes, podrían ser necesarios para dilucidar si realmente la combinación de edades parentales no afecta la respuesta inmune de la descendencia.

El que la edad del padre biológico tuviera influencia en un solo indicador de la respuesta inmune innata de la progenie, el número de heterófilos, y únicamente cuando las crías alcanzaron los 35 días de edad, también provee evidencia de que las edades de los progenitores afectan por separado distintos componentes de la respuesta inmune innata y en diferentes momentos del desarrollo de la descendencia (Zanchi et al. 2011; Beemelmans y Roth 2016). La experiencia inmune de los machos ante una variedad de patógenos, la cual se relaciona positivamente con su edad (Palacios et al. 2007, 2011; Montgomery y Shaw 2015), no tiene efecto en la respuesta inmune de la descendencia temprano en su etapa neonatal, pero sí en etapas posteriores (Beemelmans y Roth 2016). Esto podría deberse a que la respuesta inmune innata tiene un alto componente genético (Brooks-Wilson 2013; Beemelmans y Roth 2016), y se conoce que los alelos relacionados con la respuesta inmune innata heredados por los machos se expresan en etapas más tardías del desarrollo de las crías que los alelos heredados por las madres, como ocurre, por ejemplo, en el pez aguja (*S. typhle*) (Beemelmans y Roth 2016). Nuestros resultados en el bobo de patas azules sugieren que los efectos genéticos vía paterna en la respuesta inmune innata de la progenie siguen un patrón similar al documentado en el pez aguja, siendo evidentes cuando las crías han alcanzado la mitad de la edad de máximo crecimiento en masa (Drummond et al. 1991). Los mecanismos genéticos que subyacen a este patrón, sin embargo, deberán ser evaluados en estudios posteriores.

El resultado que muestra que las crías engendradas por padres viejos tienen un mayor número de heterófilos en sangre circulante, y por lo tanto un mayor nivel de estrés fisiológico y una menor respuesta inmune innata (Al-Murrani et al. 1997; Banbura et al. 2013) que las crías engendradas por padres jóvenes, sugiere la ocurrencia de senescencia reproductiva en los machos (Harris et al. 2011; Velando et al. 2011), posiblemente mediada por un incremento en el nivel de daño premutagénico en la línea germinal (Velando et al. 2011). Algunos estudios han documentado que el aumento en el nivel de daño premutagénico en los gametos masculinos con

la edad eleva la probabilidad de que la descendencia presente malformaciones u otro tipo de alteraciones que pongan en riesgo su supervivencia (Fisch et al. 2003; Bille et al. 2005; Harris et al. 2011). Sin embargo, se desconoce si la respuesta inmune innata es otro de los indicadores de calidad en la progenie que se ve afectado por los daños premutagénicos en el ADN germinal de los padres. Aunque, se conoce que la acumulación de daños premutagénicos en el ADN de machos senescentes puede ocasionar acortamiento en los telómeros (Criscuolo et al. 2017) y pérdida de heterocigosidad en su progenie (Brock et al. 2015), y tanto el acortamiento de telómeros como la pérdida de heterocigosidad se relacionan con una disminución en la cantidad de leucocitos (Hausmann et al. 2005; Brock et al. 2015). De esta manera la respuesta inmune innata de la descendencia podría verse reducida con el aumento de la edad de sus padres. En las crías del chochín criollo, la respuesta inmune ante PHA disminuye conforme aumenta la edad del padre, y se ha sugerido que tanto la respuesta inmune innata como la adquirida se ve debilitada a causa de un proceso de senescencia reproductiva en los padres (Bowers et al. 2017). En el bobo de patas azules podría estar ocurriendo un proceso de senescencia similar en los padres biológicos que se ve reflejado en la elevación de los conteos de heterófilos en la sangre periférica de las crías.

Nuestro estudio tampoco revela un efecto de la combinación de las edades de ambos adultos adoptivos en ninguno de los indicadores de la respuesta inmune innata de la progenie, a ninguna de las dos edades en que estos fueron analizados en la progenie. De hecho, tampoco encontramos efecto de la edad del macho adoptivo sobre nuestros indicadores de respuesta inmune innata, a ninguna de las dos edades de las crías en las que estos indicadores fueron evaluados. El único efecto que detectamos fue una relación positiva entre la edad de la hembra adoptiva y los valores de H:L y el número de heterófilos cuando las crías alcanzaron 35 días de edad. La falta de evidencia de un efecto interactivo entre las edades de ambos adultos adoptivos probablemente se debe a las diferencias en el número de alimentaciones y en la cantidad de alimento que proveen machos y hembras a sus crías. En los bobos de Isla Isabel, los cuidados parentales no difieren mucho entre los sexos en los primeros 6-10 días de vida de las crías, pero en días posteriores y hasta que las crías alcanzan 35 días de edad, las hembras les proporcionan una mayor cantidad de alimento que los machos; además, las hembras proveen alimento con mayor

frecuencia a las crías que los machos hasta que las crías cumplen 60 días de edad (Guerra y Drummond 1995). Esto sugiere que en el bobo de patas azules, el estado nutricional de las crías entre los 11 y los 60 días de edad es prioritariamente influenciado por el aprovisionamiento de las hembras, y dado que el desarrollo y mantenimiento de la respuesta inmune innata es altamente dependiente del estado nutricional (Hoi-Leitner et al 2001; Brzek y Konarzewski 2007; Kriengwatana et al. 2013), el efecto de la edad de la hembra adoptiva podría superar el efecto del macho adoptivo, y el efecto de interacción entre las edades de ambos adultos adoptivos podría ser pequeño. Hasta ahora, este estudio es el único que ha evaluado el efecto combinado de las edades de padres y madres adoptivos sobre la respuesta inmune de la progenie en una especie con cuidado biparental extendido. Serán necesarios más estudios en otras poblaciones silvestres para dilucidar si este es un patrón común en vertebrados de vida larga, o si depende del nivel de cuidado parental provisto por cada sexo.

El que las crías cuidadas por hembras viejas presenten cocientes H:L y conteos de heterófilos mayores, y por lo tanto, niveles elevados de estrés fisiológico y una capacidad inmune innata reducida (Al-Murrani et al. 1997; Ruiz et al. 2002; Davis et al. 2004; Krams et al. 2012), podría ser evidencia de un proceso de senescencia en las hembras, probablemente debido a un decaimiento en su eficiencia de forrajeo con la edad (Lecomte et al. 2010). Los cambios en la capacidad de forrajeo con la edad no han sido evaluados en esta especie, pero han sido documentados en otras aves con historias de vida similares (Lecomte et al. 2010; Clay et al. 2018). De existir este decaimiento en la eficiencia de forrajeo con la edad en el bobo de patas azules, podría provocar una reducción en la provisión de alimento hacia la progenie por parte de las hembras de edad avanzada. Y esto último podría afectar negativamente el desarrollo y mantenimiento de la respuesta inmune innata de la progenie (Hoi-Leitner et al 2001; Brzek y Konarzewski 2007; Kriengwatana et al. 2013). La disminución en las habilidades para forrajear y proveer de alimento a las crías con la edad en las hembras podría ser resultado de cambios fisiológicos o un debilitamiento muscular a edades avanzadas, como se sugiere en el albatros errante y el albatros de cabeza gris (*Thalassarche chrysostoma*; Catry et al. 2006; Nussey et al. 2013; Lecomte et al. 2010; Clay et al. 2018). Sin embargo, experimentos y observaciones conductuales en campo son necesarios para validar esta hipótesis en nuestro modelo de estudio.

Por otro lado, el hecho de que el efecto de la edad de la madre adoptiva sea evidente cuando las crías tienen 35 días pero no cuando las crías tienen 20 días de edad, podría deberse a que la deficiencia de las hembras senescentes para proveer alimento a sus crías se hace más notoria conforme aumenta la demanda de alimento a lo largo del desarrollo de las crías. En varias especies de aves, la demanda energética de las crías incrementa conforme avanza su edad (Steen et al. 2012), lo cual podría imponer costos reproductivos más altos para las madres senescentes que para madres más jóvenes. Sin embargo, esta hipótesis no ha sido probada aún en ninguna población animal y valdría la pena explorarla en estudios futuros.

En conclusión, la respuesta inmune innata en la descendencia no se ve afectada por la combinación de edades parentales. Por consiguiente, la variación en la capacidad inmune innata de la prole engendrada o cuidada por parejas con diferentes combinaciones de edad, no explica por qué las crías de parejas de bobos de patas azules donde un adulto es joven y el otro viejo presentan una menor infestación por garrapatas y una mayor probabilidad de reclutar que las crías de padres similarmente jóvenes o similarmente viejos (Drummond y Rodríguez 2015; Ramos y Drummond 2018). Nuestros resultados confirman la ocurrencia de senescencia reproductiva en los machos (McElligott et al. 2002; Velando et al. 2011) y en las hembras (Nussey et al. 2006; Lecomte et al. 2010) de esta población de aves marinas de vida larga. El decaimiento en la respuesta inmune innata de las crías al aumentar la edad del padre biológico podría ser mediado por alteraciones moleculares en el esperma (Harris et al. 2011; Velando et al. 2011), mientras que el decaimiento en la capacidad inmune innata de las crías al aumentar la edad de las hembras adoptivas podría reflejar un decaimiento en la eficiencia de forrajeo y en el aprovisionamiento de alimentos por parte de las hembras senescentes (Lecomte et al. 2010). Estos efectos son independientes entre sí, probablemente debido a que la edad de los padres y de las madres influyen por separado en diferentes componentes de la respuesta inmune innata en diferentes etapas del desarrollo de la prole (Yoccoz et al. 2002; Zanchi et al. 2011; Bowers et al. 2012). Sin embargo, la ausencia de un efecto interactivo entre las edades de los padres biológicos y de los padres adoptivos podría ser debida a una reducción en el tamaño de muestra, inducida por una alta depredación de huevos y crías jóvenes en la población de nuestro estudio.

Es necesario que otros estudios evalúen el efecto en combinación y por separado de las edades parentales en otros componentes de la respuesta inmune y otros indicadores de calidad, tales como termorregulación, crecimiento o cognición, y en diferentes momentos del desarrollo de la progenie.

REFERENCIAS

- Alatalo RV, Gustafsson L y Lundberg A. 1986. Do females prefer older males in polygynous bird species?. *The American Naturalist* 127(2): 241-245.
- Al-Murrani WK, Al-Rawi IK, y Raof NM. 2002. Genetic resistance to *Salmonella typhimurium* in two lines of chickens selected as resistant and sensitive on the basis of heterophil/lymphocyte ratio. *British Poultry Science* 43: 501-507.
- Al-Murrani WK, Kassab A, Al-Sam HZ y Al-Athari AMK. 1997. Heterophil/lymphocyte ratio as a selection criterion for heat resistance in domestic fowls. *British Poultry Science* 38: 159-163.
- 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(9): 1-11.
- Angelier F, Moe B, Weimerskirch H y Chastel O. 2007 *a*. Age-specific reproductive success in a long-lived bird: do older parents resist stress better?. *Ecology* 76: 1181-1191.
- Angelier F, Weimerskirch H, Dano S y Chastel O. 2007 *b*. Age, experience and reproductive performance in a long-lived bird: a hormonal perspective. *Behavioral Ecology Sociobiology* 61: 611-621.
- Arnold LM, Smith WD, Spencer PD, Evans AN, Heppell SA y Heppell SS. 2018. The role of maternal age and context-dependent maternal effects in the offspring provisioning of a long-lived marine teleost. *Royal Society Open Science* 5: 1-11.
- Balbontín J, Hermosell IG, Marzal A, Reviriego M, De Lope F y MØller AP. 2007. Age-related change in breeding performance in early life is associated with an increase in competence in the migratory barn swallow *Hirundo rustica*. *Journal of Animal Ecology* 76: 915-925.

Banbura J, Skwarska J, Banbura M, Gladalski M, Holysz M, Kalinski A, Markowski M, Wawrzyniak J y Zielinski P. 2013. Spatial and temporal variation in heterophil to lymphocyte ratios of nestling passerine birds: comparison of blue tits and great tits. *Plos One* 8: 1-8.

Barua A, Yoshimura Y y Tamura T. 1998. Effects of ageing and oestrogen on the localization of immunoglobulin-containing cells in the chicken ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*. 114: 11-16.

BD Vacutainer. BD Diagnósticos, sistemas preanalíticos. Catálogo de productos para recolección de muestra venosa, arterial y de orina [en línea]. BD Vacutainer, 2016. [Fecha de consulta: 17 de diciembre de 2016]. Disponible: "<https://bd.com/mexico/vacutainer/pdfs/catalog.pdf>".

Beamonte-Barrientos R, Velando A, Drummond H y Torres R. 2010. Senescence of maternal effects: aging influences egg quality and rearing capacities of a long-lived bird. *The American Naturalist* 175 (4): 569-480.

Beck CW, Promislow DEL. 2007. Evolution of female preference for younger males. *Plos One* 2(9): 1-8.

Beck CW, Shapiro B, Choksi S y Promislow DEL. 2002. A genetic algorithm approach to study the evolution of female preference based on male age. *Evolutionary Ecology Research* 4: 275-292.

Beemelmans A y Roth O. 2016. Biparental immune priming in the pipefish *Syngnathus typhle*. *Zoology* 119(4): 262-272.

Belden LK y Kiesecker JM. 2005. Glucocorticosteroid hormone treatment of larval treefrogs increases infection by alaria sp. trematode cercariae. *The Journal of Parasitology* 91(3): 686-688.

Benoit K. 2011. Linear regression models with logarithmic transformations. Methodology Institute, London School of Economics: 1-8.

Berger V, Lemaitre JF, Dupont P, Allainé D, Gaillard JM y Cohas A. 2016. Age-specific survival in the socially monogamous alpine marmot (*Marmota marmota*): evidence of senescence. *Journal of Mammalogy* 97(3): 992-1000.

Bille C, Skytthe A, Vach W, Knudsen LB, Andersen AMN, Murray JC y Christensen K. 2005. Parent's age and the risk of oral clefts. *Epidemiology* 16(3): 311-316.

Bogdanova MI, Nager RG y Monaghan P. 2006. Does parental age affect offspring performance through differences in egg quality?. *Functional Ecology* 20(1): 132-141.

Boulinier T y Staszewski V. 2008. Maternal transfer of antibodies: raising immuno-ecology issues. *Trends in Ecology and Evolution* 23(5): 282-288.

Bowers EK, Sakaluk SK y Thompson CF. 2017. Interactive effects of parental age on offspring fitness and age-assortative mating in a wild bird. *Journal of experimental Zoology* 327(5): 302-310.

Bowers EK, Smith RA, Hodges CJ, Zimmerman LM, Thompson CF y Sakaluk SK. 2012. Sex-biased terminal investment in offspring induced by maternal immune challenge in the house wren (*Troglodytes aedon*). *Proceedings of the Royal Society* 10: 1-8.

Bradley RJ y Safran RJ. 2014. Conceptual revision synthesis of proximate factors associated with age-related improvement in reproduction. *Ethology* 120: 411-426.

Brock PM, Goodman SJ, Hall AJ, Cruz M y Acevedo-Whitehouse K. 2015. Context-dependent associations between heterozygosity and immune variation in a wild carnivore. *Evolutionary Biology* 15: 1-10.

Brommer JE, Wilson AJ, Gustafsson L. 2007. Exploring the genetics of aging in a wild passerine bird. *The American Naturalist* 170(4): 643-650.

Bronikowski AM, Cords M, Alberts SC, Altmann J, Brockman DK, Fedigan LM, Pusey A, Stoinski T, Strier KB y Morris WF. 2016. Female and male life tables for seven wild primate species. *Nature* 3: 1-8.

Brooks R y Kemp DJ. 2001. Can older males deliver the good genes?. *Trends in Ecology and Evolution* 16(6): 308-313.

Brooks-Wilson AR. 2013. Genetics of healthy aging and longevity. *Human Genetics* 132(12): 1323-1338.

Brown SJ, Galli SJ, Gleich GJ y Askenase PW. 1998. Ablation of immunity to *Amblyomma americanum* by anti-basophil serum: cooperation between basophils and eosinophils in expression of immunity to ectoparasites (ticks) in guinea pigs. *The Journal of Immunology* 129(2): 790-796.

Brzek P y Konarzewski M. 2007. Relationship between avian growth rate and immune response depends on food availability. *The Journal of experimental Biology* 210: 2361-2367.

Budden AE y Dickinson JL. 2009. Signals of quality and age: the information content of multiple plumage ornaments in male western bluebirds *Sialia mexicana*. *Journal of Avian Biology* 40: 18-27.

Burley N y Moran N. 1979. The significance of age and reproductive experience in the mate preferences of feral pigeons *Columba livia*. *Animal Behaviour* 27: 686-698.

Carr JH y Rodak BF. 2010. Introducción al examen de frotis de sangre periférica. En: Atlas de Hematología Clínica. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. pp 1-10.

Carr LL y Gottschling DE. 2008. Does age influence loss of heterozygosity?. *Experimental Gerontology* 43: 123-129.

Catry P, Phillips RA, Phalan B y Croxall JP. Senescence effects in an extremely long-lived bird: the grey-headed albatross *Thalassarche chrysostoma*. *Proceedings: Biological Sciences* 273(1594): 1625-1630.

Cichoń M. 2003. Does prior breeding experience improve reproductive success in collared flycatcher females?. *Oecología* 134: 78-81.

Clay TA, Pearmain EJ, McGill RAR, Manica A y Phillips A. 2018. Age-related variation in non-breeding foraging behaviour and carry-over effects on fitness in an extremely long-lived bird. *Functional Ecology* 32(7): 1832-1846.

Cohas A, Bonenfant C, Kempenaers B y Allainé D. 2009. Age-specific effect of heterozygosity on survival in alpine marmots, *Marmota marmota*. *Molecular Ecology* 18: 1491-1503.

Colines B, Cabrera Rodríguez N, Hasson ER, Carreira V y Frankel N. 2015. Parental age influences developmental stability of the progeny in *Drosophila*. *Proceedings of the Royal Society*: 282: 1-6.

CONANP. 2005. Programa de conservación y manejo del Parque Nacional Isla Isabel. Conanp-Semarnat, México.

Crawley MJ. 2007. *The R book*. Wiley, Chichester.

Criscuolo F, Zahn S y Bize P. 2017. Offspring telomere length in the long lived Alpine swift is negatively related to the age of their biological father and foster mother. *Biology Letters* 13(19): 1-4.

Dardillat J, Trillat G y Larvor P. 1878. Colostrum immunoglobulin concentration in cows: relationship with their calf mortality and with the colostrum quality of their female offspring. *Annales de Recherches Vétérinaires* 9(2): 375-384.

Davis Ak, Cook KC y Altizer S. 2004. Leukocyte profiles in wild house finches with and without mycoplasmal conjunctivitis, a recently emerged bacterial disease. *EcoHealth* 1:362-373.

Davis AK, Maney DL y Maerz JC. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology* 22: 760-772.

Descamps S, Boutin S, Berteaux D y Gaillard JM. 2008. Age-specific variation in survival, reproductive success and offspring quality in red squirrels: evidence of senescence. *Oikos* 117: 1406-1416.

Deschka, M. La extracción de sangre en la práctica, Guía para extractores de sangre. [en línea]. SARSTEDT, 2016. [fecha de consulta: 17 de diciembre de 2016]. Disponible:
“https://dafxbb5uxjcds.cloudfront.net/fileadmin/user_upload/99_Literatur/Spanisch/492_MarcDeschka_BE_ES_0114.pdf”

Drea CM. 2005. Bateman revisited: the reproductive tactics of female primates. *Integrative and Comparative Biology* 45(5): 915-923.

Drummond H y Garcia Chavelas C. 1989. Food shortage influences sibling aggression in the blue-footed booby. *Animal Behaviour* 37: 806-819.

Drummond H, González E y Osorno JL. 1986. Parent-offspring cooperation in the blue-footed booby (*Sula nebouxii*): social roles in infanticidal brood reduction. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 19(5): 365-372.

Drummond H, Osorno JL, Torres R, García Chavelas S y Merchant Larios H. 1991. Sexual size dimorphism and sibling competition: implications for avian sex ratios. *The American Naturalist* 138(3): 623-641.

Drummond H y Rodríguez C. 2015. Viability of booby offspring is maximized by having one young parent and one old parent. *Plos One* 10(7): 1-14.

Drummond H, Torres R y Krishnan VV. 2003. Buffered development: resilience after aggressive subordination in infancy. *The American Naturalist* 161 (5): 794-807.

Dufva R y Allander K. 1995. Intraspecific variation in plumage coloration reflects immune response in great tit (*Parus major*) males. *Functional Ecology* 9: 785-789.

Ericsson G, Wallin K, Ball JP y Broberg M. 2001. Age-related reproductive effort and senescence in free-ranging moose, *Alces alces*. *Ecology* 82(6): 1613-1620.

Festa-Bianchet M y King WJ. 2007. Age-related reproductive effort in bighorn sheep ewes. *Ecoscience* 14 (3): 318-322.

Figuerola J, Munoz E, Gutierrez R y Ferrer D. 1999. Blood parasites, leucocytes and plumage brightness in the ciril bunting, *Emberiza cirilus*. *Functional Ecology* 13: 594-601.

Fisch H, Hyun G, Golden R, Hensle TW, Olsson CA y Liberson GL. 2003. The influence of paternal age on Down syndrome. *The Journal of Urology* 169: 2275-2278.

Gasparini J, McCoy KD, Staszewski V, Haussy C y Boulinier T. 2006. Dynamics of anti-Borrelia antibodies in black-legged kittiwake (*Rissa tridactyla*) chicks suggest a maternal educational effect. *Canadian Journal of Zoology* 84: 623-627.

Giron D y Casas J. 2003. Mothers reduce egg provisioning with age. *Ecology Letters* 6: 273- 277.

Gliem JA y Gliem RR. 2003. Calculating, Interpreting, and Reporting Cronbach's Alpha Reliability Coefficient for Likert-Type Scales. *Midwest Research to Practice Conference in Adult, Continuing, and Community Education*. 82-88

Gordon AS. 1995. Some aspects of hormonal influences upon the leukocytes. *Annals of the New York Academic of Sciences* 59(5): 907-927.

Grant BR y Grant PR. 1987. Mate choice in Darwin's finches. *Biological Journal of the Linnean Society* 32: 247-270.

Grindstaff JL, Brodie III ED y Ketterson ED. 2003. Immune function across generations: integrating mechanism and evolutionary process in maternal antibody transmission. *Proceedings of the Royal Society* 270: 2309-2319.

Guerra M y Drummond H. 1995. Reversed sexual size dimorphism and parental care: minimal division of labour in the blue-footed booby. *Behaviour* 132: 479-496.

Hansen TF y Price DK. 1995. Good genes and old age: do old mates provide superior genes?. *Journal of Evolutionary Biology* 8: 759-778.

- Harris ID, Fronczak C, Roth L y Meacham RB. 2011. Fertility and the aging male. *Reviews in Urology* 13(4): 184-190.
- Hasselquist D y Nilsson JA. 2009. Maternal transfer of antibodies in vertebrates: trans-generational effects on offspring immunity. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 364: 51-60.
- Hausman MF, Winkler DW y Vleck CM. 2005. Longer telomeres associated with higher survival in birds. *Biology Letters* 1(2): 212-214.
- Healy DL, Trounson AO y Andersen AN. 1994. Female fertility: causes and treatment. *The Lancet* 343: 1439-1544.
- Hewison AJM y Gaillard JM. 2001. Phenotypic quality and senescence affect different components of reproductive output in roe deer. *Journal of Animal Ecology* 70(4): 600-608.
- Hoi-Leitner M, Romero-Pujante M, Hoi H y Pavlova A. 2001. Food availability and immune capacity in serin (*Serinus serinus*) nestlings. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 49(5): 333-339.
- Hsu YH, Schroeder J, Winney I, Burke T y Nakagawa S. 2015. Are extra-pair males different from cuckolded males? a case study and a meta-analytic examination. *Molecular Ecology* 24(7): 1558-1571.
- Ivimey-Cook E y Moorad J. 2018. Disentangling pre-and postnatal maternal age effects on offspring performance in an insect with elaborate maternal care. *The American Naturalist* 192 (5): 564-576.
- Johnson y Gemmill. 2012. Are old males still good males and can females tell the difference?. *Bio Essays* 34(7): 609-619.
- Jones TM, Balmford A, Quinell RJ. 2000. Adaptive female choice for middle-aged mates in a lekking sandfly. *Proceedings of the Royal Society* 267: 681-686.
- Juul-Madsen HR, Viertlboeck B, Smith AL y Göbel WF. 2008. Avian innate immune responses. En: *Avian Immunology*. Davidson F, Kaspers B y Schat KA (eds.) Editorial. Academic Press. London Inglaterra. pp. 129.
- Karasuyama H, Mukai K, Obata K, Tsujimura Y y Wada T. 2011. Nonredundant roles of basophils in immunity. *The Annual Review of Immunology* 29: 45-69.

- Kokko H. 1998. Should advertising parental care be honest?. *Proceedings of the Royal Society* 265: 1871-1878.
- Komdeur J. 1995. Influence of helping and breeding experience on reproductive performance in the Seychelles warbler: a translocation experiment. *Behavioral Ecology* 7(3): 326-333.
- Komers PE y Dhindsa MS. 1989. Influence of dominance and age on mate choice in black-billed magpies: an experimental study. *Animal Behaviour* 37: 645-655.
- Krams I, Vrublevska J, Cirule D, Kivleniece I, Krama T, Rantala MJ, Sild E y Horak P. 2012. Heterophil/lymphocyte ratios predict the magnitude of humoral immune response to a novel antigen in great tits (*Parus major*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 161: 422-428.
- Kriengwatana B, Wada H, Macmillan A y MacDougall-Shackleton SA. 2013. Juvenile Nutritional Stress Affects Growth Rate, Adult Organ Mass, and Innate Immune Function in Zebra Finches (*Taeniopygia guttata*). *Physiological and Biochemical Zoology* 86(6): 769-781.
- Laubach ZM, Perng W, Lombardo M, Murdock C y Foufopoulos J. 2015. Determinants of parental care in mountain White-crowned sparrows (*Zonotrichia leucophrys oriantha*). *The Auk* 132: 893-902.
- Lecomte VJ, Sorci G, Cornet S, Jaeger A, Faivre B, Arnoux E, Gaillard M, Trouvè C, Besson D, Chastel O y Weimerskirch H. 2010. Patterns of aging in the long-lived wandering albatros. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(14): 6370-6375.
- Lehmann T. 1993. Ectoparasites: direct impact on host fitness. *Parasitology Today* 9(1): 8-13.
- Lindström J. 1999. Early development and fitness in birds and mammals. *Trends in Ecology and Evolution* 14(9): 343-348.
- Lobato E, Moreno J, Merino S, Sanz JJ y Arriero E. 2005. Haematological variables are good predictors of recruitment in nestling pied flycatchers (*Ficedula hypoleuca*). *Ecoscience* 12 (1): 27-34.
- Loffredo CA y Borgia G. 1986. Male courtship vocalizations as cues for mate choice in the satin bowerbird (*Ptilonorhynchus violaceus*). *The Auk* 103: 189-195.

- Lozano GA, Perrault S y Lemon RE. 1996. Age, arrival date and reproductive success of male American redstarts *Setophaga ruticilla*. *Journal of Avian Biology* 27: 164-170.
- Macchiaverni P, Arslanian C, Frazao JB, Palmeira P, Russo M, Verhasselt V y Condino-Neto A. 2011. Mother to child transfer of IgG and IgA antibodies against dermatophagoides pteronyssinus. *Scandinavian Journal of Immunology* 74(6): 619-627.
- Mainguy J, Coté SD, Cardinal E y Hule M. 2008. Mating tactics and mate choice in relation to age and social rank in male mountain goats. *Journal of Mammalogy* 89(3): 626-635.
- Manning JT. 1989. Age-advertisement and the evolution of the peacock's train. *Journal of Evolutionary Biology* 2: 379-384.
- Materlab, reactivos y material de laboratorio. Protocolos de tinción. [en línea]. MATERLAB, 2013 [fecha de consulta: 17 de diciembre de 2016]. Disponible: "http://www.materlab.com/documentacion/hematologia/colorantes/catalogo_general_tinciones.pdf".
- Mauck RA, Huntington CE y Doherty PF. 2012. Experience versus effort: what explains dynamic heterogeneity with respect to age?. *Oikos* 121: 1379-1390.
- Mayani-Parás F, Kilner RM, Stoddard MC, Rodríguez C y Drummond H. 2015. Behaviorally induced camouflage: a new mechanism of avian egg protection. *The American Naturalist* 186(4):91-97.
- McElligott AG, Altwegg R y Hayden TJ. 2002. Age-specific survival and reproductive probabilities: evidence for senescence in male fallow deer (*Dama dama*). *Proceedings: Biological sciences* 269 (1496): 1129-1137.
- McElligott AG, Mattiangeli V, Mattiello S, Verga M, Reynolds CA y Hayden TJ. 1998. Fighting tactics of fallow bucks (*Dama dama*, Cervidae): reducing the risks of serious conflict. *Ethology* 104: 789-803.
- Mitton JB, Schuster WSF, Cothran EG y De Fries JC. 1993. The correlation between the individual heterozygosity of parents and their offspring. *Heredity* 71: 59-63.
- Monaghan P, Charmantier A, Nussey DH y Ricklefs RE. 2008. The evolutionary ecology of senescence. *Functional Ecology* 22: 371-378.

Montgomerie RD, Weatherhead PJ. 1988. Risks and rewards of nest defence by parent birds. *The Quarterly Review of Biology* 63(2): 167-187.

Montgomery RR y Shaw AC. 2015. Paradoxical changes in innate immunity in aging: recent progress and new directions. *Journal of Leukocyte Biology* 98:1-7.

Moreno J, Merino S, Martínez J, Sanz JJ y Arriero E. 2002. Heterophil/lymphocyte ratios and heat-shock protein levels are related to growth in nestling birds. *Écoscience* 19(4): 434-439.

Mousseau TA y Fox CW. 1998. *Maternal effects as a adaptations*. Oxford University Press, New York.

Müller C, Jenni-Eiermann S y Jenni L. 2011. Heterophils/Lymphocytes-ratio and circulating corticosterone do not indicate the same stress imposed on Eurasian kestrel nestlings. *Functional Ecology* 25: 566-576.

Naranjo, A.C.B. 2008. Extendido de sangre periférica y coloración de Wright. En: *Atlas de Hematología, células sanguíneas*. Colombia. pp 20-24.

Nelson JB. 1978. *The Sulidae: the gannets and boobies*. Oxford University Press. London, Inglaterra.

Nol E y Smith JNM. 1987. Effects of age breeding experience on seasonal reproductive success in the song sparrow. *Journal of Animal Ecology* 56: 301-313.

Nur N. 1984. Increased reproductive success with age in the California gull: to increased effort or improvement of skill?. *Oikos* 43(3): 407-408.

Nussey DH, Froy H, Lemaitre JF, Gaillard JM, Austad SN. 2013. Senescence in natural populations of animals: widespread evidence and its implications for bio-gerontology. *Ageing Research Reviews* 12: 214-225.

Nussey DH, Kruuk LEB, Donald A, Fowlie M y Clutton-Brock H. 2006. The rate of senescence in maternal performance increases with early-life fecundity in red deer. *Ecology Letters* 9: 1342-1350.

Nystrand M y Dowling DK. 2014. Transgenerational interactions involving parental age and immune status affect female reproductive success in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society* 281: 1-8.

OIE. Manual de la OIE para animales silvestres. Recogida y envío de muestras para el diagnóstico. [en línea]. OIE, 2008. [Fecha de consulta: 17 de diciembre de 2016]. Disponible:

"http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/1.01.01.Recogidayenvíodemuestras.pdf"http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/1.01.01.%20Recogida%20y%20env%C3%ADo%20de%20muestras.pdf.

Olooto WE, Amballi AA y Banjo TA. 2012. A review of female infertility; important etiological factors and management. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* 2 (3): 379-385.

Ortega S, Sánchez-Macouset O, Urrutia A, Rodríguez C y Drummond H. 2017. Age-related parental care in a long-lived bird: implications for offspring development. *Behavioral Ecology Sociobiology* 171 (132): 1-6.

Osborne JW. 2002. Notes on the use of data transformations. *Practical Assessment, Research and Evaluation* 8(6): 1-7.

Owen JP, Delany ME y Mullens BA. 2008. MHC haplotype involvement in avian resistance to an ectoparasite. *Immunogenetics* 60:621-631.

Owen JP, Nelson AC y Clayton DH. 2010. Ecological Immunology of bird-ectoparasite systems. *Trends in Parasitology* 26(11): 530-539.

Palacios MG, Cunnick JE, Winkler DW y Vleck CM. 2007. Immunosenescence in some but not all immune components in a free-living vertebrate, the tree swallow. *Proceedings Biological sciences* 274(1612):951-957.

Palacios MG, Winkler DW, Klasing KC, Hasselquist D y Vleck CM. 2011. Consequences of immune system aging in nature: a study of immunosenescence costs in free-living tree swallows. *Ecology* 92(4): 952-966.

Postma M, Bester MN y Nico de Bruyn PJ. 2013. Age-related reproductive variation in a wild marine mammal population. *Polar Biology* 36: 719-729.

Price DK, Hansen TF. 1998. How does offspring quality change with age in male *Drosophila melanogaster*?. *Behaviour Genetics* 28(5): 395-402.

Ramos AG y Drummond H. 2017. Tick infestation of chicks in a seabird colony varies with local breeding synchrony, local nest density and hábitat structure. *Journal of Avian Biology* 48(4): 472-478.

Ramos AG y Drummond H. 2018. Ectoparasite burden of blue-footed booby chicks depends on combined parental ages. *Ibis* 160. 914-918.

Ramos AG, Nunziata SO, Lance SL, Rodríguez C, Faircloth BC, Gowaty PA y Drummond H. 2014 *a*. Habitat structure and colony structure constrain extrapair paternity in a colonial bird. *Animal Behaviour* 95:121-127.

Ramos AG, Nunziata SO, Lance SL, Rodríguez C, Faircloth BC, Gowaty PA y Drummond H. 2014 *b*. Interactive effects of male and female age on extra-pair paternity in a socially monogamous seabird. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 68(10): 1603-1609.

Ratikainen II, Kokko H. 2009. Differential allocation and compensation: who deserves the silver spoon?. *Behavioral Ecology* 21(1): 195-200.

Réale D y Boussés P. 1995. Effect of ewe age and high population density on the early nursing behaviour of mouflon. *Ethology Ecology y Evolution* 7: 323-334.

Rebke M, Coulson T, Becker PH y Vaupel JW. 2010. Reproductive improvement and senescence in a long-lived bird. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(17): 7841-7846.

Reiter J, Panken KJ y Le Boeuf BJ. 1981. Female competition and reproductive success in northern elephant seals. *Animal Behaviour* 29: 670-687.

Reuman PD, Paganini CM, Ayoub EM y Small Jr PA. 1983. Maternal infant transfer of influenza-specific immunity in the mouse. *The Journal of Immunology* 130: 932-936.

Roach DA y Carey JR. 2014. Population Biology of aging in the wild. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 45(1): 421-443.

Robinson JG. 1982. Intrasexual competition and mate choice in primates. *American Journal of Primatology Supplement* 1: 131-144.

Rödel HG, Bora A, Kaiser J, Kaetzke P, Khaschei M y von Holst D. 2004. Density-dependent reproduction in the European rabbit: a consequence of individual response and age-dependent reproductive performance. *Oikos* 104: 529-539.

Rollins-Smith LA y Woodhams DC. 2012. Amphibian immunity: staying in tune with the environment. En: *Ecoimmunology*. Demas GE y Nelson RJ (eds.) Editorial. Oxford University Press. New York. pp. 92.

Roth O, Beemelmans A, Barribeau SM y Sadd BM. 2018. Recent advances in vertebrate and invertebrate transgenerational immunity in the light of ecology and evolution. *Heredity* 121(3): 225-238.

Roth O, Joop G, Eggert H, Hilbert J, Daniel J, Schmid-Hempel P y Kurtz J. 2010. Paternally derived immune priming for offspring in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Journal of Animal Ecology* 79: 403-413.

Roth O, Klein V, Beemelmans A, Scharsack JP y Reusch TBH. 2012. Male pregnancy and biparental immune priming. *The American Naturalist* 180 (6): 802-814.

Ruiz G, Rosenmann M, Novoa FF y Sabat P. 2002. Hematological parameters and stress index in rufous-collared sparrows dwelling in urban environments. *The Condor* 104: 162-166.

Ruiz LA. 1977. Algunos aspectos ecológicos de la isla Isabel, Nayarit. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, UNAM, México.

Saetre GP, Fossnes T y Slagsvold T. 1995. Food provisioning in the pied flycatcher: do females gain direct benefits from choosing bright-coloured males?. *Journal of Animal Ecology* 64(1): 21-30.

Saks L, Ots I y Horak P. 2003. Carotenoid-based plumage coloration of male greenfinches reflects health and immunocompetence. *Oecología* 134: 301-307.

Sam Xiao T. 2017. Innate immunity and inflammation. *Cellular and Immunology* 14:1-3.

Sánchez-Macouzet O, Rodríguez C y Drummond H. 2014. Better stay together: pair bond duration increases individual fitness independent of age-related variation. *Proceedings of the Royal Society* 281: 1-7.

Schroeder J, Nakawaga S, Rees M, Mannarelli ME y Burke T. 2015. Reduced fitness in progeny from old parents in a natural population. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (13): 4021-4025.

Selvaratnam J, Paul C y Robaire B. 2015. Male rat germ cells display age-dependent and cell susceptibility in response to oxidative stress challenges. *Biology of Reproduction* 93(3): 72, 1-17.

Siefferman L y Hill GE. 2003. Structural and melanin coloration indicate parental effort and reproductive success in male Eastern bluebirds. *Behavioral Ecology* 14(6): 855-861.

Simsek-Duran F, Li F, Ford W, Swanson RM, Jones HW y Castora FJ. 2013. Age-associated metabolic and morphologic changes in mitochondria of individual mouse and hamster oocytes. *Plos One* 8: 1-7.

Sin-Yeon K, Torres R, Domínguez CA y Drummond H. 2007. Lifetime philopatry in the blue-footed booby: a longitudinal study. *Behavioral Ecology* 18(6): 1132-1138.

Sloter E, Schmid TE, Marchetti F, Eskenazi B, Nath J y Wyrobek AJ. 2006. Quantitative effects of male age on sperm motion. *Human Reproduction* 21(11): 2868-2875.

Steen R, Sonerud GA y Slagsvold T. 2012. Parents adjust feeding effort in relation to nestling age in the Eurasian Kestrel (*Falco tinnunculus*). *Journal of Ornithology* 153(4): 1087-1099.

Tidière M, Thevenot X, Deligiannopoulou A, Douay G, Whipple M, Siberchicot A, Gaillard JM y Lemaître JF. 2018. Maternal reproductive senescence shapes the fitness consequences of the parental age difference in ruffed lemurs. *Proceedings of the Royal Society* 285(1886): 1-6.

Torres R y Drummond H. 1999. Does Large Size Make Daughters of the Blue-Footed Booby More Expensive Than Sons?. *Journal of Animal Ecology* 68 (6): 1133-1141.

Tovakol M y Dennick R. 2011. Making sense of Cronbach's Alpha. *International Journal of Medical Education* 2: 53-55.

Van Maanen C, Bruin G, de Boer-Luijze E, Smolders G y de Boer GF. 1992. Interference of maternal antibodies with the immune response of foals after vaccination against equine influenza. *Veterinary Quarterly* 14: 13-17.

Veiga JP. 1993. Badge size, phenotypic quality, and reproductive success in the house sparrow: a study on honest advertisement. *Ecolution* 47(4): 1161-1170.

Velando A, Noguera JC, Drummond H y Torres R. 2011. Senescent males carry premutagenic lesions in sperm. *Journal of Evolutionary Biology* 24: 693-697.

Vleck CM, Vertalino N, Vleck D y Bucher TL. 2000. Stress, corticosterone, and heterophil to lymphocyte ratios in free-living Adélie penguins. *The Condor* 102: 392-400.

Voegeli B, Saladin V, Wegmann M y Richner H. 2013. Heterozygosity is linked to the costs of immunity in nestling great tits (*Parus major*). *Ecology and Evolution* 3(14): 4815-4827.

Wallace WHB y Kelsey TW. 2010. Human ovarian reserve from conception to the menopause. *Plos One* 5: 1-9.

Willadsen P y Jongejan F. 1999. Immunology of the tick–host interaction and the control of ticks and tick-borne diseases. *Parasitology Today* 15(7): 258-262.

Williams PD y Day T. 2003. Antagonistic pleiotropy, mortality source interactions, and the evolutionary theory of senescence. *Evolution* 57(7): 1478-1488.

Wilson AJ, Nussey DH, Pemberton JM, Pilkington JG, Morris A, Pelletier F, Clutton-Brock TH y Kruuk LEB. 2007. Evidence for a genetic basis of aging in two wild vertebrate populations. *Current Biology* 17: 2136-2142.

Wojtaszek J, Dziewulska-Szwajkowska D, Lozinska-Gabska M, Adamowicz A y Dzugaj A. 2002. Hematological effects of high dose of cortisol on the carp (*Cyprinus carpio* L.): cortisol effect on the carp blood. *General and comparative Endocrinology* 125: 176-183.

Yoccoz NG, Mysterud A, Langvatn R y Stenseth NC. 2002. Age- and density-dependent reproductive effort in male red deer. *Proceedings of the Royal Society* 269: 1523-1528.

Zanchi C, Troussard JP, Martinaud G, Moreau J y Moret Y. 2011. Differential expression and costs between maternally and paternally derived immune priming for offspring in an insect. *Journal of Animal Ecology* 80: 1174-1183.