

DEPARTAMENTO DEL INSTITUTO “CAVANILLES” DE
BIODIVERSIDAD Y BIOLOGÍA EVOLUTIVA

INTERRELACIONES ENTRE ESTRÉS, INMUNIDAD Y
PARASITISMO EN EL HERRERILLO COMÚN (PARUS
CAERULEUS)

GUSTAVO TOMÁS GUTIÉRREZ

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2005

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 18 de Novembre de 2005 davant un tribunal format per:

- D. Florentino de Lope Rebollo
- D. Emilio Barba Campos
- D. Andrés Barbosa Alcón
- D. Juan José Soler Cruz
- D. José Luis Tella Escobedo

Va ser dirigida per:
D. Santiago Merino Rodríguez

©Copyright: Servei de Publicacions
Gustavo Tomás Gutiérrez

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6372-8

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

Interrelaciones entre estrés, inmunidad y parasitismo en el herrerillo común (*Parus caeruleus*)

Gustavo Tomás Gutiérrez

Tesis Doctoral

Julio 2005



Departamento de Ecología Evolutiva
Museo Nacional de Ciencias Naturales
Consejo Superior de Investigaciones Científicas



VNIVERSITAT D VALÈNCIA

Instituto Cavanilles de Biodiversidad
y Biología Evolutiva
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Valencia





VNIVERSITAT ID VALÈNCIA

Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Valencia

Interrelaciones entre estrés, inmunidad y parasitismo en el herrerillo común (*Parus caeruleus*)

Memoria presentada por el Licenciado D. Gustavo Tomás Gutiérrez para optar al grado de Doctor en Biología, dentro del programa de doctorado “Biodiversidad y Biología Evolutiva” de la Universidad de Valencia, dirigida por el Dr. Santiago Merino Rodríguez, del Museo Nacional de Ciencias Naturales – CSIC

Madrid, Julio de 2005

El Doctorando

Vº Bº del Director

Vº Bº del Tutor

Gustavo Tomás Gutiérrez

Santiago Merino Rodríguez

José A. Gil-Delgado Alberti

Contenidos

AGRADECIMIENTOS	pág. 5
CAPÍTULO 1	pág. 7
Introducción general:	
1.1 Parasitismo	pág. 7
1.2 Respuesta inmunitaria	pág. 12
1.3 Respuesta al estrés	pág. 17
1.4 Estado de salud y construcción del nido	pág. 23
1.5 Especie y zona de estudio	pág. 25
1.6 Objetivos	pág. 29
1.7 Referencias	pág. 30
CAPÍTULO 2	pág. 43
Obtención y análisis de muestras sanguíneas para la detección de proteínas del estrés en aves silvestres	
CAPÍTULO 3	pág. 57
Detección de inmunoglobulinas en plasma de aves silvestres mediante ELISA directo: un estudio metodológico para validar la técnica en diferentes especies usando anticuerpos anti-gallina	
CAPÍTULO 4	pág. 73
Niveles de proteínas de estrés e infección por parásitos sanguíneos en el herrerillo común (<i>Parus caeruleus</i>): un experimento de medicación en condiciones naturales	
CAPÍTULO 5	pág. 99
Ajuste de los niveles de inmunoglobulinas y el esfuerzo reproductor en relación a la infección por parásitos sanguíneos: un experimento de medicación con un paseriforme silvestre	
CAPÍTULO 6	pág. 119
Efecto del esfuerzo parental sobre los niveles de inmunoglobulinas y de la proteína de estrés HSP60 en hembras de herrerillo común: un experimento de manipulación del tamaño de la nidada	
CAPÍTULO 7	pág. 137
Consecuencias del parasitismo y la reutilización de los nidos para las hembras de herrerillo común (<i>Parus caeruleus</i>)	
CAPÍTULO 8	pág. 165
Peso del nido, eficiencia en la incubación y estado de salud de la hembra en el herrerillo común (<i>Parus caeruleus</i>)	
CAPÍTULO 9	pág. 183
Conclusiones	

AGRADECIMIENTOS

Muchas son las personas que han contribuido de forma positiva a que este proyecto vea la luz, y poco el espacio de que dispongo para expresarles mi agradecimiento. Algunas se me olvidarán entre la lista de nombres, y otras jamás leerán estas páginas. Gracias a todos.

En primer lugar, vaya mi más sincero agradecimiento a mi director Santiago Merino, por haberme ofrecido la oportunidad de realizar esta tesis, que sin él no sería ni un ápice de lo que es, por su aliento cuando la beca no llegaba, por compartir conmigo una parte de sus conocimientos, por enseñarme una forma de trabajar y de aprovechar bien el tiempo, por saber dirigirme contra viento y marea, por sus ánimos en todo momento, y por estar siempre dispuesto a resolver todas mis dudas cuando hiciera falta.

Durante estos años en el Museo también he tenido la oportunidad de trabajar con Juan Moreno, cuya contribución a esta tesis ha sido esencial, desde el trabajo de campo *currando como jabatos*, hasta la discusión de los trabajos. También con Juanjo Sanz, en el campo al principio y resolviendo dudas en el despacho después, me tuvo que aguantar en la mesa de al lado hasta que le dieron un despacho propio. La aportación de Javier Martínez de la Universidad de Alcalá ha sido también esencial durante esta tesis; gracias por adiestrarme en el laboratorio, en la puesta a punto de los protocolos, por resolver toda clase de dudas, por las discusiones sobre sistema inmune, política, HSPs, por permitirnos usar su laboratorio,... Gracias también a Luismi Carrascal por resolver presto las dudas sobre estadística.

Quisiera también agradecer a José Antonio Gil-Delgado, Emilio Barba y Juan Monrós, de la Universidad de Valencia, con quienes me inicié en esto de la ecología de aves durante la carrera y aún mantengo contacto.

Con Elena, Judith, Elisa y Josué he compartido campo, laboratorio, ordenador, comidas, risas, agobios,... ¿qué puedo decir? Ha sido un placer haber trabajado con vosotros. Gracias por vuestra ayuda y afecto durante estos años. También me gustaría agradecer a todos los que han colaborado en el campo, en especial a Tonan, que también me echó una mano con los frotis, y a José, José Luis, Inma y Montse.

Al resto de compañeros del Museo, gracias por amenizar el trabajo de laboratorio y las horas de las comidas en el césped y en la sala de juntas, y alguna cervecica en el quiosco: Eva, Isabel, Pedro, Cristina, Óscar, Luis, Ana, Leticia, Aurelio, Juan, M^a José, Natalia, Raquel, Tere, Pilar, “la Guaci”, Elena, Sonia,...

A mis compañeros de despacho, por hacer de la 1111 un sitio más agradable: Noemí, Jaime, Liesbeth, Kevin, Diego, Pablo, Juanto...

A la gente con quien he convivido en el Ventorrillo durante las épocas de campo, de los que he aprendido que no sólo los pájaros son interesantes: sobre todo a Nino, y también a Alberto, Pedro, Iván, Montse, Kinga, Pati, Irene, Janien, David, Leticia, Carlos, Adegá, Pablo, Iñaki, Nuria,...

Gracias también a mis compañeros, becarios y no becarios, de la Residencia de Estudiantes, en especial a Nico, Manolo y Rubén, de estos aprendí que incluso se pueden estudiar cosas que no tengan nada que ver con la biología, hay gente para todo...

Gracias a mis amigos y a mis compañeros de piso en Madrid, muchos ya no están, pero son un grato recuerdo. En especial a Toni, por aguantar y comprender el estrés de una tesis sobre estrés, mis escapadas al Ventorrillo durante el campo, tantos fines de semana, ...nos vemos en Nueva York, o en Holanda. También a Marco, Edu y Ramón. Es un placer haber vivido con vosotros estos años, mis colegas en Madrid.

Gracias también a los amigos que han venido de visita, y a los que dijeron que vendrían. Los de Romanos, que sé que siempre están ahí, y los de Valencia: David, Jesús, Antonio, Eva, María, Miguel,...

A mi familia, y en particular a mis padres y a mi hermano, por apoyarme siempre para hacer lo que me gusta.

Pero sobre todo, a Luisa, no por su ayuda con el formato de la tesis en el sprint final, que también, sino por estar siempre ahí y ser siempre un apoyo incondicional, por compartir su tiempo conmigo, por su comprensión, por ser tan buena gente, por acompañarme en el camino de esta tesis, desde las solicitudes de becas hasta la encuadernación final, por su buen humor, su alegría y sus ganas de vivir, por los veranos y los inviernos en esta ciudad, por tantas acampadas, por las hojas de reclamaciones, y por Europa... y por Sudamérica. Gracias por ser especial.

Esta tesis se financió con los proyectos BOS2000-1125 y BOS2003-05724 del Ministerio de Ciencia y Tecnología, de Santiago Merino y Javier Martínez, y BOS2001-0587, de Juan Moreno. Me fue concedida una beca FPI de la Comunidad de Madrid, y por dos años, una beca de estancia del Ayuntamiento de Madrid en la Residencia de Estudiantes.

Introducción General

1.1. PARASITISMO

El parasitismo es una forma de vida muy común en la naturaleza, de tal modo que se estima que más de la mitad de los seres vivos son formas parásitas (Price 1980). Un parásito se definiría como aquel organismo que vive en o sobre otro organismo hospedador, del cual toma alimento u otros recursos que necesita, infringiendo costes que suponen una reducción de la eficacia biológica del hospedador. Entre estos costes, los más destacables serían un aumento de la mortalidad, un debilitamiento de las funciones del hospedador, o una reducción de su fecundidad. En este escenario, no es difícil comprender que las interacciones entre los parásitos y sus hospedadores juegan un papel extremadamente importante en la modulación de las estrategias vitales y la historia evolutiva de unos y otros (Merino 2002). La presión de selección

que ejercen los parásitos tiene potencial para regular los tamaños poblacionales de los hospedadores (Anderson y May 1979; Marzal et al. 2005) así como su estructura demográfica (Freeland 1976) o social (Zuk et al. 1998), para alterar los ciclos poblacionales de éstos (Dobson y Hudson 1992), e incluso para modificar la estructura de las comunidades de hospedadores (Minchella y Scott 1991). Los parásitos pueden asimismo modificar la estructura genética de sus hospedadores (p.ej. Shykof y Schmid-Hempel 1991), favorecer la evolución del sexo (Hamilton 1980) o promover la aparición y mantenimiento de caracteres sexuales secundarios exagerados por medio de la selección sexual (Hamilton y Zuk 1982; Zuk 1992). Por otra parte, los parásitos tienen un papel relevante en la evolución y modulación del complejo sistema inmune de los vertebrados

(Mitchell 1991; Hedrick 1994; Wakelin 1997).

La comprensión de los intrincados entramados que subyacen en las interacciones ecológicas y evolutivas entre hospedadores y parásitos tiene un interés indiscutible en sí misma, pero puede además ser de gran utilidad para la evaluación de la calidad y estado de conservación de los ecosistemas. En este sentido, se ha sugerido que la riqueza y diversidad de la fauna parasitaria puede ser un buen indicador del estado general del ecosistema o del grado de recuperación de una zona degradada (MacKenzie 1987; Gardner y Campbell 1992).

En las últimas décadas se ha incrementado considerablemente nuestro conocimiento acerca de las interacciones entre hospedadores y parásitos en la naturaleza. Numerosos estudios, cuyos resultados se han recopilado en varias monografías específicas sobre el tema (Price 1980; Loye y Zuk 1991; Clayton y Moore 1997), han documentado el importante papel que los parásitos tienen como fuerza selectiva en las poblaciones animales. Por definición, los parásitos drenan recursos del hospedador, que de otro modo podrían ser dirigidos a otras funciones. Entre los múltiples parásitos que cohabitan con las aves, nos

centraremos aquí en dos de los tipos más estudiados: los parásitos sanguíneos y los ectoparásitos (Crompton 1997).

Desde helmintos hasta protozoos, diversos parásitos emplean la sangre de las aves como medio de subsistencia. Existen nematodos parásitos que viven en los tejidos o la cavidad peritoneal y liberan microfilarias al torrente sanguíneo, tripanosomas flagelados que viven y se dividen en la sangre, y parásitos intracelulares que completan una parte del ciclo vital dentro de las células sanguíneas (Atkinson y Van Riper 1991; Fig. 1). Los materiales del nido y el ambiente que éste proporciona constituyen otro hábitat idóneo para muchos ectoparásitos. Diversos tipos de artrópodos, como pulgas, adultos y larvas de dípteros, ácaros, garrapatas y piojos se alimentan de la sangre de las aves adultas y sus polluelos durante su estancia en el nido (Fig. 2). Tanto los parásitos sanguíneos como los ectoparásitos de los nidos pueden adaptarse a la biología de los hospedadores de diversas formas, desde acoplar sus ciclos reproductores a los de las aves hasta desarrollar comportamientos de búsqueda de hospedador y oviposición muy especializados (Loye y Carroll 1998).

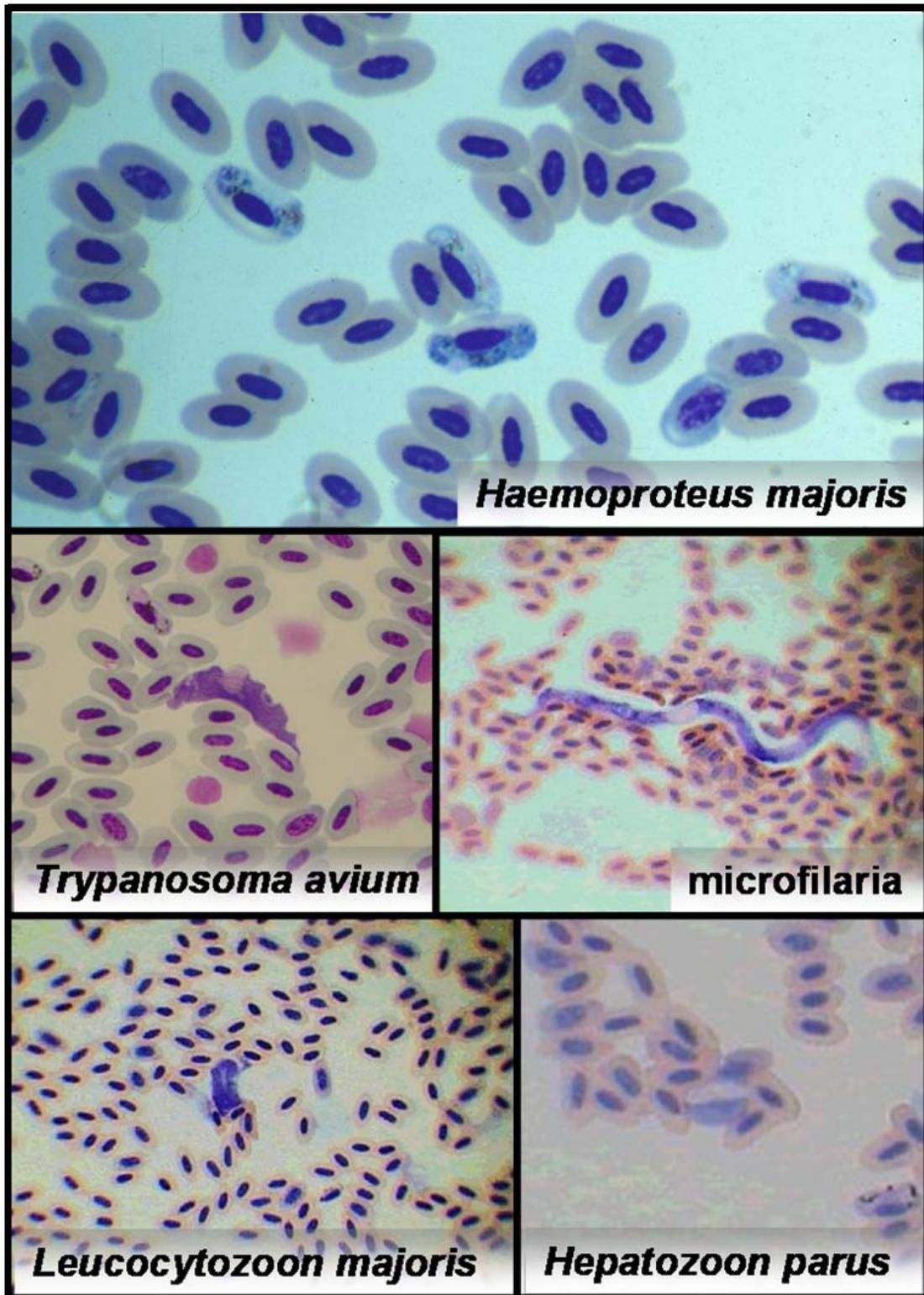


Fig. 1. Fotografías de diversas especies de parásitos sanguíneos presentes en el herrerillo común.

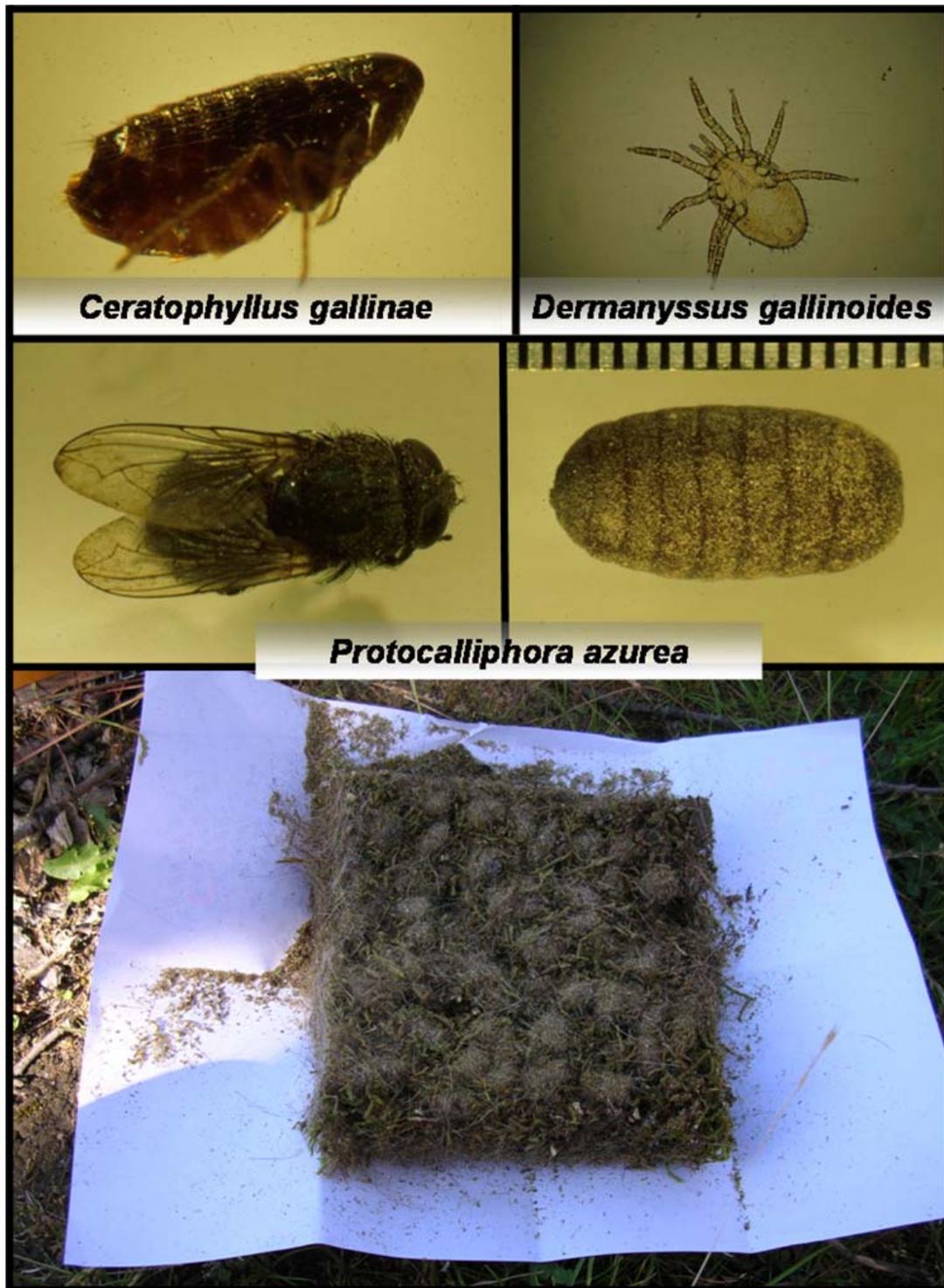


Fig. 2. Fotografías de diversas especies de ectoparásitos presentes en los nidos de herrerillo común. Se muestra la vista inferior de un nido con pupas de *Protocalliphora azurea*.

Se ha demostrado que los parásitos sanguíneos pueden tener efectos nocivos en diversas fases del ciclo reproductor de las aves, desde intervenir en la determinación del tamaño de la puesta (Marzal et al. 2005), pasando por disminuir el éxito de eclosión (Sanz et al. 2001a; Marzal et al. 2005) y el éxito de volantones (Merino et al. 2000a), y afectar a la condición de los adultos tras la reproducción (Merino et al. 2000a). De modo análogo, los ectoparásitos pueden estar asociados a un retraso en el inicio de la reproducción (Oppliger et al. 1994), pueden ser importantes en la evolución del tamaño de la puesta en aves (Richner y Heeb 1995; Martin et al. 2001; pero véase Tella et al. 2002), pueden afectar negativamente al éxito de eclosión (Møller et al. 1990; de Lope et al. 1993; Oppliger et al. 1994), al crecimiento y la supervivencia de los polluelos (Merino y Potti 1995a; Hurtrez-Boussès et al. 1998), a su capacidad de dispersión y a la razón de sexos poblacional (Heeb et al. 1999), y a la condición y supervivencia de los adultos (Brown et al. 1995; Christe et al. 2002). Todos estos costes influyen negativamente de un modo u otro en el éxito reproductor o la supervivencia de las aves, ocasionando así una

disminución de su eficacia biológica (Møller et al. 1990; Lehmann 1993).

Varios estudios han demostrado que un aumento en el esfuerzo reproductor ocasiona un aumento en los niveles de infección por parásitos sanguíneos (Richner et al. 1995; Oppliger et al. 1996; Merilä y Andersson 1999; Wiehn et al. 1999). Sin embargo, aún no están bien esclarecidos los costes y compromisos a que se enfrentan los hospedadores que padecen infecciones parasitarias crónicas, ni sus implicaciones a largo plazo. En este sentido, el conocimiento de los mecanismos fisiológicos subyacentes a la evolución de las defensas y comportamientos antiparasitarios se torna de una relevancia extrema para comprender los compromisos que los parásitos inducen en las estrategias vitales de los hospedadores (Sheldon y Verhulst 1996; Norris y Evans 2000).

La presión selectiva ejercida por los parásitos ha forzado la evolución de mecanismos de defensa en los hospedadores para contrarrestar los efectos deletéreos del parasitismo. Entre estas defensas inducidas por parásitos cabe destacar la aparición de modificaciones comportamentales de diversos tipos (Barnard y Behnke 1990; Hart 1997; Moore 2002). Por citar

algunos ejemplos, se ha documentado la evitación de lugares infestados por parásitos para nidificar (Oppliger et al. 1994; Merino y Potti 1995b; Rendell y Verbeek 1996; Rytönen et al. 1998; véase también Loye y Carroll 1998) o para descansar (Christe et al. 1994; Merilä y Allander 1995), y la adición de fragmentos de plantas al nido con supuestas propiedades repelentes de ectoparásitos que llevan a cabo algunas especies de aves (Clark y Mason 1985; Clark 1991; Petit et al. 2002).

Más allá de las estrategias comportamentales, el arma más efectiva con que cuentan los organismos para hacer frente a las infecciones parasitarias y para tratar de minimizar sus efectos probablemente sea su sistema inmunitario (Wakelin 1996). Las defensas en sí mismas, sean del tipo que sean, son costosas de producir, lo que conlleva la existencia de compromisos fisiológicos y evolutivos entre minimizar el coste infringido por el parasitismo y la expresión de tales defensas (Roff 1992; Stearns 1992).

1.2. RESPUESTA INMUNITARIA

Los ecólogos evolutivos comenzaron a prestar un mayor interés por la inmunología a medida que se fue extendiendo la idea de que el parasitismo podía ser un importante agente selectivo en numerosos aspectos de la ecología animal (Folstad y Karter 1992; Sheldon y Verhulst 1996; Zuk et al. 1996). Hoy en día, la evaluación de la capacidad de respuesta inmune de los individuos se torna de una relevancia extrema a la hora de explicar numerosos patrones ecológicos y de estrategias vitales de los organismos en libertad (Norris y Evans 2000; Zuk y Stoehr 2002; Schmid-Hempel 2003), a través del estudio de lo que ha dado en llamarse inmunología ecológica (Sheldon y Verhulst 1996). La teoría de las estrategias vitales asume la existencia de costes asociados a los mecanismos de respuesta inmune, y por consiguiente, variaciones individuales y compromisos en el uso de recursos entre esta y otras funciones (Deerenberg et al. 1997; Moreno et al. 1999; Lochmiller y Deerenberg 2000; Merino et al. 2000b).

El sistema inmunitario tiene la función esencial de discriminar entre

los componentes propios y los ajenos al organismo, siendo esta discriminación la base de la defensa frente a los patógenos (Roitt et al. 1996). En un intento por simplificar la indudable complejidad del sistema inmunitario, se han diferenciado un componente innato o inespecífico que frena la entrada de patógenos y los combate por procesos de fagocitosis, y un componente adquirido o específico que se activa en presencia de patógenos. Dentro de la inmunidad adquirida se ha distinguido a su vez entre inmunidad mediada por células o inmunidad celular, en la que intervienen principalmente los linfocitos T, e inmunidad mediada por anticuerpos o inmunidad humoral, donde participan esencialmente los linfocitos B y los anticuerpos que éstos producen (Roitt et al. 1996).

Con el fin de explorar los posibles compromisos existentes entre las estrategias vitales y la inversión en respuesta inmune, se hizo necesario por tanto cuantificar la inmunocompetencia de los organismos, término que Owens y Wilson (1999) definieron como “una medida de la capacidad de un individuo para minimizar los costes de una infección sobre su eficacia biológica”. La diversidad de métodos desarrollados para estimar la inmunocompetencia es incluso mayor que la diversidad de

componentes que posee el sistema inmunitario (Ots et al. 1998; Norris y Evans 2000), requiriéndose el empleo de métodos estandarizados más o menos sencillos. Se podría distinguir entre aquellos métodos que miden el nivel de actividad de determinado componente del sistema inmune en un momento dado (conteos celulares absolutos o relativos, niveles de proteínas plasmáticas, niveles de inmunoglobulinas) y aquellos métodos que estimulan al sistema inmune mediante la inoculación de un antígeno inerte (fitohemaglutinina, eritrocitos de cordero, vacunas) y a continuación se mide la respuesta a esa estimulación. Estos últimos requieren que el animal sea capturado dos veces, pues la respuesta suele medirse como mínimo 24 horas después de la estimulación.

El método más extendido para evaluar la respuesta inmune celular es la prueba de la fitohemaglutinina, utilizada ya de forma rutinaria en infinidad de estudios ecológicos (p.ej. Merino et al. 1999; Smits et al. 1999; Martin et al. 2001; Tella et al. 2002). La respuesta humoral puede ser estimada en base al incremento en los niveles de anticuerpos totales (p.ej. Johnsen y Zuk 1999; Szép y Møller 1999) o de anticuerpos específicos frente a los antígenos antes citados

(p.ej. Saino et al. 1997; Ilmonen et al. 2000). En un principio, la cuantificación de anticuerpos totales se llevaba a cabo separando y detectando la fracción de gammaglobulinas mediante electroforesis (p.ej. Gustafsson et al. 1994; de Lope et al. 1998), si bien más recientemente se están empleando técnicas de hemoaglutinación (Møller et al. 2001; Cichon et al. 2003) o de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) (Gasparini et al. 2001; Fair y Myers 2002; Saino et al. 2003) para la detección de inmunoglobulinas específicas frente a determinados antígenos. Rara vez se han documentado estimaciones de los niveles de inmunoglobulinas totales en sangre sin inoculación de antígeno, excepto en unos pocos estudios con aves de corral (p.ej. Johnsen y Zuk 1999). La mayor dificultad del empleo de ELISA para determinar los niveles de inmunoglobulinas totales radica en que no hay anticuerpos comerciales disponibles para su utilización con especies silvestres. Una solución a este problema ha consistido en desarrollar anticuerpos específicos frente a las inmunoglobulinas de las especies de interés (Hasselquist et al. 1999; Smits y Bortolotti 2001; Ebel et al. 2002), si

bien es laborioso y económicamente costoso.

Las inmunoglobulinas, como se ha señalado previamente, son proteínas producidas sobre la membrana celular de los linfocitos B, que son secretadas en grandes cantidades en respuesta a la presencia de un antígeno, lo que hace que puedan ser detectadas mediante técnicas bioquímicas tradicionales (Janeway y Travers 1997). Se componen de una región constante, que sólo puede tomar un número limitado de formas distinguibles bioquímicamente, y una región variable, que aparentemente puede tomar un número infinito de formas sutilmente diferentes, lo que les permite unirse específicamente a una igualmente vasta variedad de antígenos diferentes (Fig. 3). Esto hace que las inmunoglobulinas estén implicadas en la respuesta inmunitaria frente a un amplio espectro de infecciones parasitarias (Roitt et al. 1996). La especificidad y memoria que caracterizan a este componente del sistema inmunitario minimizan tanto el riesgo de sufrir enfermedades autoinmunes como los costes energéticos de la expresión de la respuesta inmune (Råberg et al. 1998; Klasing y Leshchinsky 1999).

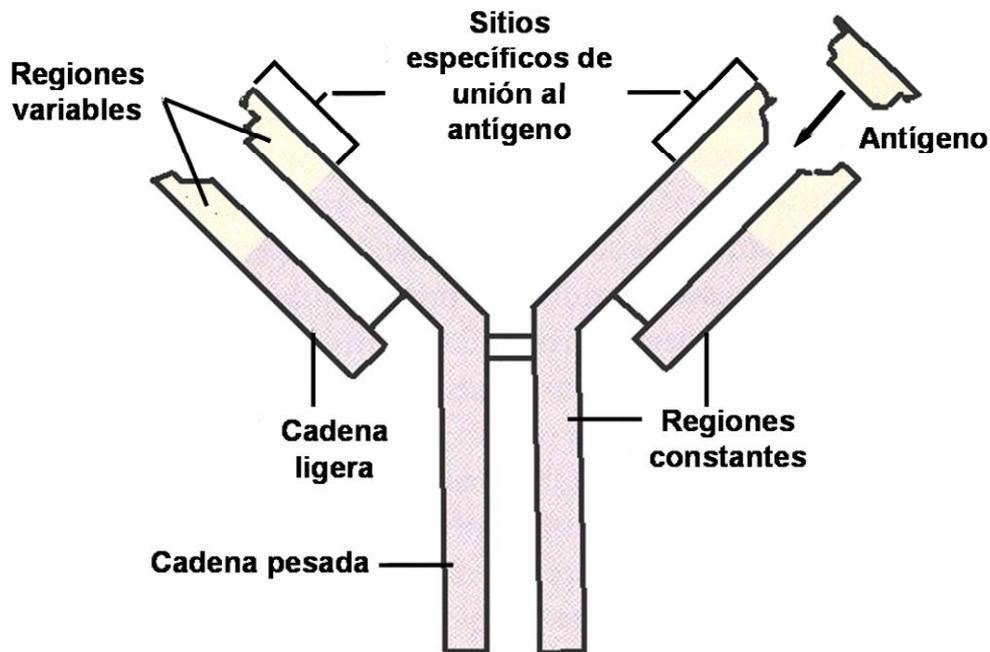


Fig. 3. Estructura básica de la forma soluble de las inmunoglobulinas.

Como parámetro inmunológico, la estimación de los niveles totales de inmunoglobulinas no requiere una captura previa para la inoculación, proporciona información sobre el estado de salud o nutricional del individuo, y puede estar relacionado de alguna manera con su nivel general de inmunocompetencia (Gustafsson et al. 1994). No obstante, este parámetro no está exento de limitaciones, pues al igual que ocurre con otros ensayos, niveles altos de inmunoglobulinas podrían indicar una mejor inmunocompetencia o bien estar reflejando un proceso infeccioso reciente (Sheldon y Verhulst 1996;

Norris y Evans 2000; Zuk y Stoehr 2002). Otro problema señalado con frecuencia hace referencia a la complejidad inherente del sistema inmunitario, cuyos diferentes componentes pueden actuar de forma distinta o incluso contraria en respuesta a la invasión por un determinado patógeno (Norris y Evans 2000; Adamo 2004), lo que dificulta la detección de compromisos en las estrategias vitales.

Por tanto, la interpretación de esta y otras medidas de inmunocompetencia ha de hacerse con cierta cautela, y se necesitarán estudios comparativos de diferentes especies y en distintas

condiciones para que podamos acercarnos a una mejor comprensión de su significado. Además, se hacen necesarios más estudios empíricos con aves silvestres para conocer mejor el papel que juegan los parásitos en la modulación de las estrategias vitales de las aves en la naturaleza (Sheldon y Verhulst 1996; Norris y Evans 2000; Adamo 2004).

En diversos sistemas hospedador-parásito, se han descrito respuestas inmunológicas frente a las infecciones parasitarias en forma de cambios en los perfiles leucocitarios (p.ej. Graczyk et al. 1994; Massey et al. 1996; Ots y Hõrak 1998), en las proteínas totales del plasma (de Lope et al. 1998; Ots y Hõrak 1998) y en los títulos de anticuerpos (Isobe y Suzuki 1987; Ots y Hõrak 1998; Atkinson et al. 2001). De igual modo, se han documentado cambios en el esfuerzo reproductor en relación a la infección por parásitos sanguíneos (p.ej. Korpimäki et al. 1993; Merino et al. 2000a; Sanz et al. 2001b; Marzal et al. 2005) y por ectoparásitos (Tripet y Richner 1997; Hurtrez-Boussès et al. 1998; Merino et al. 1998a). El compromiso postulado entre esfuerzo reproductor e inversión en inmunidad (Sheldon y Verhulst 1996) puede ayudar a explicar los costes asociados al parasitismo. Este

problema se ha abordado bien manipulando el esfuerzo reproductor (p.ej. Nordling et al. 1998; Moreno et al. 1999; Saino et al. 2002), bien manipulando los componentes celular o humoral de la respuesta inmune (p.ej. Williams et al. 1999; Ilmonen et al. 2000; Råberg et al. 2000). En este último caso, se ha simulado la infección por un patógeno mediante la inoculación de antígenos inertes, si bien la manipulación de parásitos reales tiene la ventaja de poder revelar modificaciones en respuesta inmunitaria o esfuerzo reproductor que tengan significado real para las estrategias vitales de los organismos (Sheldon y Verhulst 1996; Owens y Wilson 1999; Norris y Evans 2000; Zuk y Stoehr 2002).

Por otra parte, es conocido que el esfuerzo físico puede causar inmunosupresión (Råberg et al. 1998; Pedersen y Hoffman-Goetz 2000), haciendo que los individuos sean más susceptibles a las enfermedades. Además, por medio de la interacción entre el sistema endocrino y el sistema inmune, los incrementos hormonales que van asociados al proceso reproductivo pueden tener un efecto inhibitorio de las respuestas inmunes celular y humoral (Folstad y Karter 1992; Roberts et al. 2004). En este

sentido, las recaídas de diversas patologías como por ejemplo las causadas por parásitos sanguíneos, suelen ir asociadas al comienzo de la reproducción (Atkinson y Van Riper 1991). Paralelamente, el esfuerzo durante la reproducción conlleva un incremento de las tasas metabólicas (Drent y Daan 1980), asociado a una mayor producción de metabolitos perjudiciales a nivel celular, como son los radicales libres de oxígeno (Alonso-Alvarez et al. 2004; Wiersma et al. 2004). En consecuencia, los organismos han desarrollado diversos mecanismos de defensa para contrarrestar los efectos negativos que los niveles elevados de estrés fisiológico pueden tener sobre su fecundidad y supervivencia.

1.3. RESPUESTA AL ESTRÉS

La definición del término estrés ha sido una de las más controvertidas en el campo de la biología. Está abierta a interpretaciones amplias, y se ha utilizado tanto para referirse al agente causante de la respuesta fisiológica (p.ej. temperatura, depredadores), como a la respuesta fisiológica en sí. Nos referiremos a la respuesta de estrés como la combinación de respuestas

fisiológicas originadas por cambios adversos e impredecibles a corto y largo plazo en las condiciones ambientales (Buchanan 2000). Estas respuestas fisiológicas tienen lugar para tratar de minimizar los efectos deletéreos del agente estresante sobre el correcto funcionamiento del organismo (Sørensen et al. 2003). El estrés fisiológico a que se enfrentan los organismos a lo largo de su vida puede tener por tanto importantes repercusiones sobre su eficacia biológica, y así influir en la evolución de sus estrategias vitales (p.ej. Sapolsky 1992, 1995). Por esta razón, las estimas de estrés fisiológico pueden ser de gran utilidad para evaluar los efectos que diversos factores ambientales o ecológicos tienen sobre los seres vivos a corto y largo plazo (Buchanan 2000).

Los niveles individuales de estrés pueden medirse de diversas formas, siendo unas u otras más útiles en función del diseño experimental o del grado de sensibilidad que queramos detectar. La evaluación de cambios en la condición corporal a medio o largo plazo, o de alteraciones en el comportamiento y en los ciclos vitales de los organismos puede aportarnos valiosa información en un amplio abanico de grupos animales. En

vertebrados se han empleado otras medidas más específicas para evaluar los niveles de estrés fisiológico, entre las que cabe destacar la medida de la producción de glucocorticoides (p.ej. Suorsa et al. 2003) y la proporción relativa de tipos celulares, principalmente la razón entre heterófilos y linfocitos descrita por Gross y Siegel (1983) y Davison et al. (1983). La medida de glucocorticoides, usualmente corticosterona, plantea la dificultad de que la muestra ha de ser tomada en un tiempo muy breve tras la captura para evitar variaciones en los niveles de hormona debidos al estrés causado por la manipulación del animal (Broom y Johnsen 1993). Frente a la estimación de la razón heterófilos/linfocitos, parámetro que puede estar asociado a determinados tipos de estrés fisiológico (Maxwell y Robertson 1998; Moreno et al. 2002a,b), ha ganado peso recientemente la evaluación de los niveles de proteínas de choque térmico (*heat shock proteins* o HSPs), un indicador más robusto que la razón heterófilos/linfocitos en determinados casos (Moreno et al. 2002a; Martínez-Padilla et al. 2004). La medición de los niveles de HSPs elimina en buena medida los problemas derivados del estrés causado por la manipulación del

animal, al ser su respuesta menos rápida que la producida por glucocorticoides. Además, las HSPs son más apropiadas que los glucocorticoides para estudiar los efectos de la exposición a agentes estresantes crónicos o a largo plazo, que de hecho pueden tener más importancia en términos de eficacia biológica de los individuos en un contexto ecológico (Feder y Hofmann 1999; Sørensen et al. 2003).

Las HSPs son un grupo de polipéptidos intracelulares altamente conservado a lo largo de la evolución y que está presente en todos los organismos de todos los Reinos en que se han estudiado (Lindquist 1986). Funcionan como celadoras moleculares (*molecular chaperones*) y representan una primera barrera defensiva frente a alteraciones de la homeostasis celular (Morimoto 1991). Intervienen en diversas funciones como la síntesis, ensamblaje y transporte de otras proteínas, y en la degradación y eliminación de proteínas desnaturalizadas (Morimoto 1991, Fig. 4). Las HSPs fueron descubiertas por vez primera en la década de los años 60, en los cromosomas politénicos de las glándulas salivares de *Drosophila* (Ritossa 1962). Posteriormente se les denominó proteínas de choque térmico

tras encontrarse asociadas a procesos de hipertermia (Tissières et al. 1974). Hoy en día, las HSPs se engloban dentro de un grupo más amplio de proteínas denominadas genéricamente proteínas de estrés, ya que se ha demostrado que actúan en respuesta no

sólo a incrementos de la temperatura, sino a otros agentes físicos, químicos y ecológicos estresantes de muy diversa índole (véase revisión en Lindquist 1986; Feder y Hofmann 1999; Tabla 1).

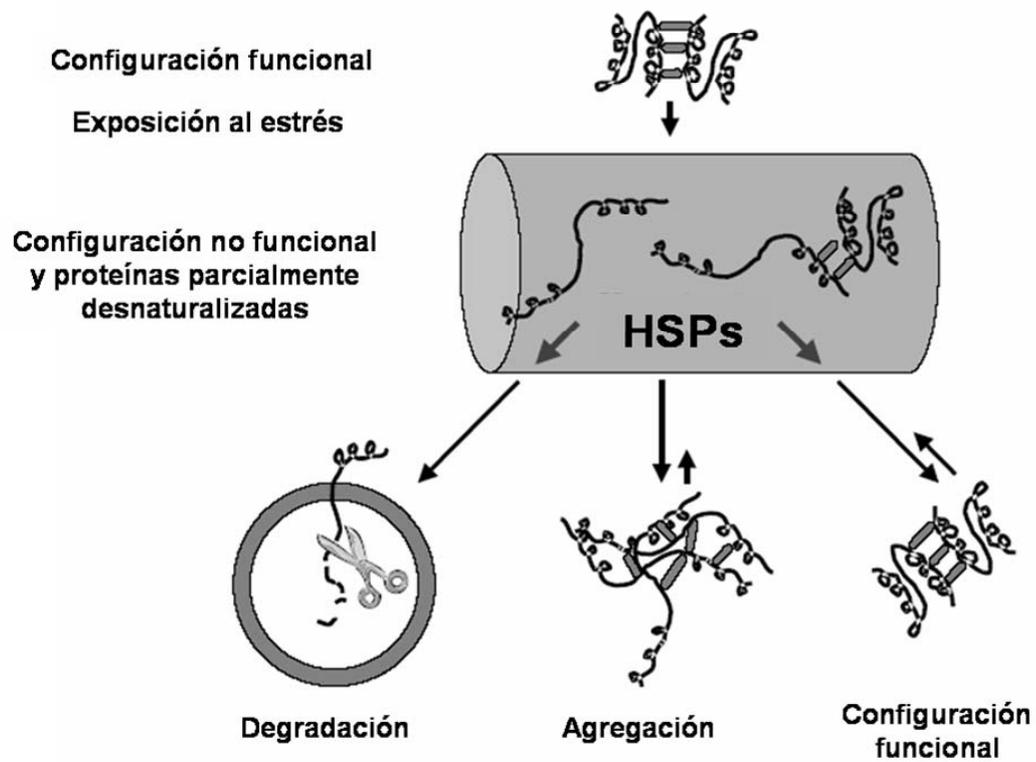


Fig. 4. Esquema del modo de actuación de las proteínas de estrés sobre proteínas con configuraciones no funcionales tras la exposición a un agente estresante (modificado de Sørensen et al. 2003).

Tabla 1. Agentes ecológicos estresantes que inducen la respuesta al estrés mediada por HSPs (modificado de Sørensen et al. 2003).

Agentes estresantes	Referencias
<i>Ambientales</i>	
Alta temperatura	(Tissières et al. 1974; Gehring y Wehner 1995; Jenkins et al. 1997; Otsuka et al. 1997; Li et al. 1999; Sonna et al. 2002)
Baja temperatura	(Jenkins et al. 1997; Goto et al. 1998; Li et al. 1999; Martínez et al. 2001; Sonna et al. 2002; Sejerkilde et al. 2003)
Radiación (UV)	(Trautinger et al. 1996; Jenkins et al. 1997; Kiriya et al. 2001)
Metales pesados	(Steinert y Pickwell 1993; Köhler y Eckwert 1997; Werner y Nagel 1997; Mariño et al. 1999; Tedengren et al. 1999)
Pesticidas	(Werner y Nagel 1997; Ait-Aissa et al. 2000; Yang et al. 2002; Nazir et al. 2003)
Hipoxia	(Ma y Haddad 1997)
Salinidad	(Diamant et al. 2001; Drew et al. 2001; Hamilton et al. 2001; Spees et al. 2002)
Alta densidad	(Sørensen y Loeschcke 2001)
Infecciones bacterianas y virales	(Collins y Hightower 1982; Polla 1988; Kaufmann y Schoel 1994; Deitch et al. 1995)
Parasitismo	(Nagasawa et al. 1992; Merino et al. 1998b, 2002; Martínez et al. 1999a; Rinehart et al. 2002)
Actividad física	(Skidmore et al. 1995; Fehrenbach y Niess 1999)
Desecación	(Alamillo et al. 1995; Tammariello et al. 1999)
Estrés oxidativo	(Ropp et al. 1983; Martínez et al. 1999b; Gophna y Ron 2003)
<i>Genéticos</i>	
Senescencia	(Wheeler et al. 1999)
Consanguinidad	(Kristensen et al. 2002)
Mutaciones deletéreas	(Sherman y Goldberg 2001; Trotter et al. 2002; Zhao et al. 2002)

Este importante papel que las proteínas de estrés tienen en la regulación de toda una pléyade de procesos fisiológicos en todos los seres vivos ha suscitado un creciente interés desde su descubrimiento (Feder 1999), principalmente centrado en la caracterización bioquímica de los distintos tipos de proteínas inducibles, en la descripción de los mecanismos básicos de la respuesta al estrés y en su papel en enfermedades (p.ej. Welch 1992; Macario 1995). Estas investigaciones se han llevado a cabo principalmente mediante estudios de laboratorio con organismos modelo (véase p.ej. Macario 1995; Feder 1996).

Sin embargo, los aspectos ecológicos y evolutivos de la respuesta al estrés mediada por HSPs han recibido escasa atención hasta hace poco (Krebs y Loeschcke 1994; Merino et al. 1998b; Feder 1999; Feder y Hofmann 1999; Buchanan 2000; Sørensen et al. 2003). Además, la evaluación de la respuesta al estrés mediada por HSPs, si bien relativamente rutinaria en áreas como la avicultura o la toxicología veterinaria, apenas ha sido empleada en estudios de campo con especies silvestres (Feder 1996), a pesar de haberse sugerido que las HSPs podrían

ser uno de los bioindicadores más prometedores que pueden ser estudiados (Buchanan 2000; Sørensen et al. 2003).

En aquellos casos en que se ha estudiado la respuesta de estrés mediada por HSPs en poblaciones naturales de vertebrados, los procesos experimentales normalmente han requerido el sacrificio de los animales para llevar a cabo los análisis proteicos a partir de tejido hepático, muscular, cerebral o incluso homogeneizando el animal entero (p.ej. Ulmasov et al. 1992; Eeva et al. 2000; Zatsepina et al. 2000). Tanto por razones éticas como por intereses científicos (seguimiento de poblaciones a largo plazo), este tipo de análisis no es el más deseable, y puede explicar en parte el escaso interés en el estudio del papel ecológico y evolutivo de las HSPs en poblaciones naturales. Por otro lado, esta escasez de estudios puede ser debida quizá a un desconocimiento de los procedimientos metodológicos requeridos para la obtención de muestras de organismos silvestres, la forma de conservar estas muestras o diversos aspectos de su posterior análisis en el laboratorio. Por todo ello, el análisis de las HSPs a partir de células sanguíneas se ha revelado como un método eficaz y preciso para la

evaluación del estrés fisiológico y ambiental en la naturaleza, necesiándose tan sólo una pequeña muestra de sangre en aquellos animales que tienen eritrocitos nucleados (Merino et al. 1998b; Buchanan 2000).

El estudio de las HSPs en un contexto ecológico y evolutivo en poblaciones naturales de aves está todavía en su infancia (Coleman et al. 1995; Buchanan 2000; Sørensen et al. 2003). Se ha demostrado que niveles mayores de HSP60 se asocian con un mayor estrés nutricional en polluelos de papamoscas cerrojillo *Ficedula hypoleuca* (Moreno et al. 2002b). También se han encontrado mayores niveles de HSP70 en machos de papamoscas cerrojillo a los que se indujo experimentalmente a activar sus defensas inmunitarias (Sanz et al. 2004). Se sabe asimismo que los niveles de HSP60 pueden diferir entre sexos (Merino et al. 2002; Martínez-Padilla et al. 2004), y que pueden reflejar las diferencias de tamaño de los polluelos en el nido y así su jerarquía de dominancia en el cernícalo vulgar *Falco tinnunculus* (Martínez-Padilla et al. 2004). También se han encontrado mayores niveles de HSP60 asociados a un retraso en el inicio de la reproducción y a un peor éxito

reproductor en el herrerillo común (Arriero 2004).

Finalmente, estudios previos con varias especies de aves han sugerido la importancia de la HSP60 en respuesta al parasitismo. Los parásitos sanguíneos pueden ser causantes de estrés fisiológico para los hospedadores mediante la destrucción celular y el consumo de hemoglobina (Kirkpatrick y Suthers 1988; Atkinson y Van Riper 1991). Los ectoparásitos también pueden ser causantes de estrés fisiológico por razones similares al sustraer sangre de sus hospedadores, además de provocar irritación y costosas reacciones inflamatorias (Wakelin 1996), y poder actuar como vectores de otras enfermedades (Price 1980; Marshall 1981). Merino et al. (1998b) encontraron niveles mayores de esta proteína en polluelos de avión común *Delichon urbica* infectados por tripanosomas y chinches. En otro estudio con golondrinas comunes *Hirundo rustica*, Merino et al. (2002) relacionaron la infección por diversas especies de parásitos sanguíneos con mayores niveles de HSP60. Arriero (2004) encontró asociaciones entre mayores niveles de HSP60 y parasitación por hemoparásitos y ectoparásitos en adultos y polluelos de herrerillo común.

Casi todos estos resultados se han basado en estudios de tipo correlativo, y se hace necesaria su comprobación mediante aproximaciones experimentales. Además, esta es la única vía posible para la detección de compromisos entre la inducción de la respuesta de estrés y la asignación de recursos a otras funciones vitales, como defensa inmunitaria o inversión en la reproducción. La producción de HSPs parece ser costosa en términos energéticos (p.ej. Coleman et al. 1995; Sørensen et al. 2003). Merino y col. (1998b) encontraron una relación negativa entre los niveles de HSP60 y la longitud del ala en polluelos de avión común, sugiriendo un compromiso entre la activación de la respuesta de estrés frente al parasitismo y el crecimiento. En estudios de laboratorio, se ha mostrado que la producción de HSPs en ausencia de estrés puede tener efectos deletéreos sobre el desarrollo, el crecimiento, la reproducción y la supervivencia (Krebs y Feder 1997, 1998; Roberts y Feder 2000; Silbermann y Tatar 2000). Además, la activación de la maquinaria de producción de HSPs puede interferir directamente en otros sistemas, cabiendo destacar su papel en la modulación de diversos aspectos de la respuesta inmunitaria (revisado por

Feder y Hofmann 1999; Moseley 2000; Pockley 2003; Pruett 2003).

El estudio combinado del papel de la inmunidad humoral y la respuesta de estrés mediada por HSPs puede aportar interesantes conocimientos para una mejor comprensión de los mecanismos fisiológicos que subyacen a las respuestas y compromisos de los hospedadores en su lucha frente a las infecciones parasitarias.

1.4. ESTADO DE SALUD Y CONSTRUCCIÓN DEL NIDO

Las estrategias vitales engloban el conjunto de rasgos relacionados con la variación en fecundidad y supervivencia de los organismos a lo largo de su vida, y en su estudio, uno de los principales retos para el futuro se dirige hacia la búsqueda de los mecanismos subyacentes a los compromisos evolutivos (Moreno 2002). La reproducción supone uno de los principales factores de restricción sobre las estrategias vitales de los organismos, y se ha destinado mucho esfuerzo a determinar y separar las distintas causas y procesos que intervienen en la mediación de los costes implicados. En este sentido, adquiere vital importancia la

evaluación del estado de salud de los individuos, que afecta de manera fundamental a su inversión en las diversas actividades necesarias durante su vida y juega un papel esencial en la modulación de estos compromisos evolutivos.

El estudio de los costes de la reproducción en aves se ha centrado fundamentalmente en los patrones y procesos que gobiernan el intervalo entre la puesta de los huevos y la emancipación de los polluelos (véase Moreno 2002). Sin embargo, el proceso de construcción del nido ha recibido comparativamente menos atención (Hansell 2000), dado que se ha asumido que los costes de construcción del nido son despreciables en relación a los costes de la incubación y la crianza de los polluelos. No obstante, una mayor o menor inversión de recursos en las fases más tempranas de la reproducción puede influir de un modo más acusado a las fases subsiguientes y al éxito general del evento reproductor (Stearns 1992). Por ello, los procesos y compromisos implicados en la construcción del nido están despertando un creciente interés, y su conocimiento puede ser crucial para comprender mejor las estrategias vitales de las aves durante la reproducción (Hansell 2000).

Para las especies de aves que anidan en cavidades, la construcción del nido puede tener costes en términos de gasto de tiempo y energía o exposición a los depredadores (Collias y Collias 1984). La plasticidad fenotípica debería permitir que los individuos ajustaran su comportamiento de construcción del nido en función de las presiones de selección que estén operando en cada situación concreta. El nido de las aves y su proceso de construcción pueden interpretarse como el resultado de un compromiso evolutivo entre los costes de construcción y los beneficios en términos de aislamiento del exterior o mantenimiento de una temperatura óptima para el desarrollo de los huevos y los polluelos (Soler et al 1998a).

Se han propuesto varias hipótesis no excluyentes para intentar explicar la variabilidad intraespecífica en el tamaño del nido, algunas de las cuales pueden ser aplicadas a especies que crían en cavidades. La *hipótesis de la termorregulación* sugiere que el material del nido ayudaría a mantener la temperatura de los huevos y polluelos, minimizando el efecto de las variaciones exteriores de temperatura (White y Kinney 1974; Whittow y Berger 1977; Kern 1984; Hoi et al. 1994). Se demostró en trabajos ya

clásicos que determinadas propiedades del nido, como su densidad o el grosor de la pared pueden afectar al flujo de calor entre el interior y el exterior (Whittow y Berger 1977; Skowron y Kern 1980). Recientemente, se ha mostrado que las propiedades de aislamiento del nido pueden tener efectos marcados sobre la reproducción, pudiendo afectar al tamaño de la puesta (p.ej. Wiebe 2001) o al éxito de eclosión y al número de polluelos volados (p.ej. Reid et al. 2000).

Otra hipótesis más reciente sugiere que el tamaño del nido podría reflejar el estado de salud o la calidad fenotípica de su constructor, pudiendo de este modo indicar también su disposición para invertir en fases posteriores de la reproducción, y siendo por tanto un carácter sujeto a selección sexual (*hipótesis de la señalización sexual*, Moreno et al. 1994; Soler et al. 1998a). Varios trabajos han apoyado esta hipótesis, demostrando que los individuos que están en mejor condición corporal construyen nidos de mayor tamaño (Lens et al. 1994; Soler et al. 1998b) y en menor tiempo (De Neve y Soler 2002). Sin embargo, las evidencias a favor de las diversas hipótesis son aún escasas. Por otra parte, a pesar de que es bien conocido

el papel nocivo de los parásitos en numerosos aspectos de la reproducción de las aves, se desconoce en gran medida su posible influencia sobre el esfuerzo invertido en la construcción del nido.

Para las especies que anidan en cavidades, el tamaño de la cavidad impone una limitación evidente sobre el tamaño del nido (p.ej. Karlsson y Nilsson 1977; Slagsvold 1989). En este sentido, los estudios con cajas-nido representan un escenario ideal para el estudio de la variabilidad en las características del nido, pues todas las aves lo construyen en una cavidad de dimensiones comunes y conocidas.

Parece evidente que una mejor comprensión de los determinantes de la variabilidad en el tamaño del nido, sus causas próximas y sus consecuencias, puede aportarnos importante información sobre aspectos clave de la reproducción de las aves y de sus estrategias vitales (Hansell 2000).

1.5. ESPECIE Y ZONA DE ESTUDIO

Si bien se emplearon otras especies de aves para establecer y validar diversos aspectos metodológicos (Capítulos 2 y 3), la especie modelo de estudio fue el

herrerillo común (*Parus caeruleus*), una especie ampliamente distribuida y de la que se conoce en profundidad su biología reproductora. La población estudiada pertenece a la subespecie nominal *Parus caeruleus caeruleus*. El herrerillo común es un paseriforme pequeño (10 - 12 g), bastante común en los bosques caducifolios y mixtos de la región Paleártica Occidental (Cramp y Perrins 1998). Posee un vistoso plumaje de color verde y azul en el dorso, amarillo en la zona ventral, y blanco con un conspicuo antifaz negro en la cara (Fig. 5). No existe un dimorfismo sexual claro en el color del plumaje ni en el tamaño corporal, si bien los machos suelen tener colores sutilmente más vistosos y ser ligeramente más grandes. Es una especie básicamente sedentaria en casi toda su área de distribución, si bien las poblaciones más norteñas pueden realizar algunos movimientos dispersivos (Cramp y Perrins 1998). Es

territorial durante la época de reproducción, nidifica en cavidades y se adapta perfectamente a criar en cajas-nido. El nido, una copa de musgo y pajas principalmente (Fig. 5), es construido por la hembra sola (Cramp y Perrins 1998), si bien se ha documentado que el macho puede colaborar en determinados casos (Lens et al. 1994). En la población estudiada, las hembras realizan una única puesta cada año, que comienza generalmente a principios de mayo, cuyo tamaño oscila entre 4 y 14 huevos con un promedio de 9.1 huevos, y de donde consigue volar una media de 7.8 polluelos (Fargallo 1997; Fargallo y Johnston 1997). La incubación la realiza la hembra sola, si bien recibe parte del alimento del macho. Ambos sexos ceban a los polluelos, principalmente con orugas de lepidópteros, y éstos abandonan el nido a los 17-20 días de edad.



Fig. 5. Fotografías de la especie (*Parus caeruleus*) y la zona de estudio.

El trabajo de campo se llevó a cabo durante las estaciones reproductoras de 2001, 2002 y 2003 en un bosque caducifolio joven de roble melojo (*Quercus pyrenaica*, Fig. 5) localizado en el término municipal de La Granja, provincia de Segovia (40°54'N, 4°01'O, 1200 m s.n.m.), en la vertiente norte de la sierra de Guadarrama (Sistema Central). El robledal está salpicado por algunos ejemplares de pino silvestre (*Pinus silvestris*) y fresno (*Fraxinus* sp.). El estrato arbustivo está dominado por manchas de jaras (*Cistus laurifolius*), con algunas zarzas y rosales silvestres (*Rosa* sp.) ligados

principalmente a las zonas más húmedas. El bosque está situado en el piso bioclimático supramediterráneo, con unas temperaturas medias anuales entre 8 y 12 °C, y un ombroclima subhúmedo (750-1000 mm de precipitación anual) (Izco 1984). Las cajas-nido, en número variable, han estado disponibles para las aves en el área de estudio desde 1991 (p.ej. Sanz 2002). Los nidos viejos son eliminados cada año tras la reproducción, excepto en determinadas ocasiones. En los tres años de estudio, un total de 300 cajas-nido separadas entre sí por aproximadamente 25 m estuvieron

distribuidas por el área de estudio (Fig. 6). El procedimiento experimental seguido en cada uno de los estudios se

explica detalladamente en cada capítulo.

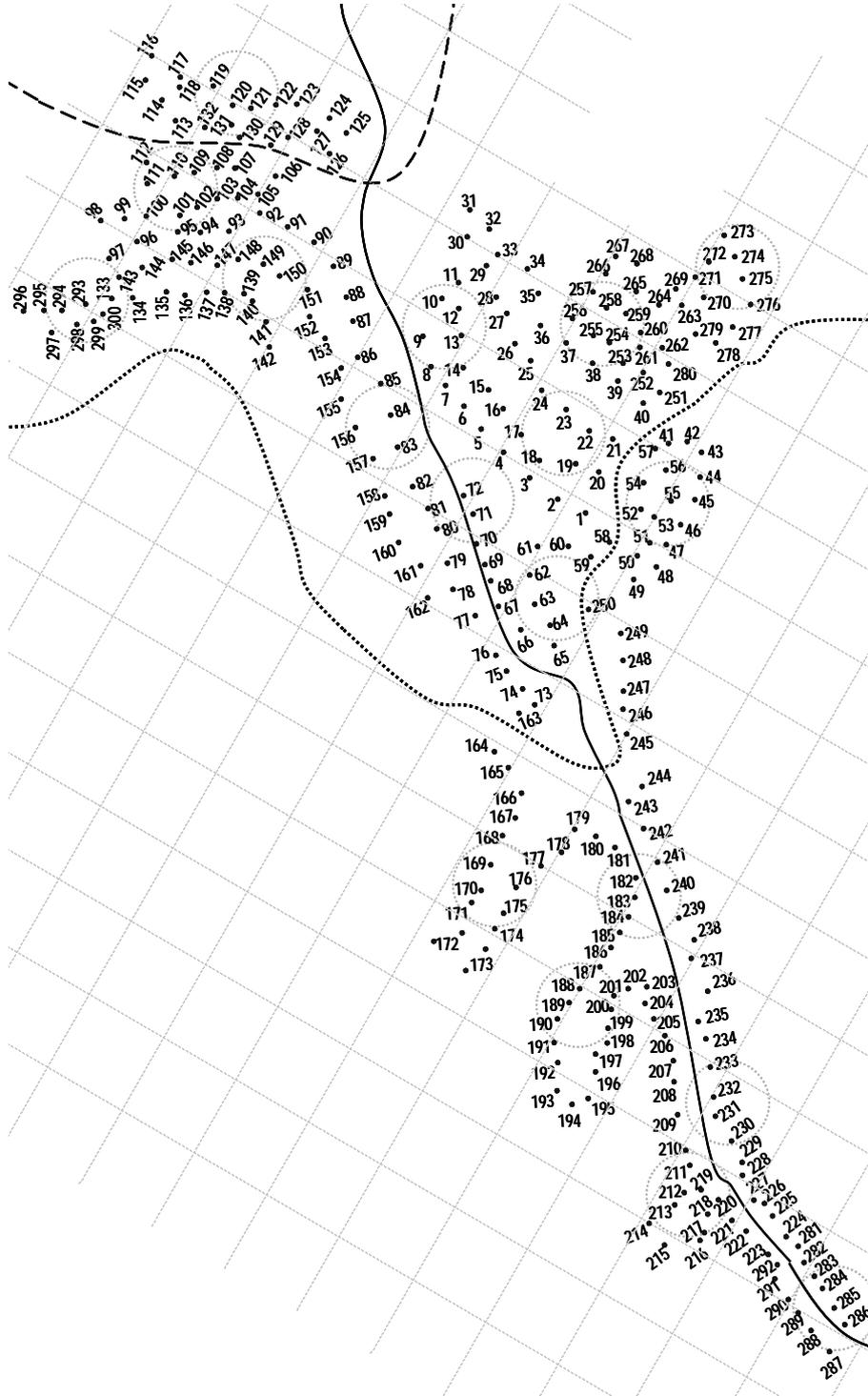


Fig. 6. Mapa con la localización de las cajas-nido en la zona de estudio.

1.6. OBJETIVOS

Esta Tesis se enmarca en el campo de la Ecología Evolutiva, y pretende probar hipótesis a la luz de la Teoría de la Evolución, así como aportar nuevas observaciones que lleven al planteamiento de nuevas hipótesis. El objetivo general que se aborda en esta Tesis es profundizar en el conocimiento de los costes y compromisos que los organismos parásitos infringen en sus hospedadores en condiciones naturales. Utilizando como modelo una población de herrerillo común (*Parus caeruleus*) y mediante aproximaciones experimentales principalmente, se trata de investigar el papel que el sistema inmunitario y la respuesta al estrés juegan en la defensa de las aves frente a las infecciones parasitarias, y en la modulación de la inversión en la reproducción, los costes reproductivos y de sus estrategias vitales. En concreto, en esta Tesis se abordan los objetivos específicos que se detallan a continuación:

1.- Establecer y evaluar un protocolo de toma de muestras de sangre de aves silvestres para la detección de HSPs *in vivo* (Capítulo 2).

2.- Establecer y validar un protocolo para la determinación de los niveles de inmunoglobulinas totales a partir de plasma sanguíneo de aves silvestres (Capítulo 3).

3.- Investigar experimentalmente la relación entre las parasitosis sanguíneas y los niveles de HSPs e inmunoglobulinas en hembras de herrerillo común (Capítulo 4).

4.- Estudiar el compromiso entre inversión en la reproducción y en defensa inmunitaria, manipulando experimentalmente las parasitosis sanguíneas (Capítulo 5).

5.- Comprobar si un aumento del tamaño de nidada y por tanto del esfuerzo reproductor produce un aumento de las parasitosis sanguíneas y de las HSPs y una reducción de las defensas inmunitarias (Capítulo 6).

6.- Estudiar de modo experimental las consecuencias que la reutilización de nidos y el ectoparasitismo tienen sobre el éxito reproductor y el estado de salud de los adultos (Capítulo 7).

7.- Investigar las causas de la variación intraespecífica en un carácter implicado en la reproducción como es el tamaño del nido, en particular el efecto de las condiciones ambientales y el estado de salud de la hembra (Capítulo 8).

1.7. REFERENCIAS

- ADAMO SA. 2004. How should behavioural ecologists interpret measurements of immunity? *Animal Behaviour* **68**: 1443–1449.
- AIT-AISSA S, PORCHER JM, ARRIGO AP, LAMBRE C. 2000. Activation of the hsp70 promoter by environmental inorganic and organic chemicals: relationships with cytotoxicity and lipophilicity. *Toxicology* **145**: 147–157.
- ALAMILLO J, ALMOGUERA C, BARTELS D, JORDANO J. 1995. Constitutive expression of small heat shock proteins in vegetative tissues of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Molecular Biology* **29**: 1093–1099.
- ALONSO-ALVAREZ C, BERTRAND S, DEVEVEY G, PROST J, FAIVRE B, SORCI G. 2004. Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. *Ecology Letters* **7**: 363–368.
- ANDERSON RM, MAY RM. 1979. Population biology of infectious diseases. *Nature* **280**, 361–367, 455–461.
- ARRIERO E. 2004. *Determinantes del estado de salud y respuesta inmunitaria del herrerillo común: hábitat, parásitos, sexo y calidad parental*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- ATKINSON CT, DUSEK RJ, LEASE JK. 2001. Serological responses and immunity to superinfection with avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. *Journal of Wildlife Diseases* **37**: 20–27.
- ATKINSON CT, VAN RIPER III C. 1991. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon*, and *Haemoproteus*. En: Loye JE, Zuk M (eds.), *Bird-parasite Interactions. Ecology, Evolution and Behavior*. Oxford University Press, Oxford, pp. 19–48.
- BARNARD CJ, BEHNKE JM. 1990. *Parasitism and host behaviour*. Taylor and Francis, Londres.
- BROOM DM, JOHNSEN KG. 1993. *Stress and animal welfare*. Chapman and Hall, Londres.
- BROWN CR, BROWN MB, RANNALA B. 1995. Ectoparasites reduce long-term survival of their avian host. *Proceedings of the Royal Society of London B* **262**: 313–319.
- BUCHANAN KL. 2000: Stress and the evolution of condition-dependent signals. *Trends in Ecology and Evolution* **15**: 156–160.
- CHRISTE P, MØLLER AP, GONZÁLEZ G, DE LOPE F. 2002. Intra-seasonal variation in immune defence, body mass and hematocrit in adult house martins *Delichon urbica*. *Journal of Avian Biology* **33**: 321–325.
- CHRISTE P, OPPLIGER A, RICHNER H. 1994. Ectoparasite affects choice and use of roost sites in the great tit, *Parus major*. *Animal Behaviour* **47**: 895–898.
- CICHON M, SENDECKA J, GUSTAFSSON L. 2003. Age-related decline in humoral immune function in Collared Flycatchers. *Journal of Evolutionary Biology* **16**: 1205–1210.
- CLARK L. 1991. The nest protection hypothesis: the adaptive use of plant secondary compounds by European starlings. En: Loye JE, Zuk M (eds.), *Bird-Parasite Interactions: Ecology, Evolution and Behaviour*. Oxford University Press, Oxford, pp. 205–221.
- CLARK L, MASON JR. 1985. Use of nest material as insecticidal and anti-pathogenic agents by the European starling. *Oecologia* **67**: 169–176.

- CLAYTON DH, MOORE J. 1997. *Host-parasite evolution: general principles and avian models*. Oxford University Press, Oxford.
- COLEMAN JS, HECKATHORN SA, HALLBERG RL. 1995. Heat-shock proteins and thermotolerance: linking molecular and ecological perspectives. *Trends in Ecology and Evolution* **10**: 305–306.
- COLLIAS NE, COLLIAS EC. 1984. *Nest Building and Bird Behaviour*. Princeton University Press, Princeton.
- COLLINS PL, HIGHTOWER LE. 1982. Newcastle disease virus stimulates the cellular accumulation of stress (heat-shock) messenger-RNAs and proteins. *Journal of Virology* **44**: 703–707.
- CRAMP S, PERRINS CM. 1998. *The Complete Birds of the Western Palearctic on CD-ROM*. Version 1.0 for PC. Oxford University Press, Oxford.
- CROMPTON DWT. 1997. Birds as habitat for parasites. En: Clayton DH, Moore J (eds), *Host-parasite evolution. General principles and avian models*. Oxford University Press, Oxford, pp. 253–270.
- DAVISON TF, ROWELL JG, REA J. 1983. Effects of dietary corticosterone on peripheral blood lymphocytes and granulocyte populations in immature domestic fowl. *Research in Veterinary Science* **34**: 236–239.
- DE LOPE F, GONZÁLEZ G, PÉREZ JJ, MØLLER AP. 1993. Increased detrimental effects of ectoparasites on their bird hosts during adverse environmental conditions. *Oecologia* **95**: 234–240.
- DE LOPE F, MØLLER AP, DE LA CRUZ C. 1998. Parasitism, immune response and reproductive success in the house martin *Delichon urbica*. *Oecologia* **114**: 188–193.
- DE NEVE L, SOLER JJ. 2002. Nest-building activity and laying date influence female reproductive investment in magpies: an experimental study. *Animal Behaviour* **63**: 975–980.
- DEERENBERG C, APANIUS V, DAAN S, BOS N. 1997. Reproductive effort decreases antibody responsiveness. *Proceedings of the Royal Society of London B* **264**: 1021–1029.
- DEITCH EA, BECK SC, CRUZ NC, DEMAIO A. 1995. Induction of heat-shock gene-expression in colonic epithelial-cells after incubation with *Escherichia coli* or endotoxin. *Critical Care Medicine* **23**: 1371–1376.
- DIAMANT S, ELIAHU N, ROSENTHAL D, GOLOUBINOFF P. 2001. Chemical chaperones regulate molecular chaperones in vitro and in cells under combined salt and heat stresses. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 39586–39591.
- DOBSON AP, HUDSON PJ. 1992. Regulation and stability of a free-living host-parasite system: *Trichostrongylus tenuis* in red grouse. II. Population models. *Journal of Animal Ecology* **61**: 487–500.
- DRENT RH, DAAN S. 1980. The prudent parent: Energetic adjustments in avian breeding. *Ardea* **68**: 225–252.
- DREW B, MILLER D, TOOP T, HANNA P. 2001. Identification of expressed HSP's in blacklip abalone (*Haliotis rubra* Leach) during heat and salinity stresses. *Journal of Shellfish Research* **20**: 695–703.
- EBEL GD, DUPUIS AP, NICHOLAS D, YOUNG D, MAFFEI J, KRAMER LD. 2002. Detection by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of antibodies to West Nile virus in birds. *Emerging Infectious Diseases* **8**: 979–982.

- EEVA T, TANHUANPÄÄ S, RABERGH C, AIRAKSINEN S, NIKINMAA M, LEHIKONEN E. 2000. Biomarkers and fluctuating asymmetry as indicators of pollution-induced stress in two hole-nesting passerines. *Functional Ecology* **14**: 235–243.
- FAIR JM, MYERS O. 2002. The ecological and physiological costs of lead shot and immunological challenge to developing western bluebirds. *Ecotoxicology* **11**: 199–208.
- FARGALLO JA. 1997. *Patrones en la reproducción y la inversión parental del Herrerillo Común (Parus caeruleus) en relación con los factores ambientales, el sexo de los pollos y los parásitos sanguíneos*. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- FARGALLO J, JOHNSTON RD. 1997. Breeding biology of the blue tit *Parus caeruleus* in a montane mediterranean deciduous forest: the interaction of latitude and altitude. *Journal für Ornithologie* **138**: 83–92.
- FEDER ME. 1996. Ecological and evolutionary physiology of stress proteins and the stress response: the *Drosophila melanogaster* model. En: Johnston IA, Bennett AF (eds), *Animals and temperature*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 79–102
- FEDER ME. 1999. Organismal, ecological, and evolutionary aspects of heat-shock proteins and the stress response: established conclusions and unresolved issues. *American Zoologist* **39**: 857–864.
- FEDER ME, HOFMANN GE. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Review in Physiology* **61**: 243–282.
- FEHRENBACH E, NIESS AH. 1999. Role of heat shock proteins in the exercise response. *Exercise and Immunological Review* **5**: 57–77.
- FOLSTAD I, KARTER A.J. 1992. Parasites, bright males, and the immunocompetence handicap. *American Naturalist* **139**: 603–622.
- FREELAND WJ. 1976. Pathogens and the evolution of primate sociality. *Biotropica* **8**: 12–24.
- GARDNER SL, CAMPBELL ML. 1992. Parasites as probes for biodiversity. *Journal of Parasitology* **78**: 596–600.
- GASPARINI J, MCCOY KD, HAUSSY C, TVERAA T, BOULINIER T. 2001. Induced maternal response to the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* sensu lato in a colonial seabird, the kittiwake *Rissa tridactyla*. *Proceedings of the Royal Society of London B* **268**: 647–650.
- GEHRING WJ, WEHNER R. 1995. Heat shock protein synthesis and thermotolerance in *Cataglyphis*, an ant from the Sahara desert. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **92**: 2994–2998.
- GOPHNA U, RON EZ. 2003. Virulence and the heat shock response. *International Journal of Medical Microbiology* **292**: 453–461.
- GOTO SG, YOSHIDA KM, KIMURA MT. 1998. Accumulation of Hsp70 mRNA under environmental stresses in diapausing and nondiapausing adults of *Drosophila triauraria*. *Journal of Insect Physiology* **44**: 1009–1015.
- GRACZYK TK, SHAW ML, CRANFIELD MR, BEALL FB. 1994. Hematological characteristics of avian malaria cases in African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*) during the first outdoor exposure season. *Journal of Parasitology* **80**: 302–308.
- GROSS WB, SIEGEL HS. 1983. Evaluation of the heterophil/ lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. *Avian Diseases* **27**: 972–979.

- GUSTAFSSON L, NORDLING D, ANDERSSON MS, SHELDON BC, QVARNSTRÖM A. 1994. Infectious diseases, reproductive effort and the cost of reproduction in birds. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* **346**: 323–331.
- HAMILTON EW, MCNAUGHTON SJ, COLEMAN JS. 2001. Molecular, physiological, and growth responses to sodium stress in C-4 grasses from a soil salinity gradient in the Serengeti ecosystem. *American Journal of Botany* **88**: 1258–1265.
- HAMILTON WD. 1980. Sex versus non-sex versus parasite. *Oikos* **35**: 282–290.
- HAMILTON WD, ZUK M. 1982. Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? *Science* **218**: 384–387.
- HANSELL M. 2000. *Bird Nests and Construction Behaviour*. Cambridge University Press, Cambridge.
- HART BJ. 1997. Behavioural defence. En: Clayton DH, Moore J (eds), *Host-parasite evolution. General principles and avian models*. Oxford University Press, Oxford, pp. 78–104.
- HASSELQUIST D, MARSH JA, SHERMAN PW, WINGFIELD JC. 1999. Is avian immunocompetence suppressed by testosterone? *Behavioral Ecology and Sociobiology* **45**: 167–175.
- HEDRICK PW. 1994. Evolutionary genetics of the major histocompatibility complex. *American Naturalist* **143**: 945–964.
- HEEB P, WERNER I, MATEMAN AC, KÖLLIKER M, BRINKHOF MWG, LESSELLS CM, RICHNER H. 1999. Ectoparasite infestation and sex-biased local recruitment of hosts. *Nature* **400**: 63–65.
- HOI H, SCHLEICHER B, VALERA F. 1994. Female mate choice and nest desertion in Penduline Tits, *Remiz pendulinus*: the importance of nest quality. *Animal Behaviour* **48**: 743–746.
- HURTREZ-BOUSSÈS S, BLONDEL J, PERRET P, FABREGUETTES J, RENAUD FR. 1998. Chick parasitism by blowflies affects feeding rates in a Mediterranean population of blue tits. *Ecology Letters* **1**: 17–20.
- ILMONEN P, TAARNA T, HASSELQUIST D. 2000. Experimentally activated immune defence in female pied flycatchers results in reduced breeding success. *Proceedings of the Royal Society of London B* **267**: 665–670.
- ISOBE T, SUZUKI K. 1987. Immunoglobulin M and G immune response to *Leucocytozoon caulleryi* in chickens. *Japanese Journal of Veterinary Science* **49**: 333–339.
- IZCO J. 1984. *Madrid Verde*. Instituto de Estudios Agrarios, Pesqueros y Alimentarios. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Comunidad de Madrid, Madrid.
- JANEWAY CA JR, TRAVERS P. 1997. (eds). *Immunobiology. The immune system in health and disease*. 3rd ed. Current Biology Ltd./Garland Publishing Inc., New York.
- JENKINS ME, SUZUKI TC, MOUNT DW. 1997. Evidence that heat and ultraviolet radiation activate a common stress-response program in plants that is altered in the uvh6 mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **115**: 1351–1358.
- JOHNSEN TS, ZUK M. 1999. Parasites and tradeoffs in the immune response of female red jungle fowl. *Oikos* **86**: 487–492.
- KARLSSON J, NILSSON SG. 1977. The influence of nest-box area on clutch size in some hole nesting passerines. *Ibis* **119**: 207–211.
- KAUFMANN SHE, SCHOEL B. 1994. Heat shock proteins as antigens in immunity against infection and self. En: Morimoto RI, Tissières A, Georgopoulos C (eds), *The Biology*

- of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- KERN MD. 1984. Racial differences in nests of White-crowned Sparrows. *Condor* **86**: 455–466.
- KIRIYAMA MT, OKA M, TAKEHANA M, KOBAYASHI S. 2001. Expression of a small heat shock protein 27 (HSP27) in mouse skin tumors induced by UVB-irradiation. *American Journal of Botany* **24**: 197–200.
- KIRKPATRICK CE, SUTHERS HB. 1988. Epizootiology of blood parasite infections in passerine birds from Central New Jersey. *Canadian Journal of Zoology* **66**: 2374–2382.
- KLASING KC, LESHCHINSKY T. 1999. Functions, costs, and benefits of the immune system during development and growth. En: Adams NJ, Slotow RH (eds), *Proceedings of the 22nd International Ornithological Congress, Durban*, BirdLife South Africa, Johannesburg, pp. 2817–2835.
- KÖHLER HR, ECKWERT H. 1997. The induction of stress proteins (hsp) in *Oniscus asellus* (Isopoda) as a molecular marker of multiple heavy metal exposure. 2. Joint toxicity and transfer to field situations. *Ecotoxicology* **6**: 263–274.
- KORPIMÄKI E, HAKKARAINEN H, BENNETT GF. 1993. Blood parasites and reproductive success of Tengmalm owls - detrimental effects on females but not on males. *Functional Ecology* **7**: 420–426.
- KREBS RA, FEDER ME. 1997. Deleterious consequences of Hsp70 overexpression in *Drosophila melanogaster* larvae. *Cell Stress and Chaperones* **2**: 60–71.
- KREBS RA, FEDER ME. 1998. Hsp70 and larval thermotolerance in *Drosophila melanogaster*: how much is enough and when is more too much? *Journal of Insect Physiology* **44**: 1091–1101.
- KREBS RA, LOESCHCKE V. 1994. Effects of exposure to short-term heat stress on fitness components in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology* **7**: 39–49.
- KRISTENSEN TN, DAHLGAARD J, LOESCHCKE V. 2002. Inbreeding affects Hsp70 expression in two species of *Drosophila* even at benign temperatures. *Evolutionary Ecology Research* **4**: 1209–1216.
- LEHMANN T. 1993. Ectoparasites: direct impact on host fitness. *Parasitology Today* **9**: 8–13.
- LENS L, WAUTERS LA, DHONDT AA. 1994. Nest-building by crested tit *Parus cristatus* males: an analysis of costs and benefits. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **35**: 431–436.
- LI QB, HASKELL DW, GUY CL. 1999. Coordinate and noncoordinate expression of the stress 70 family and other molecular chaperones at high and low temperature in spinach and tomato. *Plant Molecular Biology* **39**: 21–34.
- LINDQUIST S. 1986. The heat shock response. *Annual Review of Biochemistry* **55**: 1151–1191.
- LOCHMILLER RL, DEERENBERG C. 2000. Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos* **88**: 87–98.
- LOYE JE, CARROLL SP. 1998. Ectoparasite behavior and its effects on avian nest site selection. *Annals of the Entomological Society of America* **91**: 159–163.
- LOYE JE, ZUK M. 1991. *Bird-parasite Interactions. Ecology, Evolution and Behaviour*. Oxford University Press, Oxford.

- MA E, HADDAD GG. 1997. Anoxia regulates gene expression in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Molecular Brain Research* **46**: 325–328.
- MACARIO AJL. 1995. Heat-shock proteins and molecular chaperones: implications for pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *International Journal of Clinical and Laboratory Research* **25**: 59–70.
- MACKENZIE K. 1987. Parasites as indicators of host populations. *International Journal of Parasitology* **17**: 345–352.
- MARIÑO F, WINTERS C, MORGAN AJ. 1999. Heat shock protein (hsp60, hsp70, hsp90) expression in earthworms exposed to metal stressors in the field and laboratory. *Pedobiologia* **43**: 615–624.
- MARSHALL AG. 1981. *The ecology of ectoparasitic insects*. Academic Press.
- MARTIN TE, MØLLER AP, MERINO S, CLOBERT J. 2001. Does clutch size evolve in response to parasites and immunocompetence? *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **98**: 2071–2076.
- MARTÍNEZ J, PÉREZ SERRANO J, BERNADINA WE, RODRÍGUEZ-CAABEIRO F. 1999a. Influence of parasitization by *Trichinella spiralis* on the levels of heat shock proteins in rat liver and muscle. *Parasitology* **118**: 201–209.
- MARTÍNEZ J, PÉREZ SERRANO J, BERNADINA WE, RODRÍGUEZ-CAABEIRO F. 1999b. In vitro stress response to elevated temperature, hydrogen peroxide and mebendazole in *Trichinella spiralis* muscle larvae. *International Journal for Parasitology* **29**: 1457–1464.
- MARTÍNEZ J, PÉREZ SERRANO J, BERNADINA WE, RODRÍGUEZ-CAABEIRO F. 2001. Stress response to cold in *Trichinella* species. *Cryobiology* **43**: 293–302.
- MARTÍNEZ-PADILLA J, MARTÍNEZ J, DÁVILA JA, MERINO S, MORENO J, MILLÁN J. 2004. Within-brood size differences, sex and parasites determine blood stress protein levels in Eurasian Kestrel nestlings. *Functional Ecology* **18**: 426–434.
- MARZAL A, DE LOPE F, NAVARRO C, MØLLER AP. 2005. Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. *Oecologia* **142**: 541–545.
- MASSEY JG, GRACZYK TK, CRANFIELD MR. 1996. Characteristics of naturally acquired *Plasmodium relictum capistranoae* infections in naive Hawaiian Crows (*Corvus hawaiiensis*) in Hawaii. *Journal of Parasitology* **82**: 182–185.
- MAXWELL MH, ROBERTSON GW. 1998. The avian heterophil leukocyte: a review. *World Poultry Science Journal* **54**: 155–178.
- MERILÄ J, ALLANDER K. 1995. Do great tits (*Parus major*) prefer ectoparasite-free roost sites? - an experiment. *Ethology* **99**: 53–60.
- MERILÄ J, ANDERSSON M. 1999. Reproductive effort and success are related to hematozoan infection in blue tits. *Écoscience* **6**: 421–428.
- MERINO S. 2002. Evolución de la interacción parásito-hospedador. En: Soler M (ed), *Evolución. La Base de la Biología*. Proyecto Sur de Ediciones, Granada, pp. 487–496.
- MERINO S, MORENO J, POTTI J, DE LEÓN A, RODRÍGUEZ R. 1998a. Nest ectoparasites and maternal effort in Pied Flycatchers. *Biologia e Conservazione della Fauna* **102**: 200–205.
- MERINO S, MARTÍNEZ J, BARBOSA A, MØLLER AP, DE LOPE F, PÉREZ J, RODRÍGUEZ-CAABEIRO F. 1998b. Increase in a heat-shock protein from blood cells in response of

- nestling house martins (*Delichon urbica*) to parasitism: an experimental approach. *Oecologia* **116**: 343–347.
- MERINO S, MARTÍNEZ J, MØLLER AP, BARBOSA A, DE LOPE F, RODRÍGUEZ-CAABEIRO F. 2002. Blood stress protein levels in relation to sex and parasitism of barn swallows (*Hirundo rustica*). *Écoscience* **9**: 300–305.
- MERINO S, MARTÍNEZ J, MØLLER AP, SANABRIA L, DE LOPE F, PÉREZ J, RODRÍGUEZ-CAABEIRO F. 1999. Phytohaemagglutinin injection assay and physiological stress in nestling house martins. *Animal Behaviour* **58**: 219–222.
- MERINO S, MORENO J, SANZ JJ, ARRIERO E. 2000a. Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). *Proceedings of the Royal Society of London B* **267**: 2507–2510.
- MERINO S, MØLLER AP, DE LOPE F. 2000b. Seasonal changes in cell-mediated immunocompetence and mass gain in nestling barn swallows: a parasite-mediated effect? *Oikos* **90**: 327–332.
- MERINO S, POTTI J. 1995a. Mites and blowflies decrease growth and survival in nestling pied flycatchers. *Oikos* **73**: 95–103.
- MERINO S, POTTI J. 1995b. Pied flycatchers prefer to nest in clean nest boxes in an area with detrimental nest ectoparasites. *Condor* **97**: 828–831.
- MINCHELLA DJ, SCOTT ME. 1991. Parasitism: a cryptic determinant of animal community structure. *Trends in Ecology and Evolution* **6**: 351–355.
- MITCHELL GF. 1991. Co-evolution of parasites and adaptive immune responses. *Parasitology Today* **7**: A2–A5.
- MØLLER AP, ALLANDER K, DUFVA R. 1990. Fitness effects of parasites on passerine birds: A review. En: Blondel J, Gosler A, Lebreton J, McCleery RH (eds), *Population biology of passerine birds*. Springer-Verlag, pp. 269–280.
- MØLLER AP, MERINO S, BROWN CR, ROBERTSON RJ. 2001. Immune defense and host sociality: a comparative study of swallows and martins. *American Naturalist* **158**: 136–145.
- MOORE J. 2002. *Parasites and the behaviour of animals*. Oxford series in ecology and evolution. Oxford University Press.
- MORENO J. 2002. La evolución de las estrategias vitales. En: Soler M (ed), *Evolución. La Base de la Biología*. Proyecto Sur de Ediciones, Granada, pp. 159–176.
- MORENO J, MERINO S, MARTÍNEZ J, SANZ JJ, ARRIERO E. 2002a. Heterophil/lymphocyte ratios and heat-shock protein levels are related to growth in nestling birds. *Écoscience* **9**: 434–439.
- MORENO J, MERINO S, SANZ JJ, ARRIERO E. 2002b. An indicator of maternal stress is correlated with nestling growth in pied flycatchers *Ficedula hypoleuca*. *Avian Science* **2**: 175–182.
- MORENO J, SANZ JJ, ARRIERO E. 1999. Reproductive effort and T-lymphocyte cell-mediated immunocompetence in female pied flycatchers *Ficedula hypoleuca*. *Proceedings of the Royal Society of London B* **266**: 1105–1109.
- MORENO J, SOLER M, MØLLER AP, LINDÉN M. 1994. The function of stone carrying in the black wheatear, *Oenanthe leucura*. *Animal Behaviour* **47**: 1297–1309.
- MORIMOTO RI. 1991. Heat shock: The role of transient inducible responses in cell damage, transformation, and differentiation. *Cancer Cells* **3**: 295–301.

- MOSELEY P. 2000. Stress proteins and the immune response. *Immunopharmacology* **48**: 299–302.
- NAGASAWA H, OKA M, MAEDA K, JIAN-GUO C, HISAEDA H, ITO Y, GOOD RA, HIMENO K. 1992. Induction of heat shock protein closely correlates with protection against *Toxoplasma gondii* infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **89**: 3155–3158.
- NAZIR A, SAXENA DK, CHOWDHURI DK. 2003. Induction of hsp70 in transgenic *Drosophila*: biomarker of exposure against phthalimide group of chemicals. *Biochimica et Biophysica Acta* **1621**: 218–225.
- NORDLING D, ANDERSSON M, ZOHARI S, GUSTAFSSON L. 1998. Reproductive effort reduces specific immune response and parasite resistance. *Proceedings of the Royal Society of London B* **265**: 1291–1298.
- NORRIS K, EVANS MR. 2000. Ecological immunology: life history trade-offs and immune defense in birds. *Behavioral Ecology* **11**: 19–26.
- OPPLIGER A, CHRISTE P, RICHNER H. 1996. Clutch size and malaria resistance. *Nature* **381**: 565
- OPPLIGER A, RICHNER H, CHRISTE P. 1994. Effect of an ectoparasite on lay date, nest-site choice, desertion, and hatching success in the great tit (*Parus major*). *Behavioral Ecology* **5**: 130–134.
- OTS I, HÖRAK P. 1998. Health impact of blood parasites in breeding great tits. *Oecologia* **116**: 441–448.
- OTS I, MURUMÄGI A, HÖRAK P. 1998. Haematological health state indices of reproducing Great Tits: methodology and sources of natural variation. *Functional Ecology* **12**: 700–707.
- OTSUKA Y, TAKANO TS, YAMAZAKI T. 1997. Genetic variation in the expression of the six hsp genes in the presence of heat shock in *Drosophila melanogaster*. *Genes & Genetic Systems* **72**: 19–24.
- OWENS IPF, WILSON K. 1999. Immunocompetence: a neglected life history trait or conspicuous red herring? *Trends in Ecology and Evolution* **14**: 170–172.
- PEDERSEN BK, HOFFMAN-GOETZ L. 2000. Exercise and the immune system: Regulation, integration, and adaptation. *Physiological Reviews* **80**: 1055–1081.
- PETIT C, HOSSAERT-MCKEY M, PERRET P, BLONDEL J, LAMBRECHTS MM. 2002. Blue tits use selected plants and olfaction to maintain an aromatic environment for nestlings. *Ecology Letters* **5**: 585–589.
- POCKLEY AG. 2003. Heat shock proteins as regulators of the immune response. *The Lancet* **362**: 469–476.
- POLLA BS. 1988. A role for heat shock proteins in inflammation? *Immunology Today* **9**: 134–137.
- PRICE PW. 1980. *Evolutionary biology of parasites*. Princeton University Press.
- PRUETT SB. 2003. Stress and the immune system. *Pathophysiology* **9**: 133–153.
- RÅBERG L, GRAHN M, HASSELQUIST D, SVENSSON E. 1998. On the adaptative significance of stress induced immunosuppression. *Proceedings of the Royal Society of London B* **265**: 1637–1641.
- RÅBERG L, NILSSON J-A, ILMONEN P, STJERNMAN M, HASSELQUIST D. 2000. The cost of an immune response: vaccination reduces parental effort. *Ecology Letters* **3**: 382–386.

- REID JM, MONAGHAN P, RUXTON GD. 2000. Resource allocation between reproductive phases: the importance of thermal conditions in determining the cost of incubation. *Proceedings of the Royal Society of London B* **267**: 37–41.
- RENDELL WB, VERBEEK NAM. 1996. Old nest material in nest boxes of tree swallows: Effects on nest-site choice and nest building. *Auk* **113**: 319–328.
- RICHNER H, CHRISTE P, OPPLIGER A. 1995. Paternal investment affects prevalence of malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **92**: 1192–1194.
- RICHNER H, HEEB P. 1995. Are clutch and brood size patterns in birds shaped by ectoparasites? *Oikos* **73**: 435–431.
- RINEHART JP, DENLINGER DL, RIVERS DB. 2002. Upregulation of transcripts encoding select heat shock proteins in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis* in response to venom from the ectoparasitoid wasp *Nasonia vitripennis*. *Journal of Invertebrate Pathology* **79**: 62–63.
- RITOSSA A. 1962. A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* **18**: 571–573.
- ROBERTS ML, BUCHANAN KL, EVANS MR. 2004. Testing the immunocompetence handicap hypothesis: a review of the evidence. *Animal Behaviour* **68**: 227–239.
- ROBERTS SP, FEDER ME. 2000. Changing fitness consequences of hsp70 copy number in transgenic *Drosophila* larvae undergoing natural thermal stress. *Functional Ecology* **14**: 353–357.
- ROFF DA. 1992. *The evolution of life histories*. Chapman & Hall, New York.
- ROITT I, BROSTOFF J, MALE D. 1996. *Immunology*. 4th ed. Mosby, London.
- ROPP M, COURGEON AM, CALVAYRAC R, BESTBELPOMME M. 1983. The possible role of the superoxide ion in the induction of heat-shock and specific proteins in aerobic *Drosophila* cells during return to normoxia after a period of anaerobiosis. *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology* **61**: 456–461.
- RYTKÖNEN S, LEHTONEN R, ORELL M. 1998. Breeding Great Tits *Parus major* avoid nestboxes infested with fleas. *Ibis* **140**: 687–690.
- SAINO N, BOLZERN AM, MØLLER AP. 1997. Immunocompetence, ornamentation, and viability of male barn swallows (*Hirundo rustica*). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **66**: 827–836.
- SAINO N, FERRARI RP, ROMANO M, RUBOLINI D, MØLLER AP. 2003. Humoral immune response in relation to senescence, sex and sexual ornamentation in the barn swallow (*Hirundo rustica*). *Journal of Evolutionary Biology* **16**: 1127–1134.
- SAINO N, INCAGLI M, MARTINELLI R, MØLLER AP. 2002. Immune response of male barn swallows in relation to parental effort, corticosterone plasma levels, and sexual ornamentation. *Behavioral Ecology* **13**: 169–174.
- SANZ JJ. 2002. Climate change and breeding parameters of great and blue tits throughout the Western Palearctic. *Global Change Biology* **8**:409–422.
- SANZ JJ, ARRIERO E, MORENO J, MERINO S. 2001a. Female hematozoan infection reduces hatching success but not fledging success in Pied Flycatchers *Ficedula hypoleuca*. *Auk* **118**: 750–755.
- SANZ JJ, ARRIERO E, MORENO J, MERINO S. 2001b. Interactions between hemoparasite status and female age in the primary reproductive output of pied flycatchers. *Oecologia* **126**: 339–344.

- SANZ JJ, MORENO J, MERINO S, TOMÁS G. 2004. A trade-off between two resource-demanding functions: post-nuptial moult and immunity during reproduction in male pied flycatchers. *Journal of Animal Ecology* **73**: 441–447.
- SAPOLSKY RM. 1992. Neuroendocrinology of the stress response. En: Becker JB, Breedlove SM, Crews D (eds), *Behavioral endocrinology*. MIT Press, Cambridge, Mass, pp. 287–324.
- SAPOLSKY RM. 1995. *¿Por qué las cebras no tienen úlcera? La guía del estrés*. Alianza Editorial, Madrid.
- SCHMID-HEMPEL P. 2003. Variation in immune defence as a question of evolutionary ecology. *Proceedings of the Royal Society of London B* **270**: 357–366.
- SEJERKILDE M, SØRENSEN JG, LOESCHCKE V. 2003. Effects of cold- and heat-hardening on thermal resistance and Hsp70 expression in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology* **49**: 719–726.
- SHELDON BC, VERHULST S. 1996. Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends in Ecology and Evolution* **11**: 317–321.
- SHERMAN MY, GOLDBERG AL. 2001. Cellular defenses against unfolded proteins: A cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron* **29**: 15–32.
- SHYKOFF JA, SCHMID-HEMPEL P. 1991. Genetic relatedness and eusociality: parasite-mediated selection on the genetic composition of groups. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **28**: 371–376.
- SILBERMANN R, TATAR M. 2000. Reproductive costs of heat shock protein in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Evolution* **54**: 2038–2045.
- SKIDMORE R, GUTIERREZ JA, GUERRIERO V, KREGEL KC. 1995. Hsp70 induction during exercise and heat-stress in rats – role of internal temperature. *American Journal of Physiology Regulation and Integrated Comparative Physiology* **37**: R92–R97.
- SKOWRON C, KERN M. 1980. The insulation in nests of selected North American songbirds. *Auk* **97**: 816–824.
- SLAGSVOLD T. 1989. On the evolution of clutch size and nest size in passerine birds. *Oecologia* **79**: 300–305.
- SMITS JE, BORTOLOTTI GR, TELLA JL. 1999. Simplifying the phytohaemagglutinin skin-testing technique in studies of avian immunocompetence. *Functional Ecology* **13**: 567–572.
- SMITS JE, BORTOLOTTI GR. 2001. Antibody-mediated immunotoxicity in American kestrels (*Falco sparverius*) exposed to polychlorinated biphenyls. *Journal of Toxicology and Environmental Health A* **62**: 217–226.
- SOLER JJ, MØLLER AP, SOLER M. 1998a. Nest building, sexual selection and parental investment. *Evolutionary Ecology* **12**: 427–441.
- SOLER JJ, CUERVO JJ, MØLLER AP, DE LOPE F. 1998b. Nest building is a sexually selected behaviour in the barn swallow. *Animal Behaviour* **56**: 1435–1442.
- SONNA LA, FUJITA J, GAFFIN SL, LILLY CM. 2002. Invited review: effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *Journal of Applied Physiology* **92**: 1725–1742.
- SØRENSEN JG, KRISTENSEN TN, LOESCHCKE V. 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters* **6**: 1025–1037.

- SØRENSEN JG, LOESCHCKE V. 2001. Larval crowding in *Drosophila melanogaster* induces Hsp70 expression, and leads to increased adult longevity and adult thermal stress resistance. *Journal of Insect Physiology* **47**: 1301–1307.
- SPEES JL, CHANG SA, SNYDER MJ, CHANG ES. 2002. Osmotic induction of stress-responsive gene expression in the lobster *Homarus americanus*. *Biological Bulletin* **203**: 331–337.
- STEARNS SC. 1992. *The evolution of life histories*. Oxford University Press, Oxford.
- STEINERT SA, PICKWELL GV. 1993. Induction of Hsp70-proteins in mussels by ingestion of tributyltin. *Marine Environmental Research* **35**: 89–93.
- SUORSA P, HUHTA E, NIKULA A, NIKINMAA M, JÄNTTI A, HELLE H, HAKKARAINEN H. 2003. Forest management is associated with physiological stress in an oldgrowth forest passerine. *Proceedings of the Royal Society of London B* **270**: 963–969.
- SZÉP T, MØLLER AP. 1999. Cost of parasitism and host immune defence in the sand martin *Riparia riparia*: a role for parent–offspring conflict? *Oecologia* **119**: 9–15.
- TAMMARIELLO SP, RINEHART JP, DENLINGER DL. 1999. Desiccation elicits heat shock protein transcription in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, but does not enhance tolerance to high or low temperatures. *Journal of Insect Physiology* **45**: 933–938.
- TEDENGREN M, OLSSON B, BRADLEY B, ZHOU LZ. 1999. Heavy metal uptake, physiological response and survival of the blue mussel (*Mytilus edulis*) from marine and brackish waters in relation to the induction of heat-shock protein 70. *Hydrobiologia* **393**: 261–269.
- TELLA JL, SCHEUERLEIN A, RICKLEFS RE. 2002. Is cell-mediated immunity related to the evolution of life-history strategies in birds? *Proceedings of the Royal Society of London B* **269**: 1059–1066.
- TISSIÈRES A, MITCHELL HK, TRACY UM. 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *Journal of Molecular Biology* **84**: 389–398.
- TRAUTINGER F, KINDASMUGGE I, KNOBLER RM, HONIGSMANN H. 1996. Stress proteins in the cellular response to ultraviolet radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B Biology* **35**: 141–148.
- TRIPET F, RICHNER H. 1997. Host responses to ectoparasites: food compensation by parent blue tits. *Oikos* **78**: 557–561.
- TROTTER EW, KAO CMF, BERENFELD L, BOTSTEIN D, PETSKE GA, GRAY JV. 2002. Misfolded proteins are competent to mediate a subset of the responses to heat shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 44817–44825.
- ULMASOV KA, SHAMMAKOV S, KARAEV K, EVGEN'EV MB. 1992. Heat shock proteins and thermoresistance in lizards. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **89**: 1666–1670.
- WAKELIN D. 1996. *Immunity to parasites*. Cambridge University Press, Cambridge.
- WAKELIN D. 1997. Parasites and the immune system. Conflict or compromise? *BioScience* **47**: 32–40.
- WELCH WJ. 1992. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiological Reviews* **72**: 1063–1081.
- WERNER I, NAGEL R. 1997. Stress proteins HSP60 and HSP70 in three species of amphipodes exposed to cadmium, diazinon, dieldrin and flouranthene. *Environmental Toxicology and Chemistry* **16**: 2393–2403.

- WHEELER JC, KING V, TOWER J. 1999. Sequence requirements for upregulating expression of drosophila hsp70 transgenes during aging. *Neurobiology of Aging* **20**: 545–553.
- WHITE FN, KINNEY JL. 1974. Avian incubation. *Science* **186**: 107–115.
- WHITTOU GC, BERGER AJ. 1977. Heat loss from the nest of the Hawaiian Honeycreeper, “Amakihi”. *Wilson Bulletin* **89**: 480–483.
- WIEBE KL. 2001. Microclimate of tree cavity nests: is it important for reproductive success in Northern Flickers? *Auk* **118**: 412–421.
- WIEHN J, KORPIMÄKI E, PEN I. 1999. Haematozoan infections in the Eurasian kestrel: effects of fluctuating food supply and experimental manipulation of paternal effort. *Oikos* **84**: 87–98.
- WIERSMA P, SELMAN C, SPEAKMAN JR, VERHULST S. 2004. Birds sacrifice oxidative protection for reproduction. *Proceedings of the Royal Society of London B (Suppl.)* **271**: S360–S363.
- WILLIAMS TD, CHRISTIANS JK, AIKEN JJ, EVANSON M. 1999. Enhanced immune function does not depress reproductive output. *Proceedings of the Royal Society of London B* **266**: 753–757.
- YANG DR, LU XF, ZHANG WG, HE FS. 2002. Biochemical changes in primary culture of skeletal muscle cells following dimethoate exposure. *Toxicology* **174**: 79–85.
- ZATSEPINA OG, ULMASOV KA, BERESTEN SF, MOLODTSOV VB, RYBTSOV SA, EVGEN'EV MB. 2000. Thermotolerant desert lizards characteristically differ in terms of heat-shock system regulation. *Journal of Experimental Biology* **203**: 1017–1025.
- ZHAO Q, WANG JH, LEVICHKIN IV, STASINOPOULOS S, RYAN MT, HOOGENRAAD NJ. 2002. A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. *EMBO (European Molecular Biology Organization) Journal* **21**: 4411–4419.
- ZUK M. 1992. The role of parasites in sexual selection: current evidence and future directions. *Advances in the Study of Behavior* **21**: 39–68.
- ZUK M, BRYANT MJ, KOLLURU GR, MIRMOVITCH V. 1996. Trade-offs in parasitology, evolution and behaviour. *Parasitology Today* **12**: 46–47.
- ZUK M, KIM T, ROBINSON SI, JOHNSEN TS. 1998. Parasites influence social rank and morphology, but not mate choice, in female red junglefowl, *Gallus gallus*. *Animal Behaviour* **56**: 493–499.
- ZUK M, STOEHR AM. 2002. Immune defence and host life history. *American Naturalist* **160**: S9–S22.

Obtención y análisis de muestras sanguíneas para la detección de proteínas del estrés en aves silvestres

GUSTAVO TOMÁS, JAVIER MARTÍNEZ, SANTIAGO MERINO

RESUMEN

La respuesta al estrés mediada por proteínas de choque térmico (HSPs) en sangre puede ser empleada con fiabilidad para la evaluación del estrés fisiológico y ambiental de los organismos y sus poblaciones. Es muy importante que las muestras de sangre sean conservadas y transportadas correctamente con el fin de evitar alteraciones que confundan los análisis proteicos. Se concluye que las muestras de sangre de carbonero común (*Parus major*), manteniéndolas en una nevera portátil, pueden ser centrifugadas y congeladas en cualquier momento dentro de las 8 horas siguientes a su extracción. Durante este tiempo no se producen variaciones significativas en los niveles de las proteínas del estrés HSP70 y HSP60. Estos resultados pretenden facilitar futuras investigaciones sobre la respuesta al estrés mediada por HSPs en estudios de campo con aves silvestres.

Collection and analysis of blood samples to detect stress proteins in wild birds

ABSTRACT

The blood stress protein response can be used to evaluate physiological or environmental stress in individuals and populations. It is important that sample conservation and transport are correct to avoid confounding effects on protein analyses. We show that Great Tit (*Parus major*) blood samples can be centrifuged and frozen any time within eight hours of collection, as during this period there are no significant changes in stress protein HSP70 and HSP60 levels. These findings simplify future research on the stress protein response in wild birds because samples can be safely kept in a cool box for a relatively long time.

INTRODUCTION

The use of molecular techniques in field studies is becoming more popular, with these recognized as valuable tools for the ecological, behavioral, and evolutionary study of wild animals (Feder 1996; Buchanan 2000). The heat-shock family of stress proteins (HSPs) are a group of highly conserved intracellular polypeptides found in all organisms of all kingdoms so far studied (Lindquist 1986). HSPs function as molecular chaperones (molecules to protect proteins when they pass through unstable stages) with diverse cellular roles, and they represent a major molecular barrier to

alterations in cellular homeostasis. They act in response to very different stressors such as heat (Gehring and Wehner 1995; Zatssepina et al. 2000), toxins (Mariño et al. 1999), oxidants (Garbe 1992; Martínez et al. 1999a), parasites (Nagasawa et al. 1992; Merino et al. 1998; Martínez et al. 1999b), and even low temperatures (Martínez et al. 2001). Since their discovery in the 1960s (Ritossa 1962), studies have been undertaken on the stress responses of many organisms. Until recently, however, the ecological and evolutionary aspects of the HSP-mediated stress response have not received much attention (Feder 1999; Feder and Hofmann 1999; Buchanan

2000). HSPs have been related to the response against parasites in bird populations. Merino et al. (1998) have shown that House Martin (*Delichon urbica*) nestlings experimentally infested with martin bugs increase HSP60 levels. This protein also increases in response to several species of blood parasites in Barn Swallows (*Hirundo rustica*), and the response is also dependent on sex (Merino et al. 2002). However, Red-rumped Swallow (*Hirundo daurica*) nestlings experimentally infested with martin bugs did not increase HSP responses, probably due to a lack resistance to these novel ectoparasites (Merino et al. 2001). In addition, blood HSPs have been related to nutritional stress in Pied Flycatcher (*Ficedula hypoleuca*) nestlings (Moreno et al. 2002).

Despite their potential use as wildlife bioindicators, the measurement of HSP-mediated physiological stress, while relatively routine in medicine and toxicology (Macario 1995; Feder and Hofmann 1999), has not been widely employed in field studies (Feder and Hofmann 1999). This may be because until now animals had to be sacrificed (Mariño et al. 1999; Eeva et al. 2000; Zatssepina et al. 2000), something to be avoided if possible. The analysis of HSPs from blood cells

is a novel and reliable tool for monitoring environmental and physiological stress in the wild (Buchanan 2000), and it may done to all animals without injury (other than that occasioned by handling).

It may be possible to use HSPs to study a variety of stressful conditions that animals face in the wild, including unpredictable reductions in food supply (e.g., during migration; Buchanan 2000), predation risk, social dominance relationships, adverse effects of high population densities, and pollutants (e.g., pesticides and heavy metals; Sørensen et al. 2003). One advantage of HSPs as biomarkers is that negative consequences of stress can be detected earlier than with biomarkers based on growth rate, mortality, or fecundity (Werner and Nagel 1997). In comparison with glucocorticoids, to date the most common method of assessing individual response to stress, HSPs are more appropriate for detecting chronic or long-term exposures to stressors. Moreover, trapping and handling of birds can cause capture stress (Broom and Johnsen 1993), which is not a confounding factor if a stress response is evaluated by HSPs.

That HSPs are not frequently used to measure stress may be due partly to

a lack of knowledge of the methodological procedures for taking samples from wild organisms and for managing those samples prior to their analysis in the laboratory. The aim of this paper is to describe methods for the taking, storage, and analysis of blood samples from wild birds in studies designed to detect and quantify HSP70 and HSP60, the most commonly studied HSPs. When obtained from a bird, the blood tissue suffers a cold stress, and cells may respond by producing HSPs in an attempt to maintain homeostasis. Although cell machinery does not produce changes in HSP levels in a short time, field work often involves maintaining samples for relatively long periods without freezing. Potential changes in protein levels during this time may produce confounding results in HSP analyses. We also studied whether centrifugation itself halts metabolic reactions in the blood (which could affect HSP values) by freezing samples directly after collection or by storing samples and centrifuging just before freezing.

MATERIAL AND METHODS

Storage of samples and variation in HSP values

This study was performed during the breeding seasons of 2001 and 2002 in a Pyrenean oak (*Quercus pyrenaica*) forest in Valsain, Segovia Province, Spain. A population of Great Tits (*Parus major*) breeding in nest boxes in this area has been studied since 1991 (Sanz 1995). Every year the nest boxes are checked for occupation by tits and the dates of clutch initiation, clutch sizes, and the number of fledglings determined. For the present study, five Great Tit nests were randomly selected.

In 2001, a 200 µl blood sample was collected from the brachial vein of 16 13-d old nestlings from three nests. Blood was collected in heparinized capillary tubes and distributed into four Eppendorf tubes (50 µl each). This blood was centrifuged (2000 x g, 5 min) in a field centrifuge (Labnet, Mini Centrifuge, Cat. N° 1201-220V, Woodbridge, NJ, U.S.A.) immediately after collection to separate the plasma from the cells. The plasma was discarded. To determine whether there was any alteration in HSP values due to the time elapsed between collection of

the cell fraction and its freezing, a cell fraction sample from each nestling was immediately frozen in liquid nitrogen and the remaining samples kept in a cool box (not exceeding 15 °C) with cold-blocks until being frozen 1, 4, or 8 h later.

In 2002, the blood cell fraction of 18 nestlings from two nests was examined following the same protocol, with the exception that centrifugation was performed just before freezing (i.e., instead of immediately after collection). Thus, a blood sample from each nestling was centrifuged and the cellular fraction frozen immediately after collection, while the remaining samples were centrifuged 1, 4, or 8 h later, just before being frozen. This was to determine whether centrifugation itself halts metabolic reactions in the blood.

Frozen-first blood aliquots of eight Great Tit chicks were also used to evaluate the intra-blot variability of HSP70 and HSP60 values. For this purpose, three replicates for each individual were processed in a single blot (see below).

Processing of blood samples

All procedures to obtain soluble proteins were carried out at 4 °C to prevent denaturation. Blood cells were homogenized by sonication in approximately 0.2 ml of distilled water to release HSPs. The homogenate was centrifuged (14000 x g, 20 min) and the supernatant collected. The total protein concentration was determined using the Bio-Rad Protein Assay, a dye-binding assay based on the differential color change of the dye in response to protein concentration (Bradford 1976).

Western blotting

Western blotting is an immunological technique for protein detection that accurately determines HSP levels (e.g., Lyashko et al. 1994; Gehring and Wehner 1995; Merino et al. 1998). Samples of soluble proteins obtained from the blood cells of each bird (40 µg/well) were separated by SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis), a method that allows the separation of proteins according to their size when placed into an electric field. The total protein value was within the linear rank of the antibody-antigen response for

the species and antibodies studied. Electrophoresis was performed in a discontinuous buffer system. Polyacrylamide gels consisted of a stacking gel (4%, pH = 6.8) and separating gel (10%, pH = 8.8). Protein separation was performed at a constant voltage of 200 V following the manufacturer's (Bio-Rad) guidelines. Electroblot transfer from the polyacrylamide gels was performed as described by Towbin et al. (1979). Briefly, this method allows detection of separated and immobilized proteins by immunological procedures. The polyvinylidene fluoride (PVDF) blots were washed in PBS (phosphate buffered saline) containing 0.05% Tween-20 (PBS-Tw), and incubated with 5% non-fat powdered milk in PBS-Tw for 1 h to block all additional binding capacity of the PVDF membranes. After incubation, blots were tested with antiserum. The primary monoclonal antibodies (Sigma) were anti-HSP60 (clone LK2) and anti-HSP70 (clone BRM22) diluted 1/1500 and 1/5000 in PBS-Tw. These antibodies react specifically with both inducible and constitutive forms of HSP60 and HSP70, respectively, and have been used to identify these HSPs in a variety of vertebrates

(including birds), helminthes, and plants.

A peroxidase-conjugated secondary antibody (Sigma) was used at 1/6000 dilution. This dilution was chosen because it allows clear detection of HSPs without unspecific binding. Positive bands were detected using 50 mM Tris buffer containing 0.03% diaminobenzidine and 0.001% hydrogen peroxide. Primary and secondary antibodies were incubated overnight at 4 °C and for 2 h at room temperature, respectively. Three washes with PBS-Tw were performed after each step. Finally, protein bands were quantified using image analysis software for Windows (Scion Corporation). Immunoreactivities (arbitrary units) were obtained using the following formula: Immunoreactivity = area x mean intensity of the band. In blotting experiments prior to this study, the monoclonal and polyclonal antibodies (BRM22 and LK2) were found to produce linear response curves to HSP70 and HSP60 ($r^2 > 0.95$).

Statistical analysis

Different blots may show variation due to unknown factors that affect some or all of the steps of the Western blot technique (Merino et al. 1998). To minimize this effect, as many samples as possible from the same year were simultaneously processed so that they could be compared (i.e., all four blood samples of each individual were processed in the same blot). Two-tailed repeated-measures ANOVA was used to assess the variation in protein levels.

RESULTS

Blood samples of the same nestling, when centrifuged just after collection and frozen in liquid nitrogen at different times (i.e., 0, 1, 4 and 8 h later; in 2001), showed no variation in HSP70 or HSP60 levels (repeated-measures ANOVA for HSP70, $F_{3,45} = 0.81$, $p = 0.49$; and HSP60, $F_{3,45} = 0.31$, $p = 0.82$; Fig. 1).

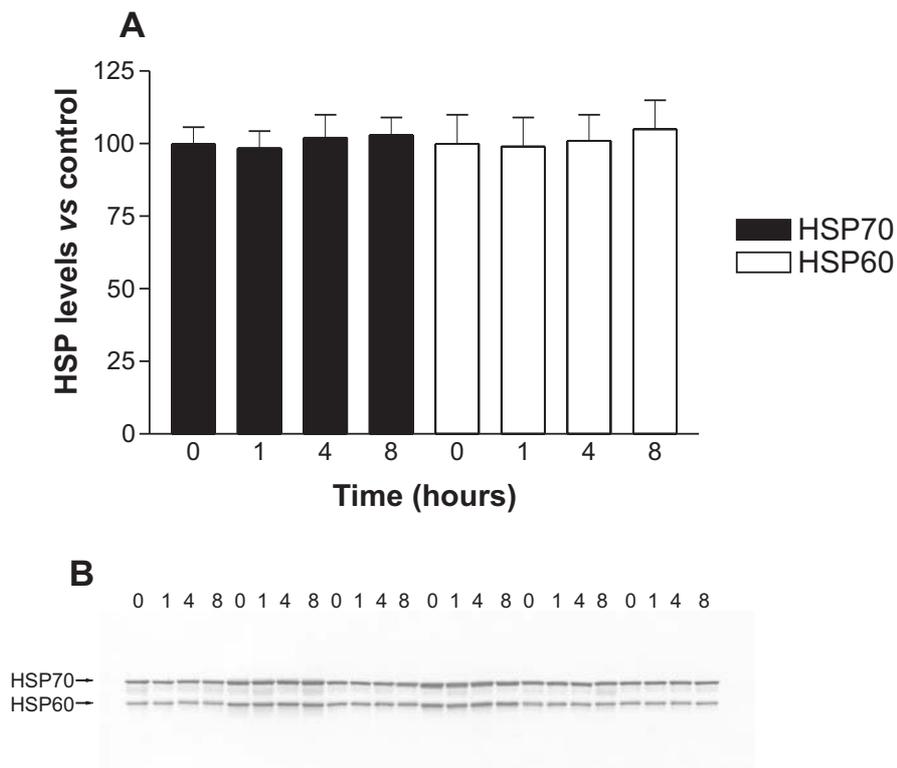


Fig. 1. HSP levels of blood samples from Great Tit nestlings that were centrifuged and frozen 0, 1, 4, and 8 h after collection ($n = 16$), shown as (A) percentage of variation (mean \pm SE) in HSP level from time 0 level, and as (B) immunoblot for samples from six individuals. Numbers in (B) show hours elapsed before freezing.

Blood samples of the same nestling centrifuged just before being frozen at the different times (in 2002) also showed no variation in HSP levels (repeated-measures ANOVA for HSP70, $F_{3,51} = 0.06$, $p = 0.98$; and HSP60, $F_{3,51} = 0.16$, $p = 0.92$; Fig. 2). Keeping blood samples in a cool box therefore led to no variation in HSP70

or HSP60 levels if it was centrifuged and frozen within 8 h of extraction.

Intra-blot reproducibility for HSPs levels was high, as revealed by repeated-measures ANOVA performed with the three replicates of eight samples analyzed in the same blot. No significant differences were seen in HSP70 ($F_{2,14} = 0.18$, $p = 0.84$) or in HSP60 values ($F_{2,14} = 0.23$, $p = 0.80$).

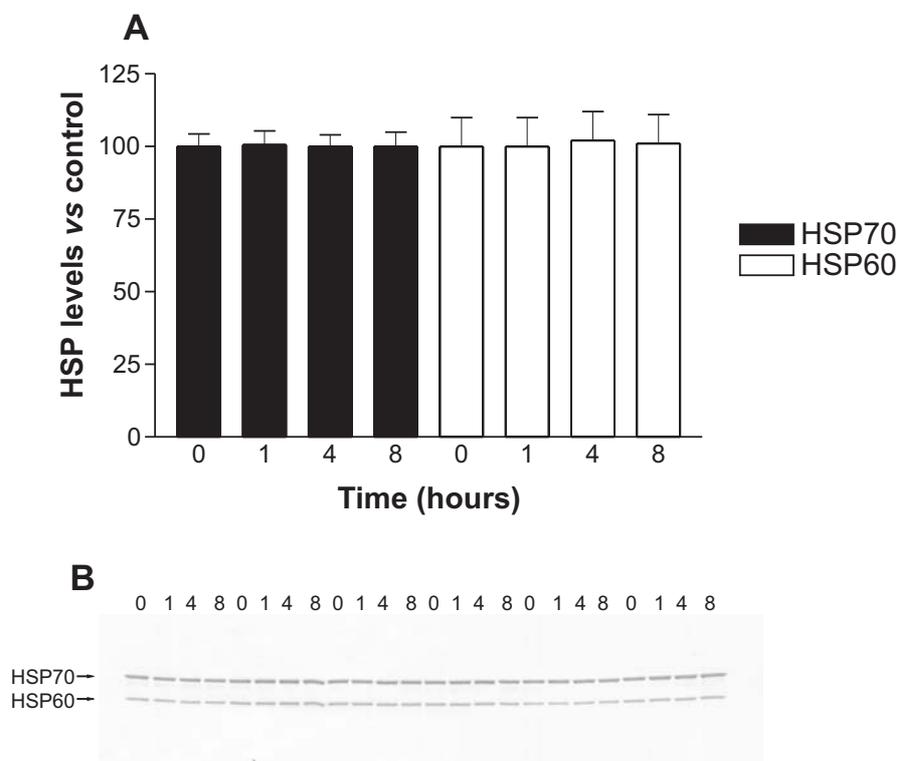


Fig. 2. HSP levels of blood samples from Great Tit nestlings centrifuged just before freezing 0, 1, 4, and 8 h after collection ($n = 18$), shown as (A) percentage of variation (mean \pm SE) in HSP level from time 0 level, and as (B) immunoblot for samples from six individuals. Numbers in (B) show hours elapsed before freezing.

DISCUSSION

The role of physiological or environmental stress in wild animals and their populations is receiving increasing attention, potentially leading to a better understanding of many behavioral, ecological, and evolutionary processes (Feder 1999; Feder and Hofmann 1999; Buchanan 2000). The role of HSPs in response to stress in the organisms so far studied makes this group of proteins a good candidate to act as a bioindicator (Buchanan 2000). Blood sampling is a novel and reliable alternative for checking physiological status in addition to its well-known use in detecting diseases. Moreover, although we discarded plasma fractions for the present study, there is some valuable information that can be obtained from plasma analysis, including using it to detect other measures of stress (e.g., adrenocortical hormones, such as corticosterone; Ludders et al. 2001; Saino et al. 2002) or as estimates of immune capacity (e.g., immunoglobulins; Martínez et al. 2003, Chapter 3). The analysis of heat-shock-mediated stress responses in field studies requires the establishment of a protocol for the collection and analysis

of samples and the interpretation of results. To our knowledge, this is the first study that has assessed the possible problems that might arise in such an undertaking.

Our most important finding is that blood samples exposed to lower temperatures (below 15 °C) for up to 8 h do not experience significant changes in either their HSP70 or HSP60 levels. In previous studies, it was shown that exposure to cold stress in some organisms causes alterations in HSP levels (Martínez et al. 2001), and blood extracted from birds experiences a cold shock that may alter HSP levels. However, blood cells are unable to produce significant quantities of HSPs in response to the shock within 8 h, perhaps because the magnitude of the shock stops cell machinery. Our present results show that blood samples need not be centrifuged and frozen immediately after collection in the field. Keeping them in a cool box is enough: centrifugation and freezing may be performed up to 8 h after collection. This frees researchers from having to carry a centrifuge and liquid nitrogen container into the field.

The Western blot procedure shows, as expected, that no intra-blot differences exist in HSP70 or HSP60 levels. Nevertheless, given that

differences in HSP values could exist between blots (Merino et al. 1998), as many samples as possible should be processed in the same run. Variation could occur with subtle changes in conditions affecting one or all steps in the technique. It is important to take this into account in studies that compare HSP values recorded in several different blots. Another solution for this problem could be to run a common standard such as a commercially available HSP at a consistent concentration in each blot performed. This would allow the correction of HSP values according to interblot variation of the standard optical density values.

Our results show that measuring the HSP-mediated stress response in the field can be improved and simplified. At least 8 h can be allowed to elapse

between the sampling and subsequent centrifugation and storage of blood for later analysis. This could be particularly important in studies where access to sampling locations is difficult (e.g., mountain habitats) or where these sites are far from a research center.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank two anonymous referees for their helpful comments on the manuscript. L. M. Carrascal provided statistical advice. We thank Javier Donés (Montes de Valsain) for permission to work in the study area. The Junta de Castilla y León authorized the ringing and handling of birds. This study was funded by project BOS2000-1125 of the Spanish Ministry of Science and Technology (to S. M. and J. M.). The El Ventorrillo field station collaborated in this study. G. T. was partly supported by a FPI grant from the Comunidad de Madrid and an accommodation grant from the Ayuntamiento de Madrid to reside at the Residencia de Estudiantes.

REFERENCES

- BRADFORD MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248–254.
- BROOM DM, JOHNSEN KG. 1993. *Stress and animal welfare*. Chapman and Hall, London, UK.
- BUCHANAN KL. 2000. Stress and the evolution of condition-dependent signals. *Trends in Ecology and Evolution* **15**: 156–160.
- EEVA T, TANHUNPÄÄ S, RÄBERGH C, AIRAKSINEN S, NIKINMAA M, LEHIKONEN E. 2000. Biomarkers and fluctuating asymmetry as indicators of pollution-induced stress in two hole-nesting passerines. *Functional Ecology* **14**: 235–243.

- FEDER ME. 1996. Ecological and evolutionary physiology of stress proteins and the stress response: the *Drosophila melanogaster* model. In: Johnston IA, Bennett AF (eds) *Animals and temperature*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 79–102.
- FEDER ME. 1999. Organismal, ecological, and evolutionary aspects of heat-shock proteins and the stress response: established conclusions and unresolved issues. *American Zoologist* **39**: 857–864.
- FEDER ME, HOFMANN GE. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology* **61**: 243–282.
- GARBE TR. 1992. Heat shock proteins and infection: interactions of pathogen and hosts. *Experientia* **48**: 635–639.
- GEHRING WJ, WEHNER R. 1995. Heat shock protein synthesis and thermotolerance in *Cataglyphis*, an ant from the Sahara desert. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **92**: 2994–2998.
- LINDQUIST S. 1986. The heat shock response. *Annual Review of Biochemistry* **55**: 1151–1191.
- LUDDERS JW, LANGENBERG JA, CZEKALA NM, ERB HN. 2001. Fecal corticosterone reflects serum corticosterone in Florida Sandhill Cranes. *Journal of Wildlife Diseases* **37**: 646–652.
- LYASHKO VN, VIKULOVA VK, CHERNICOV VG, IVANOV VI, ULMASOV KHA, ZATSEPINA OG, EVGEN'EV MB. 1994. Comparison of the heat shock response in ethnically and ecologically different human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **91**: 12492–12495.
- MACARIO AJL. 1995. Heat-shock proteins and molecular chaperones: implications for pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *International Journal of Clinical and Laboratory Research* **25**: 59–70.
- MARIÑO F, WINTERS C, MORGAN AJ. 1999. Heat shock protein (hsp60, hsp70, hsp90) expression in earthworms exposed to metal stressors in the field and laboratory. *Pedobiologia* **43**: 615–624.
- MARTÍNEZ J, PÉREZ-SERRANO J, BERNADINA WE, RODRÍGUEZ-CAABEIRO F. 1999a. In vitro stress response to elevated temperature, hydrogen peroxide and mebendazole in *Trichinella spiralis* muscle larvae. *International Journal for Parasitology* **29**: 1457–1464.
- MARTÍNEZ J, PÉREZ SERRANO J, BERNADINA WE, RODRÍGUEZ-CAABEIRO F. 1999b. Influence of parasitization by *Trichinella spiralis* on the levels of heat shock proteins in rat liver and muscle. *Parasitology* **118**: 201–209.
- MARTÍNEZ J, PÉREZ SERRANO J, BERNADINA WE, RODRÍGUEZ-CAABEIRO F. 2001. Stress response to cold in *Trichinella* species. *Cryobiology* **43**: 293–302.
- MARTÍNEZ J, TOMÁS G, MERINO S, ARRIERO E, MORENO J. 2003. Detection of serum immunoglobulins in wild birds by direct ELISA: a methodological study to validate the technique in different species using antichickens antibodies. *Functional Ecology* **17**: 700–706.
- MERINO S, MARTÍNEZ J, BARBOSA A, MØLLER AP, DE LOPE F, PÉREZ J, RODRÍGUEZ-CAABEIRO F. 1998. Increase in a heat-shock protein from blood cells in response of nestling House Martins (*Delichon urbica*) to parasitism: an experimental approach. *Oecologia* **116**: 343–347.
- MERINO S, MARTÍNEZ J, MØLLER AP, BARBOSA A, DE LOPE F, RODRÍGUEZ-CAABEIRO F. 2001. Physiological and haematological consequences of a novel parasite on the

- Red-rumped Swallow *Hirundo daurica*. *International Journal for Parasitology* **31**: 1187–1193.
- MERINO S, MARTÍNEZ J, MØLLER AP, BARBOSA A, DE LOPE F, RODRÍGUEZ-CAABEIRO F. 2002. Blood stress protein levels in relation to sex and parasitism of Barn Swallows (*Hirundo rustica*). *Écoscience* **9**: 300–305.
- MORENO J, MERINO S, MARTÍNEZ J, SANZ JJ, ARRIERO E. 2002. Heterophil/lymphocyte ratios and heat-shock protein levels are related to growth in nestling birds. *Écoscience* **9**: 434–439.
- NAGASAWA H, OKA M, MAEDA K, JIAN-GUO C, HISAEDA H, ITO Y, GOOD RA, HIMENO K. 1992. Induction of heat shock protein closely correlates with protection against *Toxoplasma gondii* infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **89**: 3155–3158.
- RITOSSA A. 1962. A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* **18**: 571–573.
- SAINO N, INCAGLI M, MARTINELLI R, MØLLER AP. 2002. Immune response of male Barn Swallows in relation to parental effort, corticosterone plasma levels, and sexual ornamentation. *Behavioral Ecology* **13**: 169–174.
- SANZ JJ. 1995. Environmental restrictions on reproduction in the Pied Flycatcher *Ficedula hypoleuca*. *Ardea* **83**: 421–430.
- SØRENSEN JG, KRISTENSEN TN, LOESCHCKE V. 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters* **6**: 1025–1037.
- TOWBIN H, STAEBELIN T, GORDON J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **76**: 4350–4354.
- WERNER I, NAGEL R. 1997. Stress proteins HSP60 and HSP70 in three species of amphipods exposed to cadmium, diazinon, dieldrin and flouranthene. *Environmental Toxicology and Chemistry* **16**: 2393–2403.
- ZATSEPINA OG, ULMASOV KH A, BERESTEN SF, MOLODTSOV VB, RYBTSOV SA, EVGEN'EV MB. 2000. Thermotolerant desert lizards characteristically differ in terms of heat-shock system regulation. *Journal of Experimental Biology* **203**: 1017–1025.

Detección de inmunoglobulinas en plasma de aves silvestres mediante ELISA directo: un estudio metodológico para validar la técnica en diferentes especies usando anticuerpos anti-gallina

JAVIER MARTÍNEZ, GUSTAVO TOMÁS, SANTIAGO MERINO, ELENA ARRIERO, JUAN MORENO

RESUMEN

Este estudio presenta un protocolo sencillo para medir la cantidad de inmunoglobulinas en el plasma sanguíneo de diferentes especies de aves silvestres (*Ficedula hypoleuca* Pallas, *Parus caeruleus* L., *Lanius meridionalis* Temminck, *Lanius collurio* L., *Athene noctua* Scopoli and *Falco tinnunculus* L.) mediante un ELISA directo, usando anticuerpos anti-gallina comerciales. La técnica de ELISA fue validada para la detección de inmunoglobulinas en plasma por medio de otros métodos electroforéticos (SDS-PAGE y electroforesis nativa) e inmunológicos (Western blot). Los resultados por Western blot muestran que los anticuerpos comerciales reconocieron proteínas con un peso molecular correspondiente a las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas. Los datos obtenidos con el método de ELISA y los obtenidos con el Western blot estuvieron correlacionados, indicando que los anticuerpos comerciales se unieron a las inmunoglobulinas y no a otras proteínas ni a las placas de ELISA. Los datos densitométricos obtenidos por SDS-PAGE y por electroforesis nativa se correlacionaron sólo en algunas especies, lo que indica un problema en la detección de las cadenas pesadas y ligeras, y en la

fracción γ -globulina, respectivamente. Se concluye que el protocolo propuesto es una manera sencilla de llevar a cabo la detección de las inmunoglobulinas totales en plasma y que podría ser utilizado en la mayoría de las especies de aves.

Detection of serum immunoglobulins in wild birds by direct ELISA: a methodological study to validate the technique in different species using antichicken antibodies

ABSTRACT

This study presents an easy protocol to measure the amount of immunoglobulins from the blood serum of different bird species in the wild (*Ficedula hypoleuca* Pallas, *Parus caeruleus* L., *Lanius meridionalis* Temminck, *Lanius collurio* L., *Athene noctua* Scopoli and *Falco tinnunculus* L.) by direct enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA using commercial antichicken antibodies. Additionally, the ELISA technique is validated for detecting serum immunoglobulins by means of other electrophoretic (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE, and native electrophoresis) and immunological (Western blot) methods. The results by Western blot show that the commercial antibody recognized proteins with apparent molecular weight according to heavy and light chains of immunoglobulins. Both ELISA and Western blot data were correlated, implying that the commercial antibody bound to immunoglobulins and not to other proteins or ELISA plates. Densitometric data achieved by SDS-PAGE and native electrophoresis were only correlated in some species indicating a problem in detecting clearly the heavy and light chains, and γ -globulin fraction, respectively. It is concluded that the proposed protocol is easy to carry out and may be used to detect total serum immunoglobulins from most bird species.

INTRODUCTION

The immune system has recently attracted a great deal of attention in evolutionary ecology, starting from the observation that parasitism exerts a strong selective pressure on most

aspects of organismic biology (Sheldon and Verhulst 1996; Zuk et al. 1996). The main focus, rooted in life-history theory, assumes fitness costs of immune defence against parasites and trade-offs in the face of limited resources (e.g. Deerenberg et al. 1997;

Nordling et al. 1998; Moreno et al. 1999; Merino et al. 2000; Soler et al. 2002). Measurements of immune response are becoming routine in many ecological studies (Norris and Evans 2000), requiring the use of simple standardized techniques for estimating levels of activity of different components of the immune system.

The immune response has been differentiated into innate, cell-mediated and humoral components, although the operation of the immune defence is arguably one of the most complex phenomena in biology. Measurement of the cell-mediated response against different antigens, mainly phytohaemagglutinin, has become a standard technique in ecological studies (Merino et al. 1999; Smits et al. 1999, 2001; Moreno et al. 2001). On the other hand, the humoral response can be measured as an increase in levels of total antibodies (e.g. Johnsen and Zuk 1999; Szép and Møller 1999) or of specific antibodies against a non-pathogenic antigen such as diphtheria-tetanus vaccine (e.g. Ilmonen et al. 2000; Råberg et al. 2000) or sheep red blood cells (Deerenberg et al. 1997; Saino et al. 1997).

Initially, the quantification of antibodies from wild birds was made by means of native electrophoresis

determining the γ -globulin fraction in serum (Gustafsson et al. 1994; Saino and Møller 1996; de Lope et al. 1998; Christe et al. 2001; Hoi-Leitner et al. 2001), but recently researchers have used immunological techniques such as agglutination (Cichon et al. 2001; Møller et al. 2001) and enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA (Nordling et al. 1998; Svensson et al. 1998; Fair et al. 1999; Hasselquist et al. 1999; Johnsen and Zuk 1999). At present, the ELISA technique is increasingly used by researchers to detect specific immunoglobulins from wild birds (Fair and Myers 2002; Gasparini et al. 2001, 2002; Ilmonen et al. 2002). However, no study to date has tried to estimate total immunoglobulin concentrations in blood without antigen administration except in fowl (e.g. Johnsen and Zuk 1999). Estimating the total concentration of immunoglobulins does not require prior capture for immunization and may give a valuable insight into the health or nutritional state of birds in natural conditions (Gustafsson et al. 1994). The interpretation of relative levels of serum immunoglobulins regarding health status and immunocompetence in wild animals remains contentious and requires a large comparative data

base including populations of many species under different environmental conditions. Here, we aim only at validating an easy ELISA protocol which may aid researchers in collecting relevant data which can aid in such an interpretation.

The main problem with using ELISA for estimating total serum immunoglobulin concentration in wild birds is the lack of commercial antibodies for detecting immunoglobulins from species other than the domestic chicken or anti-wild bird antibodies recently generated using sera of four species (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA; Ebel et al. 2002). There are two solutions for solving this problem: (i) to develop a specific antibody against the immunoglobulins from the species of interest (Hasselquist et al. 1999; Smits and Bortolotti 2001) or (ii) to use an antibody developed for other species such as domestic chicken (Phalen et al. 1995; Svensson et al. 1998), *Agelaius phoeniceus* (Råberg et al. 2000; Ilmonen et al. 2000, 2002) or using the anti-wild bird immunoglobulins (Ebel et al. 2002). The first solution is laborious and economically costly. The second solution may be more practical because immunoglobulins in birds are encoded by a limited number of genes

and sequences are more conserved than in other organisms (Roitt et al. 1993), although potential cross-reactivities against immunoglobulins in general and IgG in particular require validation. Thus, using commercial antibodies should be feasible, although the following considerations should be kept in mind: (a) What serum dilution should be used? (b) Are the anti-immunoglobulins binding to the right protein?

In this study we present an easy protocol to detect total immunoglobulins by direct ELISA from some wild bird species using a commercial antichickens antibody. We selected this antibody because of its ease of acquisition through several commercial companies. Additionally, we validate the ELISA technique for detecting immunoglobulins by means of other electrophoretic (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE, and native electrophoresis) and immunological (Western blot) methods. By using Western blot, we detect those proteins that are recognized by the antibody used (antichickens) and we estimate their molecular weight. Thus, we can confirm if the secondary antibody binds to the light and heavy chains of

immunoglobulins or cross-reacts with some other serum protein. A positive correlation between the data obtained by ELISA and those obtained with Western blot would be the best control to validate that the bond produced in the ELISA plates is a specific one. On the other hand, the correlation of the data from the γ -globulin fraction obtained with native electrophoresis with data from ELISA would ensure that the antibody is not binding non-specifically to the albumin of the sera. This control is important as albumin has a similar molecular weight to the heavy chains of immunoglobulins. Another way of controlling for the bond with albumin would be to correlate the ELISA data with those obtained with Western blot only for the light chains. Given that one molecule of IgG has two heavy and two light chains, the immunoreactivities of the same number of heavy and light chains should be positively correlated. Finally, the use of SDS-PAGE in reduced conditions would simply validate the ELISA method with another electrophoretic technique.

MATERIAL AND METHODS

Serum and antibodies

We used sera from 12 wild individuals from each of the following bird species: Pied Flycatcher *Ficedula hypoleuca* Pallas (adults), Blue Tit *Parus caeruleus* L. (adults and nestlings), Grey Shrike *Lanius meridionalis* Temminck (adults), Red-Backed Shrike *Lanius collurio* L. (adults), Little Owl *Athene noctua* Scopoli (adults) and European Kestrel *Falco tinnunculus* L. (adults and nestlings). The antibody to detect immunoglobulins from the above species was a polyclonal rabbit antichickens IgG conjugated with peroxidase (Sigma A-9046, St Louis, MO, USA). This antibody recognizes the whole molecule.

SDS-PAGE

SDS-PAGE was carried out under denaturing conditions (2- β -mercaptoethanol) using a discontinuous buffer system (Laemmli 1970). Serum proteins (3 μ l of serum at 1/10 dilution) were separated on polyacrylamide gels containing a stacking gel of 4% and a running gel of 10%. Electrophoretic

buffer (25 mM Tris, 196 mM glycine and 0.1% SDS) and running conditions were according to recommendations of Bio-Rad (200 V; see Mini Protean III instructions) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Once we had finished the electrophoresis, gels were covered with a staining solution (Coomassie Brilliant Blue R250 at 0.1% w/v in 40% methanol plus 10% acetic acid) for 1 h at room temperature on a shaker. Destaining of gels was made with 40% methanol plus 10% acetic acid on a shaker until a good contrast was obtained. Lastly, gels were scanned and protein bands quantified using 1D image analysis software (Scion Image for Windows, Scion Corporation, Frederick, MD, USA).

N-PAGE (Native PAGE)

Native electrophoresis was carried out according to recommendations of Bio-Rad (see Mini Protean III instructions). Basically, the differences with SDS-PAGE were the following: (i) preparation of samples without 2- β -mercaptoethanol and SDS (ii) use of 6% running gels without stacking gel and (iii) electrophoretic buffer without SDS. The process to stain and analyse

the polyacrylamide gels was the same as in the SDS-PAGE.

Western blotting

Serum proteins were prepared for SDS-PAGE under denaturing conditions. Proteins (3 μ l of serum at 1/10 dilution) were separated on polyacrylamide gels containing a stacking gel of 4% and a running gel of 10% (Laemmli 1970) and transferred to Immobilon-P (polyvinylidene difluoride (PVDF) millipore) membranes (transfer buffer: 12.5 mM Tris, 98 mM glycine and 10% methanol; transfer conditions: 150 V for 1.5 h at 4 °C). Unstained markers for molecular weight from Sigma (references SDS-7 and SDS-6H) were included in all gels. After transference the PVDF membrane was stained with Red Ponceau 0.1% (diluted in 0.1% acetic acid) with the aim of separating the lanes containing the molecular weight markers. Then, transfer membranes without molecular weights were washed with 150 mM phosphate-buffered saline, pH 7.2 plus 0.05% Tween 20 (PBS-Tw) and incubated in blocking buffer (PBS-Tw plus 5% non-fat dry milk; Nestlé, Vevey, Switzerland). Later, blots were incubated with antichickén IgG

conjugated with peroxidase (1/5000 dilution) diluted in PBS-Tw. Positive bands were detected by incubation with a developer solution (0.06% 3,3'-diaminobenzidine plus H₂O₂ at 1/1000 dilution). The incubation period for blocking buffer and antichicken antibodies was 1 h and 2 h at room temperature, respectively. Three washes (5 min) with PBS-Tw were performed after each step. Once the process was finished, blots were dried and the markers were once again bound to the membrane containing the immunoreactive bands in order to determine the apparent molecular weight of the bands. As the colour of the markers is usually very light, we painted the base of each marker before scanning the membrane. Later, we substituted the painted markers with lines. This procedure is nowadays a standard one. Lastly, blots were dried and immediately scanned. Protein bands were quantified using 1D image analysis software (Scion Image for Windows, Scion Corporation). Immunoreactivity was measured as optical density \times area of the peaks (see Fig. 1c).

ELISA

ELISA plates (Maxi-sorp, Nunc, Rochester, NY, USA) were coated with serial dilutions of serum (100 μ l) in carbonate–bicarbonate buffer (0.1 M, pH = 9.6, overnight at 4 °C) in order to determine the linear range of the sigmoid curve (Table 1). Later, the plates were blocked with defatted milk diluted in PBS-Tw buffer for 1 h at 37 °C (200 μ l). Antichicken conjugate was added at 1/250 dilution in PBS-Tw and incubated for 2 h at 37 °C (100 μ l). The dilution of antichicken antibody was selected after a previous study to achieve both the maximum slope in the linear range and the minimum cost. In addition, antichicken antibodies were diluted without any protein (i.e. BSA, gelatine, defatted milk, etc.) which avoids unspecific binding. The specificity for binding with immunoglobulins of antichicken antibodies was previously tested by Western blot. After incubation with a substrate comprising ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)) and concentrated hydrogen peroxide diluted to 1/1000 for 1 h at 37 °C, absorbances were measured using a plate spectrophotometer at $\lambda = 405$ nm. In

these conditions, we achieved the maximum values of absorbances. Once the linear range of the sigmoidal curve was achieved for each species, we chose the data obtained using the serum dilution nearest to the centre of the linear range. In order to control for the possible background of the technique, we removed the antichicken antibody step and confirmed that the absorbances achieved were always lower than 0.15. On the other hand, we

coated some ELISA wells with ovoalbumin to control the binding of the polyclonal antichicken to this protein and absorbances were always lower than 0.2. However, these controls are not useful for detecting where the antibody binds. For this purpose, it is necessary to use the Western blot technique which allows observation of the bonding of the antibody.

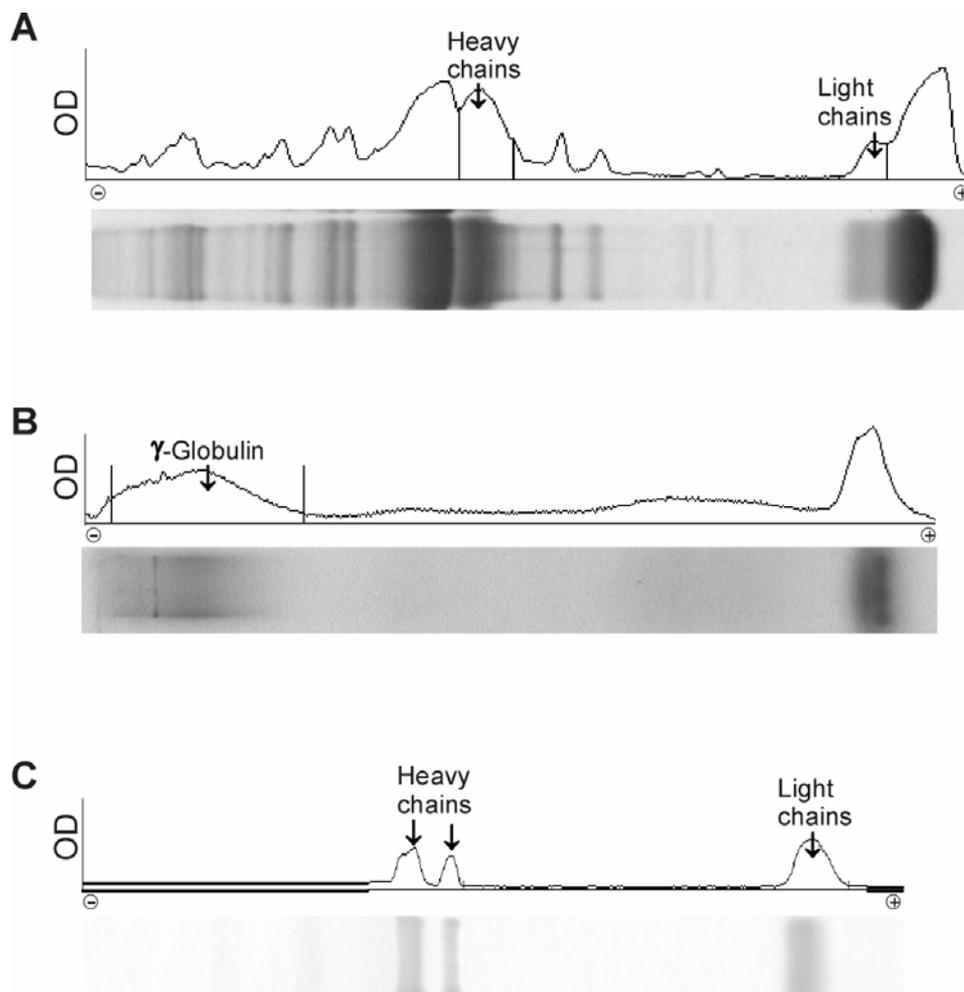


Fig. 1. (A) Example of an SDS-PAGE profile. (B) Example of a native electrophoresis profile. (C) Example of a Western blot profile.

RESULTS

Twelve samples of each species were analysed by ELISA, Western blot, SDS-PAGE and native electrophoresis. Owing to the lack of sufficient serum in individuals from *Ficedula hypoleuca* and nestlings of *Parus caeruleus*, native electrophoresis could not be carried out. ELISA data were achieved using a certain optimum dilution of serum (Table 2). SDS-PAGE data were obtained by marking out the area corresponding to heavy and light immunoglobulin chains, but this procedure was very difficult to perform for some species because immunoglobulin chains and other proteins overlapped (i.e. Fig. 1a). Native electrophoresis data were obtained marking out the area corresponding to the γ -globulin fraction (i.e. Fig. 1b). Marking out this fraction is subjective and even impossible to do for some species. Validation of antichickens antibodies was made by Western blot. This antibody detected proteins corresponding to the apparent molecular weight of heavy and light immunoglobulin chains from different species (Fig. 2a) and also from chicken (Fig. 2b). As can be seen, the molecular weight of heavy chains is more variable

among species than the molecular weight of light chains. On the other hand, ELISA results and data obtained exclusively from light chains by Western blot were also positively correlated. This result is a good control to determine that antichickens antibodies did not bind to albumin, which has a molecular weight similar to heavy chains.

Quantification of heavy and light immunoglobulin chains on blots was carried out as in SDS-PAGE or native electrophoresis (i.e. Fig. 1c). Once we had obtained results from the four methods, we performed correlation analyses (Table 2). ELISA results from all species were significantly correlated with Western blot data. However, data achieved by N-PAGE were only significantly correlated with ELISA when the γ -globulin fraction was easily marked out (i.e. genus *Lanius* and *Athene*). SDS-PAGE data were significantly correlated with results from ELISA in all species except *Ficedula hypoleuca* and nestlings of *Parus caeruleus*. In addition, ELISA data were correlated only with data obtained from light chains for some species (*Athene noctua* and adults of *Falco tinnunculus*).

Table 1: Total and linear range of absorbances and dilutions of serum.

Species	Range of absorbances ^b	Linear range	Absorbances in the linear range
<i>Ficedula hypoleuca</i>	1.00 (0.05) - 0.33 (0.02)	1/4000 - 1/32000	0.90 (0.03) - 0.46 (0.04)
<i>Parus caeruleus</i>	0.79 (0.24) - 0.22 (0.04)	1/2000 - 1/8000	0.67 (0.22) - 0.43 (0.13)
<i>Parus caeruleus</i> ^a	0.35 (0.12) - 0.16 (0.02)	1/1000 - 1/4000	0.32 (0.09) - 0.26 (0.08)
<i>Lanius meridionalis</i>	1.75 (0.45) - 0.50 (0.29)	1/4000 - 1/64000	1.43 (0.51) - 0.50 (0.29)
<i>Lanius collurio</i>	1.28 (0.45) - 0.35 (0.16)	1/4000 - 1/32000	1.02 (0.46) - 0.54 (0.29)
<i>Athene noctua</i>	1.35 (0.60) - 0.35 (0.15)	1/4000 - 1/32000	1.22 (0.52) - 0.57 (0.30)
<i>Falco tinnunculus</i>	0.98 (0.28) - 0.27 (0.05)	1/4000 - 1/32000	0.84 (0.27) - 0.35 (0.10)
<i>Falco tinnunculus</i> ^a	0.55 (0.10) - 0.20 (0.02)	1/4000 - 1/32000	0.46 (0.10) - 0.20 (0.02)

^a Nestlings.

^b Range of absorbances at minimum dilution (1/500) and maximum dilution (1/64000). Data represent mean values \pm standard deviation (deviation data in parentheses).

Table 2. Correlation (r^2) between immunoglobulin data achieved by four methods.

Species	ELISA vs Western blot	ELISA vs SDS-PAGE	ELISA vs N-PAGE
<i>Ficedula hypoleuca</i> (1/8000) ^c	0.88***	0.01 ns ^b	-----
<i>Parus caeruleus</i> (1/4000) ^c	0.85***	0.72***	0.08 ns
<i>Parus caeruleus</i> ^a (1/2000) ^c	0.93***	0.14 ns ^b	-----
<i>Lanius meridionalis</i> (1/32000) ^c	0.75***	0.95***	0.97***
<i>Lanius collurio</i> (1/16000) ^c	0.91***	0.81***	0.81***
<i>Athene noctua</i> (1/16000) ^c	0.88***	0.90*** ^b	0.38*
<i>Falco tinnunculus</i> (1/8000) ^c	0.76***	0.54** ^b	0.05 ns
<i>Falco tinnunculus</i> ^a (1/8000) ^c	0.52**	0.45*	0.20 ns

^a Nestlings.

^b Correlation achieved using only data from immunoglobulin light chains.

^c Optimum dilution of serum in ELISA.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns, not significant.

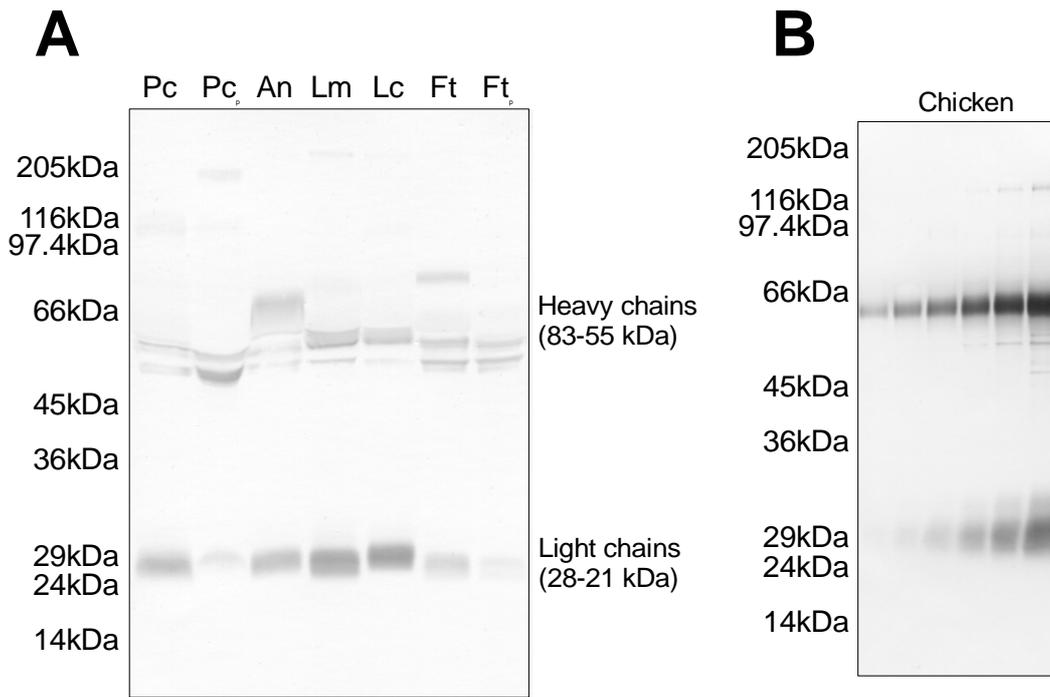


Fig. 2. (A) Study of specificity of antichickens antibodies by means of Western blot in all selected species (Left to right: molecular weights; Pc (left column) = adults of *Parus caeruleus*; Pc (right column) = nestlings of *Parus caeruleus*; An = *Athene noctua*; Lm = *Lanius meridionalis*; Lc = *Lanius collurio*; Ft (left column) = adults of *Falco tinnunculus*; Ft (right column) = nestlings of *Falco tinnunculus*). (B) Western blot using different dilutions of chicken serum (Left to right: molecular weights, serum dilutions 1/2560, 1280, 640, 320, 160, 80).

DISCUSSION

Detection of serum immunoglobulins from wild birds by means of ELISA using a non-specific antibody such as an antichickens antibody is possible, but some considerations should be made. Firstly, detection of total immunoglobulins needs a previous study to determine the sigmoidal curve and choice of a serum dilution included in the linear range (optimum dilution). This procedure should be made for all

species because the affinity of the antichickens antibody could be different in each species. Later, the ELISA data must be validated by detecting immunoglobulins from the same sera by other methods. In this sense, Western blot is the best technique to validate the data obtained with ELISA because we can visualize the protein band recognized by antichickens antibodies. A positive correlation between ELISA and Western blot data confirms the validity of our results (see

Table 2). To use electrophoretic methods to validate ELISA data is possible, but there are some problems. Native electrophoresis is a useful method to detect the γ -globulin fraction, but defining this fraction on densitometric profiles is very difficult in some species. For this reason, ELISA results were correlated with N-PAGE data only in three species. On the other hand, SDS-PAGE has a clear disadvantage when defining both heavy and light immunoglobulin chains, owing to overlap with other proteins of similar molecular weight. In this sense, only in species with low overlap did SDS-PAGE results correlate well with ELISA data (*Parus caeruleus*, *Lanius meridionalis*, *Lanius collurio* and nestlings of *Falco tinnunculus*). In some species it was impossible to separate the different immunoglobulin chains, and SDS-PAGE data did not correlate with ELISA results. On the other hand, in some species (*Athene noctua* and adults of *Falco tinnunculus*) the heavy chains were difficult to mark but the light chains were not. In these cases, although SDS-PAGE data (heavy and light chains) did not correlate well with ELISA results, SDS-PAGE results achieved exclusively from light chains (easier to

mark out) correlated well with ELISA data (Table 2).

Secondly, studies performed to detect specific antibodies (antibodies produced against particular antigens) by ELISA require two control steps: (i) validate antichickens antibody specificity using Western blot (as described above) and (ii) check whether antichickens antibodies recognize the coated antigen on ELISA plates (non-specific reaction). Several studies have used indirect ELISA to detect specific antibodies produced against certain antigens, and have used different protocols to comply with step (ii). Thus, Svensson et al. (1998) used a rabbit antichickens conjugated antibody to measure antigen-specific antibodies. Fair et al. (1999) and Fair and Myers (2002) used a competitive ELISA where the plates were coated with Newcastle disease virus (NDV) antigen. Serum from test birds was added, and then a conjugated monoclonal chicken antibody against NDV was added in excess to bind to the remaining NDV antigen. In Hasselquist et al. (1999) and Ilmonen et al. (2000, 2002), the set-up was an indirect ELISA based on coating with the antigen, adding the test plasma where antigen-specific antibodies bind to the antigen, then adding a rabbit

anti-Redwinged Blackbird IgG antibody that binds to the passerine antibodies in the plasma, and finally adding an anti-rabbit IgG conjugated antibody to induce a colour reaction that estimates the amount of antigen specific passerine antibodies that have bound to the antigen. Only in one case was the specificity of the secondary antibody validated by Western blot (Phalen et al. 1995). However, to our knowledge no other study has validated ELISA data with other immunological or electrophoretic techniques, thus fulfilling step (i).

To conclude, we have shown: (i) by means of ELISA, detection of serum immunoglobulins from wild birds using antichickens antibodies is possible because our results show a significant correlation with Western blot data in all selected species and (ii) electrophoretic methods to detect immunoglobulins have some problems in defining the

immunoglobulin fraction in some species and they are more laborious to perform. We recommend that the specificity of antichickens antibodies is validated by Western blot and the optimum dilution of serum for other species is obtained before quantifying immunoglobulins.

ACKNOWLEDGEMENTS

The study was financially supported by projects BOS2000-1125 to SM and BOS2001-0587 to J. Moreno. E.A. and G.T. were supported during the study by doctoral scholarships from CSIC and Consejería de Educación (Comunidad de Madrid), respectively. G.T. was also the recipient of an accommodation grant from Ayuntamiento de Madrid at the Residencia de Estudiantes. Javier Martínez was supported by an I3P contract from Ministerio de Ciencia y Tecnología. Jesús Martínez Padilla collected the kestrel nestling material, Francisco Campos and Francisco Gutiérrez Corchero of Navarra University sent us the shrike samples, while the CPEMN of Valencia submitted the samples from adult kestrels and owls.

REFERENCES

- CHRISTE P, DE LOPE F, GONZÁLEZ G, SAINO N, MØLLER AP. 2001. The influence of environmental conditions on immune responses, morphology and recapture probability of nestling house martins (*Delichon urbica*). *Oecologia* **126**: 333–338.
- CICHON M, DUBIEC A, CHADZINSKA M. 2001. The effect of elevated reproductive effort on humoral immune function in collared flycatcher females. *Acta Oecologica* **22**: 71–76.
- DE LOPE F, MØLLER AP, DE LA CRUZ C. 1998. Parasitism, immune response and reproductive success in the house martin *Delichon urbica*. *Oecologia* **114**: 188–193.

- DEERENBERG C, APANIUS V, DAAN S, BOS N. 1997. Reproductive effort decreases antibody responsiveness. *Proceedings of the Royal Society of London B* **264**: 1021–1029.
- EBEL GD, DUPUIS AP, NICHOLAS D, YOUNG D, MAFFEI J, KRAMER LD. 2002. Detection by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of antibodies to West Nile virus in birds. *Emerging Infectious Diseases* **8**: 979–982.
- FAIR JM, HANSEN ES, RICKLEFS RE. 1999. Growth, developmental stability and immune response in juvenile Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). *Proceedings of the Royal Society of London B* **266**: 1735–1742.
- FAIR JM, MYERS O. 2002. The ecological and physiological costs of lead shot and immunological challenge to developing western bluebirds. *Ecotoxicology* **11**: 199–208.
- GASPARINI J, MCCOY KD, HAUSSY C, TVERAA T, BOULINIER T. 2001. Induced maternal response to the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi sensu lato* in a colonial seabird, the kittiwake *Rissa tridactyla*. *Proceedings of the Royal Society of London B* **268**: 647–650.
- GASPARINI J, MCCOY KD, HAUSSY C, TVERAA T, BOULINIER T. 2002. Related concentrations of specific immunoglobulins against the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi sensu lato* in eggs, young and adults of the kittiwake (*Rissa tridactyla*). *Ecology Letters* **5**: 519–524.
- GUSTAFSSON L, NORDLING D, ANDERSSON MS, SHELDON BC, QVARNSTRÖM A. 1994. Infectious diseases, reproductive effort and the cost of reproduction in birds. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* **346**: 323–331.
- HASSELQUIST D, MARSH JA, SHERMAN PW, WINGFIELD JC. 1999. Is avian immunocompetence suppressed by testosterone? *Behavioral Ecology and Sociobiology* **45**: 167–175.
- HOI-LEITNER M, ROMERO-PUJANTE M, HOI H, PAVLOVA A. 2001. Food availability and immune capacity in serin (*Serinus serinus*) nestlings. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **49**: 333–339.
- ILMONEN P, TAARNA T, HASSELQUIST D. 2000. Experimentally activated immune defence in female pied flycatchers results in reduced breeding success. *Proceedings of the Royal Society of London B* **267**: 665–670.
- ILMONEN P, TAARNA T, HASSELQUIST D. 2002. Are incubation costs in female pied flycatchers expressed in humoral immune responsiveness or breeding success? *Oecologia* **130**: 199–203.
- JOHNSEN TS, ZUK M. 1999. Parasites and tradeoffs in the immune response of female red jungle fowl. *Oikos* **86**: 487–492.
- LAEMMLI UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- MERINO S, MARTÍNEZ J, MØLLER AP, SANABRIA L, DE LOPE F, PÉREZ-SERRANO J, RODRÍGUEZ-CAABEIRO F. 1999. Phytohemagglutinin injection assay and physiological stress in nestling house martins. *Animal Behaviour* **57**: 219–222.
- MERINO S, MØLLER AP, DE LOPE F. 2000. Seasonal changes in cell-mediated immunocompetence and mass gain in nestling barn swallows: a parasite-mediated effect? *Oikos* **90**: 327–332.
- MØLLER AP, MERINO S, BROWN CR, ROBERTSON RJ. 2001. Immune defence and host sociality: a comparative study of swallows and martins. *American Naturalist* **158**: 136–145.

- MORENO J, SANZ JJ, ARRIERO E. 1999. Reproductive effort and T-lymphocyte cell-mediated immunocompetence in female pied flycatchers *Ficedula hypoleuca*. *Proceedings of the Royal Society of London B* **266**: 1105–1109.
- MORENO J, SANZ JJ, MERINO S, ARRIERO E. 2001. Daily energy expenditure and cell-mediated immunity in pied flycatchers while feeding nestlings: interaction with moult. *Oecologia* **129**: 492–497.
- NORDLING D, ANDERSSON M, ZOHARI S, GUSTAFSSON L. 1998. Reproductive effort reduces specific immune response and parasite resistance. *Proceedings of the Royal Society of London B* **265**: 1291–1298.
- NORRIS K, EVANS MR. 2000. Ecological immunology: life history trade-offs and immune defence in birds. *Behavioral Ecology* **11**: 19–26.
- PHALEN DN, WILSON VG, GRAHAM DL. 1995. Failure of maternally derived yolk IgG to reach detectable concentrations in the sera of nestling budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Avian Diseases* **39**: 700–708.
- RÅBERG L, NILSSON J-Å, ILMONEN P, STJERNMAN M, HASSELQUIST D. 2000. The cost of an immune response: vaccination reduces parental effort. *Ecology Letters* **3**: 382–386.
- ROITT I, BROSTOFF J, MALE D. 1993. *Immunology*, 3rd edn. Mosby-Year Book Europe Limited, London.
- SAINO N, BOLZERN AM, MØLLER AP. 1997. Immunocompetence, ornamentation, and viability of male barn swallows (*Hirundo rustica*). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **66**: 827–836.
- SAINO N, MØLLER AP. 1996. Sexual ornamentation and immunocompetence in the barn swallow. *Behavioral Ecology* **7**: 227–232.
- SHELDON BC, VERHULST S. 1996. Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends in Ecology and Evolution* **11**: 317–321.
- SMITS JE, BORTOLOTTI GR, TELLA JL. 1999. Simplifying the phytohemagglutinin skin-testing technique in studies of avian immunocompetence. *Functional Ecology* **13**: 567–572.
- SMITS JE, BORTOLOTTI GR, TELLA JL. 2001. Measurement repeatability and the use of controls in PHA assays: a reply to Siva-Jothy and Ryder. *Functional Ecology* **15**: 812–817.
- SMITS JE, BORTOLOTTI GR. 2001. Antibody-mediated immunotoxicity in American kestrels (*Falco sparverius*) exposed to polychlorinated biphenyls. *Journal of Toxicology and Environmental Health A* **62**: 217–226.
- SOLER JJ, DE NEVE L, PEREZ-CONTRERAS T, SOLER M, SORCI G. 2002. Trade-off between immunocompetence and growth in magpies: an experimental study. *Proceedings of the Royal Society of London B* **270**: 241–248.
- SVENSSON E, RÅBERG L, KOCH C, HASSELQUIST D. 1998. Energetic stress, immunosuppression and the costs of an antibody response. *Functional Ecology* **12**: 912–919.
- SZÉP T, MØLLER AP. 1999. Cost of parasitism and host immune defence in the sand martin *Riparia riparia*: a role for parent–offspring conflict? *Oecologia* **119**: 9–15.
- ZUK M, BRYANT MJ, KOLLURU GR, MIRMOVITCH V. 1996. Trade-offs in parasitology, evolution and behaviour. *Parasitology Today* **12**: 46–47.

Niveles de proteínas de estrés e infección por parásitos sanguíneos en el herrerillo común (*Parus caeruleus*): un experimento de medicación en condiciones naturales

GUSTAVO TOMÁS, SANTIAGO MERINO, JAVIER MARTÍNEZ, JUAN MORENO, JUAN JOSÉ SANZ

RESUMEN

Se ha sugerido que los parásitos sanguíneos podrían causar estrés fisiológico a las aves hospedadoras en la naturaleza. En este estudio aportamos la primera evidencia experimental que relaciona la infección por parásitos sanguíneos con una respuesta al estrés fisiológico en una población de aves silvestres. Disminuimos mediante medicación la intensidad de infección por *Haemoproteus majoris* y la prevalencia de infección por *Leucocytozoon majoris* en la mitad de una muestra de hembras de herrerillo común (*Parus caeruleus*). Los resultados muestran que (i) las hembras control tuvieron mayores niveles finales de la proteína del estrés HSP60 que las hembras medicadas, (ii) el nivel inicial de inmunoglobulinas estuvo negativamente correlacionado con el nivel final de HSP60, (iii) las hembras control tuvieron un menor peso corporal final que las hembras medicadas, estando el peso corporal negativamente correlacionado con el número de pupas de moscas de *Protocalliphora* sp. presentes en el nido sólo en el caso de hembras control, y (iv) el peso final de la hembra estuvo positivamente correlacionado con la longitud del tarso de los polluelos sólo para las hembras control, que produjeron polluelos con un tarso más corto que las hembras medicadas. Las respuestas de las HSPs al parasitismo, y las

asociaciones con aspectos de la función inmune y de la condición corporal, sugieren que la respuesta al estrés puede permitir a los herrerillos comunes mantener a los parásitos sanguíneos bajo control durante el estrés reproductivo.

Stress protein levels and blood parasite infection in blue tits (*Parus caeruleus*): a medication field experiment

ABSTRACT

It has been suggested that blood parasites are a source of physiological stress for avian hosts in the wild. We report the first experimental evidence relating blood parasite infection to the physiological stress response in a wild avian population. We reduced through medication the intensity of infection by *Haemoproteus majoris* and the prevalence of infection by *Leucocytozoon majoris* in half of a sample of female blue tits (*Parus caeruleus*). Results show that (i) control females had a higher final level of the stress protein HSP60 than medicated ones, (ii) the initial immunoglobulin level was negatively correlated with final HSP60 level, (iii) control females had a lower final body mass than medicated ones, body mass being negatively correlated with the number of blowfly pupae in the nest only for control females, and (iv) final female body mass was positively correlated with nestling tarsus length only for control females, which produced nestlings with shorter tarsi than medicated females. Responses of HSPs to parasitism, and associations with aspects of immune function and condition, suggest that the stress response may allow blue tits to maintain blood parasites under control during reproductive stress.

INTRODUCTION

Effects of parasites on their hosts have been frequently reported and a vast literature exists on host–parasite interactions in birds (Loye and Zuk 1991; Clayton and Moore 1997). However, it is still not well established what kind of costs and trade-offs are induced in hosts which maintain

chronic infections. In any case, parasites impose undoubtedly a drain of resources upon their hosts, thereby forcing them to evolve abilities to reduce these costs by mounting effective immune and/or stress responses. Blood parasites could cause physiological stress to the host by means of cell destruction and haemoglobin consumption (Kirkpatrick

and Suthers 1988; Atkinson and Van Riper 1991). More recently, it has been suggested that parasites may induce heat shock protein expression in the host (Merino et al. 1998, 2002).

Heat shock proteins (HSPs) represent one of the main molecular barriers against cellular homeostasis alteration, and are involved in many different functions like protein synthesis, folding and transport, and degradation of misfolded, non-functional proteins (Morimoto 1991). Ecological and evolutionary concerns about the HSP-mediated stress response have received attention only in recent years (Krebs and Loeschcke 1994a; Merino et al. 1998; Feder 1999; Feder and Hofmann 1999; Buchanan 2000; Sørensen et al. 2003). In addition, measures of the stress response, while relatively routine in areas such as poultry or veterinary sciences, have not been normally employed in field studies on wild species (Feder 1996). The need to sacrifice animals to perform protein analyses (e.g. Eeva et al. 2000; Zatsepina et al. 2000) may be one cause for low interest in the role played by the so-called stress or heat shock proteins. Both ethical and research reasons in field studies make it desirable to avoid animal sacrifice if at

all possible (ASAB Ethical committee and ABS Animal Care committee 2003). Therefore, the non-destructive assessment of the HSP-mediated stress response from blood cells has been shown to be an accurate and reliable method for evaluating physiological or environmental stress of birds *in vivo* (Merino et al. 1998; Moreno et al. 2002; Tomás et al. 2004, Chapter 2). It has been found that HSPs respond to a wide array of stressors, including heat (Gehring and Wehner 1995), toxins (Mariño et al. 1999), oxidant compounds (Martínez et al. 1999a), cold (Martínez et al. 2001) and parasites (Martínez et al. 1999b). Furthermore, each one of the several types of existing HSPs could respond in a different way to each particular stressor, including absence of response (Garbe 1992). For example, Merino et al. (2002) found a parasite-induced HSP60 response, but no effect was detected on HSP70 levels.

Evolutionary ecologists started to pay more attention to immunology since the idea became widespread that parasitism may drive selection on most aspects of animal ecology (Folstad and Karter 1992; Sheldon and Verhulst 1996; Zuk et al. 1996; Schmid-Hempel 2003; Schmid-Hempel and Ebert 2003). Given the great ubiquity and

diversity of parasites, a similar diversity of antiparasite defences should have evolved in hosts. Such defences may comprise behavioural, physiological and immunological mechanisms. Immunological responses against parasite infection, changes in white blood cell profiles (e.g. Graczyk et al. 1994; Massey et al. 1996; Ots and Hõrak 1998), total serum proteins (e.g. de Lope et al. 1998; Ots and Hõrak 1998), and antibody titres in serum (e.g. Isobe and Suzuki 1987; Ots and Hõrak 1998; Atkinson et al. 2001a) have been emphasised in studies of diverse host–parasite systems. Measures of humoral immune response are becoming widely used in many ecological studies dealing with host–parasite interactions (Norris and Evans 2000), and the development of immunological procedures to evaluate immune responses against specific antigens (Isobe and Suzuki 1987; Graczyk et al. 1993) have been crucial in the approach called ecological immunology. Immunoglobulins play an important role in the specific humoral immune response of vertebrates, being responsible for antigen recognition (Roitt et al. 1996). Isobe and Suzuki (1987) documented for the first time an IgM and IgG antibody response in chickens experimentally infected with

Leucocytozoon caulleryi. Specific antibody responses against malarial infections were also reported by Atkinson et al. (2001a, 2001b). Thus, haemoparasite infection may exert a cost on hosts by increasing their immune response. To date, few studies have explored relationships between parasite infections and immunoglobulin levels in wild birds, and to our knowledge, no antibody mediated response in avian hosts infected with *Haemoproteus* or *Leucocytozoon* species in the wild has been reported. Recent data indicate that certain HSPs play key roles in the modulation of the immune system (Feder and Hofmann 1999). The evaluation of humoral immunity in conjunction with the stress response has the potential to shed light on the physiological mechanisms underlying host defences against parasite infections.

Our aim in this study was to determine experimentally whether there exists a relationship between blood parasitism and HSP60, HSP70 and immunoglobulin levels in host peripheral blood, using as a model system a wild population of blue tits (*Parus caeruleus* L.) infected by several blood parasite species. We medicated half of a sample of females with Primaquine, an antimalarial drug,

and derived three predictions regarding effects of the experimental manipulation:

1. Medication with Primaquine should reduce the intensity of infection by *Haemoproteus majoris* and the prevalence of infection by *Leucocytozoon majoris* (see Merino et al. 2000).

2. The HSP-mediated stress response against parasites should differ between experimental groups. In particular, we predicted an increase in HSP60 levels in the course of the brood rearing period for control females (see Merino et al. 1998, 2002).

3. Fitness costs should be higher in the control group as compared with the medicated group due to the higher parasitaemias and/or the induced HSP60 response. Thus, we predicted that control females should lose more weight during the brood rearing period, and/or produce fewer nestlings of poorer quality than medicated females.

MATERIAL AND METHODS

Study population

The study was carried out in a Pyrenean oak (*Quercus pyrenaica*) deciduous forest located in Valsain (Segovia, central Spain, 40°54'N, 4°01'W, 1200 m a.s.l.). A population of blue tits breeding in nest boxes in this area has been studied since 1991 (Sanz 1995). Every year, nest boxes were periodically inspected in order to determine reproductive parameters. The high prevalence of infection by blood parasites in this population (Fargallo and Merino 1999) allowed us to test for the effect of reduction of parasitemia on host stress and immune responses.

Experimental treatment

During the breeding season of 2001, nests were paired according to clutch size and laying date (day 1 = 1 April), and randomly assigned to one of the following experimental treatments. Females were trapped at nest boxes when their nestlings were 3 days old (hatching date = age 0), and injected subcutaneously with either 0.1 mg of Primaquine (Sigma, St Louis, MO,

USA) diluted in 0.1 ml of saline solution (medicated females; approx. 9.25 mg kg⁻¹), or alternatively, the same volume of saline solution (control females). Primaquine is an antimalarial chemical compound which has been successfully employed to reduce blood parasitization in the species under study (Merino et al. 2000). Immediately after capture and before the injection, we obtained blood (80–100 µl) from the brachial vein with the aid of a capillary tube (initial sample). One drop of this blood was smeared on a slide for detection of blood parasites and the rest of the blood was centrifuged (2000 x g, 5 min) with a portable centrifuge (Labnet, Mini Centrifuge, Cat. N° 1201-220V, Woodbridge, NJ, USA). Serum and cell fractions were separated and maintained in a cool box below 15 °C before being frozen for later analysis. Time elapsed since collection until freezing did not exceed eight hours. It has been previously shown that this storing procedure leads to no alteration in HSP levels (Tomás et al. 2004, Chapter 2). At this capture, females were weighed to the nearest 0.05 g with a Pesola (Baar, Switzerland) spring balance and banded individually with numbered metal rings when necessary.

When nestlings were 13 days old, we attempted to recapture as many of the females as possible to obtain a second blood sample (final sample). This allowed us to determine post-treatment HSP levels, immunoglobulin levels and parasitaemia. Females were reweighed and female tarsus length was measured with a digital calliper (accuracy 0.01 mm) at this time. Tarsus length of all nestlings was measured at 13 days of age, wing length was measured with a rule to the nearest 0.5 mm and nestling mass recorded to the nearest 0.05 g.

Parasite quantification

Blood smears were immediately air-dried and later fixed with ethanol (96%) and stained with Giemsa (1/10 v/v) for 45 min. Half of the symmetrical smear was scanned at 200x magnification in search of large blood parasites such as *Trypanosoma* or *Leucocytozoon*, whereas small intra-erythrocytic parasites such as *Haemoproteus* were detected using 1000x magnification (Merino and Potti 1995a; Merino et al. 1997). Intensity of infection by *Haemoproteus* parasites was estimated as the number of infected cells per 2000 erythrocytes

(Godfrey et al. 1987). We use presence/absence indexes for *Trypanosoma* and *Leucocytozoon* parasites due to their low intensities of infection. Larvae of the fly *Protocalliphora azurea* (Diptera: Calliphoridae) are common blood sucking ectoparasites of Holarctic birds (Bennett and Whitworth 1992). In our study population, *Protocalliphora* are probably the most harmful ectoparasites for nestlings, as in other blue tit populations at similar latitudes (Hurtrez-Boussès et al. 1997). After the nestlings had fledged, nests were removed and nest material was carefully dismantled over a white piece of paper in order to count *P. azurea* pupae (Merino and Potti 1995b).

HSP determination

We determined HSP levels from the blood cellular fraction by means of the widely employed Western blot technique (e.g. Lyashko et al. 1994; Gehring and Wehner 1995; Merino et al. 1999; Tomás et al. 2004, Chapter 2). In brief, blood cells were homogenised in approximately 0.2 ml of distilled water by a sonicator. The homogenate was then centrifuged (14 000 x g, 20 min) at 4 °C and the supernatant

collected. The total protein concentration was determined using the Bio-Rad Protein Assay. Samples of soluble proteins (70 µg/well) were separated by SDS-PAGE. The total protein value has been found to be in the linear range of the antibody–antigen response for the species and antibodies studied. Stacking gels containing 4% and separating gels with 10% acrylamide were used. Electrophoresis was carried out at 200 V. Electroblot transfer from the polyacrylamide gels was performed as described by Towbin et al. (1979). The polyvinylidene fluoride (PVDF) blots were washed in phosphate buffered saline (PBS) containing 0.05% Tween-20 (PBS-Tw), and incubated with 5% non-fat powdered milk in PBS-Tw for 1 h. After incubation, blots were tested with antiserum. The primary monoclonal antibodies (Sigma) were anti-HSP70 (clone BRM22) and anti-HSP60 (clone LK2) diluted 1/5000 and 1/1000 in PBS-Tw. These antibodies react specifically with HSP70 and HSP60 respectively, as shown by the immunoreactive bands of appropriate molecular weights.

A peroxidase-conjugated secondary antibody (Sigma) was used at 1/6000 dilution. This dilution was chosen because it allows clear detection of

HSPs without unspecific binding. Positive bands were detected using 50 mM Tris buffer containing 0.06% diaminobenzidine and 0.1% hydrogen peroxide. Primary and secondary antibodies were incubated overnight at 4 °C and for 2 h at room temperature respectively. Three washes with PBS-Tw were performed after each step. Finally, protein bands were quantified using image analysis software for Windows (Scion Corporation™, Frederick, MD, USA). HSP levels were expressed in arbitrary units as area per mean density of the bands. In previous blotting experiments the same monoclonal antibodies used here were found to produce linear response curves to HSP70 and HSP60 ($r^2 > 0.95$).

Immunoglobulin determination

We determined immunoglobulin levels from the blood serum fraction by means of a direct ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) technique. The antibody used to detect immunoglobulins was rabbit anti-chicken IgG conjugated with peroxidase (Sigma). A previous study has shown that this commercial antibody recognizes by cross-reactivity

immunoglobulins from blue tits (Martínez et al. 2003, Chapter 3). The linear range of the sigmoidal curve for this antibody–antigen response, as well as the optimal dilution have been determined previously and we have shown that this procedure is reliable and accurate for determining total immunoglobulins of blood serum fractions from blue tits (Martínez et al. 2003, Chapter 3). ELISA plates (Maxisorp, Nunc) were coated with serums (100 µl) diluted at 1/4000 in carbonate–bicarbonate buffer (0.1 M, pH = 9.6, overnight at 4 °C). Later, the plates were blocked with 5% defatted milk diluted in PBS-Tw buffer for 1 h at 37 °C (200 µl). Anti-chicken conjugate was added at 1/250 dilution in PBS-Tw and incubated for 2 h at 37 °C (100 µl). After incubation with a substrate comprising ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)) and concentrated hydrogen peroxide diluted to 1/1000 for 1 h at 37 °C, absorbance was measured using a plate spectrophotometer at $\lambda = 405$ nm. In these conditions, we achieved the maximum values of absorbance.

There were no significant plate-to-plate differences in immunoglobulin levels. Given the important role immunoglobulins may play in

mediating HSP responses to parasitism, we have included in the present study only those females for which both initial and final serum and cellular fraction of the blood could be analysed. Serum samples were initially processed by means of electrophoretic techniques, which were afterwards found to be unreliable. As a consequence, several samples were not available for ELISA analyses and experimental groups have unequal sample sizes.

Statistical analysis

Parametric statistics were used when variables fitted normal distributions. Otherwise, nonparametric tests were employed. To examine differences in changes of *Trypanosoma* and *Leucocytozoon* infection status in medicated and control females across the experiment (birds changing infection status and birds maintaining infection status), we used McNemar χ^2 tests. Fledging success was subjected to arcsine square-root transformation before using parametric statistical tests. *Haemoproteus* infection intensities were logarithmically transformed to fit normal distributions. GRM models (StatSoft 2001) were built by introducing final value of the variable

(when nestlings were 13 days old) as the dependent variable, and treatment as the categorical predictor. Initial value of the variable (when analysing variables with pre-treatment value), initial and final immunoglobulin, HSP70 and HSP60 levels, and number of *Protocalliphora* pupae in the nest were introduced as continuous predictors. Non significant variables were backward stepwise removed. Differences between blots were tested only when comparing HSP levels between groups, as initial and final samples of each individual were always processed in the same blot. To explore relationships between parasite infection and HSP and immunoglobulin levels, we have analysed individual changes in HSP60, HSP70 and immunoglobulin levels (i.e. value at day 13 of nestling age – value at day 3 of nestling age) against individual changes in *Haemoproteus* infection intensity and classes of change of infection status by *Leucocytozoon*. All tests are two-tailed.

RESULTS

Treatment and infection

A total of 36 experimental individuals were included in the analyses (21 control and 15 medicated). Thirty four out of 36 females were infected by blood parasites at the beginning of the nestling period. The most common blood parasite detected was *Haemoproteus majoris*, infecting 72.2% of the birds, followed by *Leucocytozoon majoris* (63.9%) and *Trypanosoma avium* (33.3%). Before treatment, there were no differences in intensity of *Haemoproteus* infection between experimental groups ($p > 0.05$). The same was true in the cases of *Leucocytozoon* and *Trypanosoma* parasites ($\chi^2_1: p > 0.05$ in both cases).

In accordance with prediction 1, we found that medicated females had lower final *Haemoproteus* infection intensity than control females (Table 1; ANCOVA: treatment: $F_{1,33} = 5.85$, $p = 0.021$; covariate: initial *Haemoproteus* intensity: $F_{1,33} = 196.65$, $p < 0.001$).

Moreover, final prevalence of infection by *L. majoris* was significantly different between treatments ($\chi^2_1 = 6.22$, $p = 0.013$; 20.0% for medicated females, 61.9% for controls), and there was a tendency towards more birds recovering from infection by *Leucocytozoon* than acquiring it in the medicated group (McNemar $\chi^2_1 = 3.13$, $p = 0.077$). No such tendency appeared in the control group (McNemar $\chi^2_1 = 0.00$, $p = 1.000$). There were no significant differences when comparing the number of birds maintaining the uninfected status with the number of birds maintaining the infected status by *Leucocytozoon* in any group (McNemar $\chi^2_1: p > 0.10$ in both cases). Nevertheless, we did not find any apparent effect of medication with Primaquine on the prevalence of infection by *T. avium* (McNemar $\chi^2_1: p > 0.18$ for birds changing infection status in both groups and $p > 0.72$ for birds maintaining infection status in both groups). Thus, the experimental treatment had the expected effect on infection by the two most common blood parasites.

Table 1. Average intensity of infection by *Haemoproteus majoris*, HSP60, HSP70 and immunoglobulin levels, and female body mass at 3 (initial) and 13 (final) days of nestling age for medicated ($n = 15$) and control ($n = 21$) female blue tits. Numbers in parenthesis are standard errors.

	<i>Medicated</i>		<i>Control</i>	
	Initial	Final	Initial	Final
<i>Haemoproteus</i>	12.60 (3.57)	7.21 (2.22)	12.14 (4.26)	11.05 (2.96)
HSP60	22488.42 (800.15)	22422.68 (865.67)	21313.99 (882.32)	22963.43 (900.89)
HSP70	29780.19 (1661.98)	30182.05 (1925.49)	29713.63 (1446.78)	29054.61 (1451.64)
Immunoglobulins	0.66 (0.05)	0.64 (0.06)	0.80 (0.05)	0.80 (0.05)
Female mass (g)	10.88 (0.12)	10.39 (0.13)	10.66 (0.11)	10.01 (0.12)

Blood parasites and physiological host responses

Before treatment, there were no significant differences either in HSP70, HSP60 or immunoglobulin levels between females subsequently injected with Primaquine and those injected with the placebo ($p > 0.05$ in all cases). In accordance with prediction 2, there was a significant difference in final HSP60 level between treatments, due to its increase in control females (Table 1), when both initial HSP60 and immunoglobulin levels were controlled for (ANCOVA: $F_{1,32} = 6.58$, $p = 0.015$; covariates: initial HSP60 level: $F_{1,32} = 56.20$, $p < 0.001$; initial immunoglobulin level: $F_{1,32} = 5.95$, $p =$

0.020 ; Fig. 1). When treatment and initial HSP60 level were controlled for, it appeared that initial immunoglobulin level was negatively and significantly associated with final HSP60 level ($r = -0.36$, $p = 0.029$; Fig. 2). There were no significant differences in final HSP70 levels between treatments, after controlling for initial HSP70 level (ANCOVA: $F_{1,33} = 1.19$, $p = 0.284$; covariate: initial HSP70 level: $F_{1,33} = 166.79$, $p < 0.001$; Table 1). Final immunoglobulin level did not significantly differ between medicated and control females, after controlling for initial immunoglobulin level (ANCOVA: $F_{1,33} = 1.34$, $p = 0.255$; covariate: initial immunoglobulin level: $F_{1,33} = 20.87$, $p < 0.001$; Table 1).

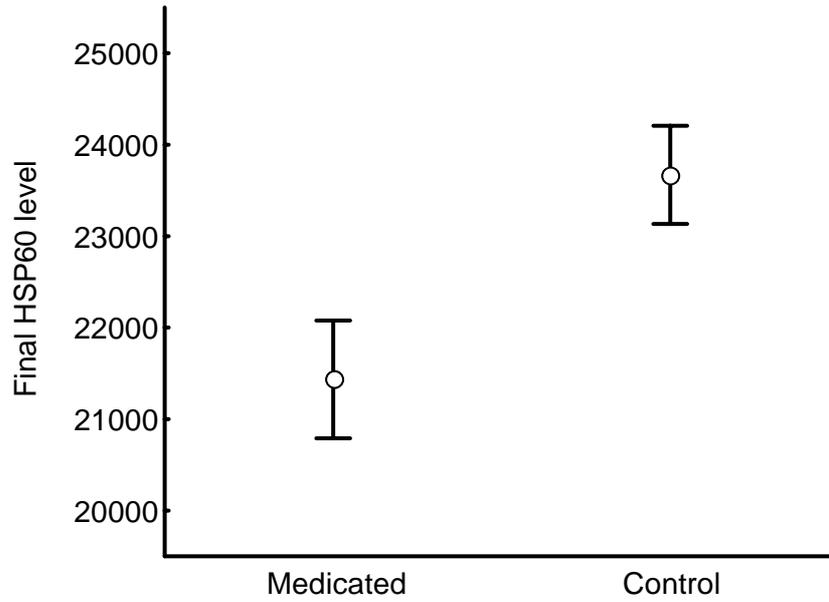


Fig. 1. Least square means (\pm SE) of final HSP60 level in medicated and control female blue tits.

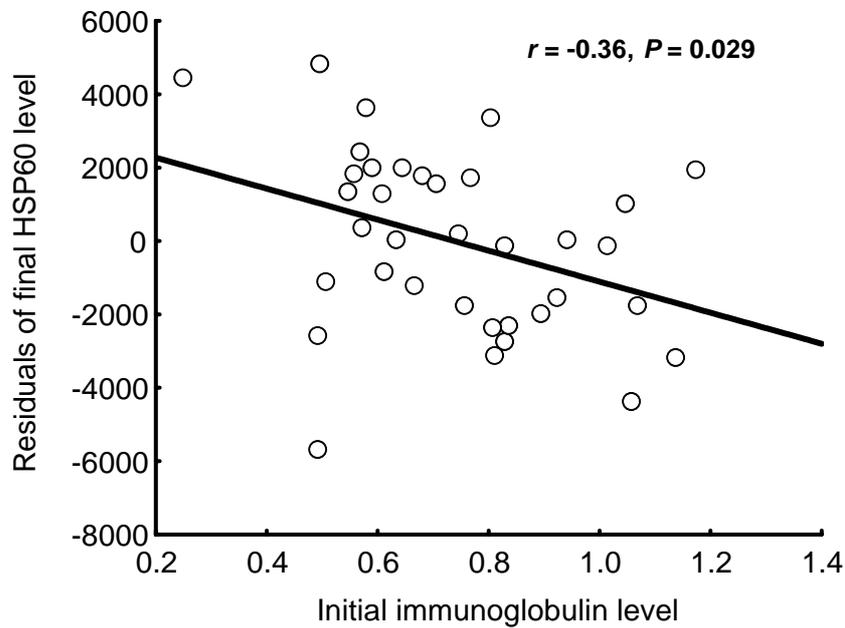


Fig. 2. Relationship between initial immunoglobulin level and final HSP60 level in female blue tits. HSP60 values are residuals after controlling for treatment and initial HSP60 level.

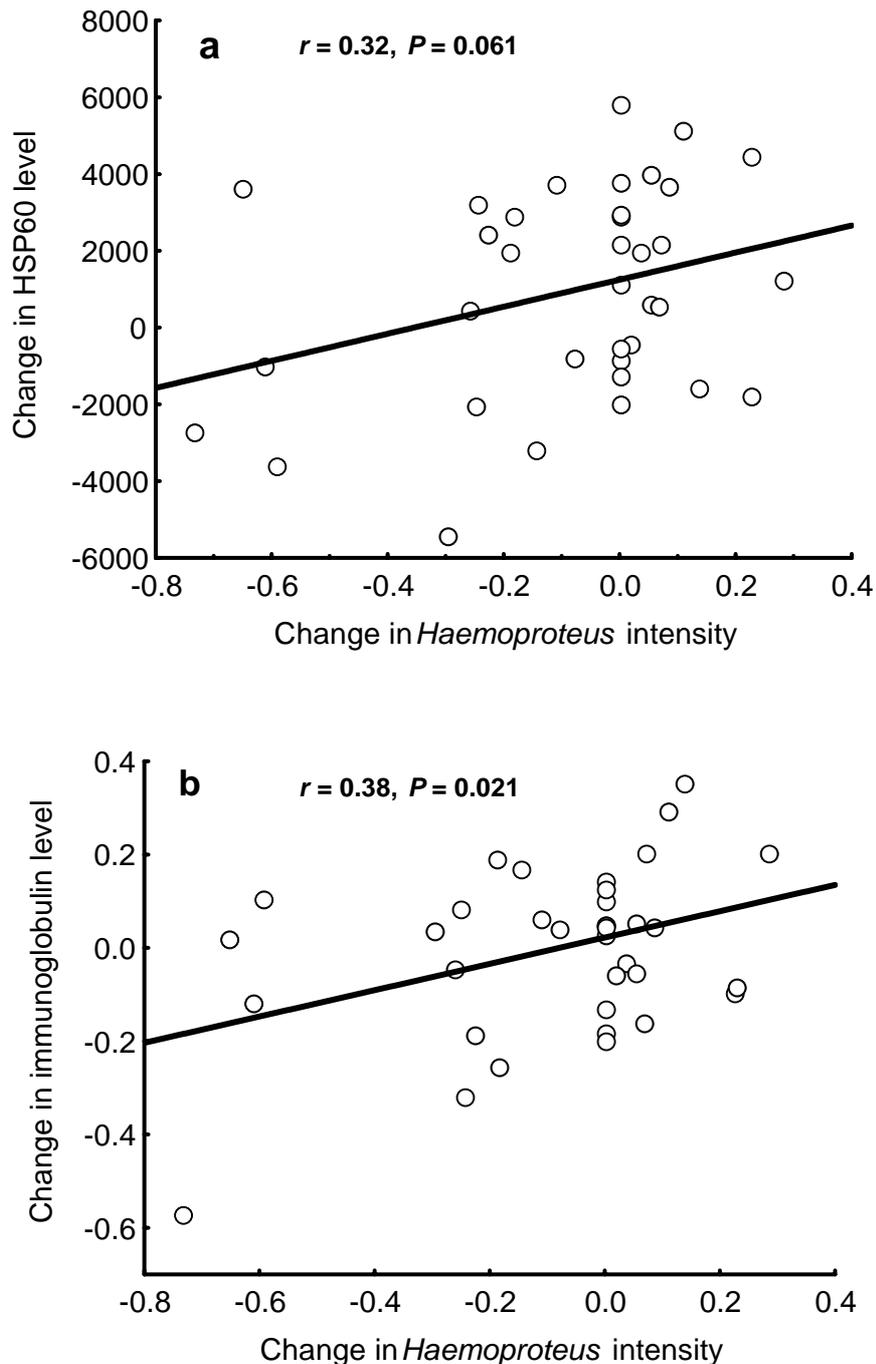


Fig. 3. Relationship between individual change in *Haemoproteus* infection intensity (logarithmically transformed) from day 3 to day 13 of nestling age (final–initial values) and individual change in the same period in (a) HSP60 level, and (b) immunoglobulin level, in female blue tits.

Individual change in *Haemoproteus* intensity (final intensity – initial intensity) showed a marginally

significant positive correlation with individual change in HSP60 levels ($r = 0.32$, $p = 0.061$: Fig. 3a), and a

significant and positive correlation with individual change in immunoglobulin levels ($r = 0.38$, $p = 0.021$; Fig. 3b). Individual change in *Haemoproteus* intensity was not correlated with individual change in HSP70 level ($r = -0.26$, $p = 0.123$). There were no significant differences in the change in HSP60, HSP70 or immunoglobulin levels between birds that either remained uninfected by *Leucocytozoon*, remained infected, acquired the infection or recovered from it (ANOVA: all $p > 0.19$).

Effects on parental and offspring body measurements

There were no significant differences between groups in laying date, clutch size, brood size or parental tarsus length and mass before the experiment (one-way ANOVA: $p > 0.05$ in all cases). In accordance with prediction 3, control females had lower final body mass than medicated ones (Table 1 and Fig. 4), when correcting for initial body mass and the negative effect of number

of blow fly pupae in the nest (ANCOVA: $F_{1,32} = 5.01$, $p = 0.032$; covariates: initial body mass: $F_{1,32} = 42.88$, $p < 0.001$; blow fly pupae: $F_{1,32} = 6.85$, $p = 0.013$). To confirm whether or not the relationship between female mass and blow fly infestation differed between treatment groups, we included in the analysis the interaction between treatment and number of blow fly pupae, which proved significant ($F_{1,32} = 5.44$, $p = 0.026$). Final body mass of control females was negatively and significantly correlated with number of *Protocalliphora* pupae, while this was not the case for medicated females (Fig. 5). By including this interaction term, the treatment factor was no longer significant. Moreover, there was a tendency for female body mass change (i.e. female mass loss = final body mass – initial body mass) to correlate positively with number of blow fly pupae in the nest ($r = 0.29$, $p = 0.084$). This tendency turns significant when excluding nests lacking blow flies ($r = 0.43$, $p < 0.05$, $n = 21$).

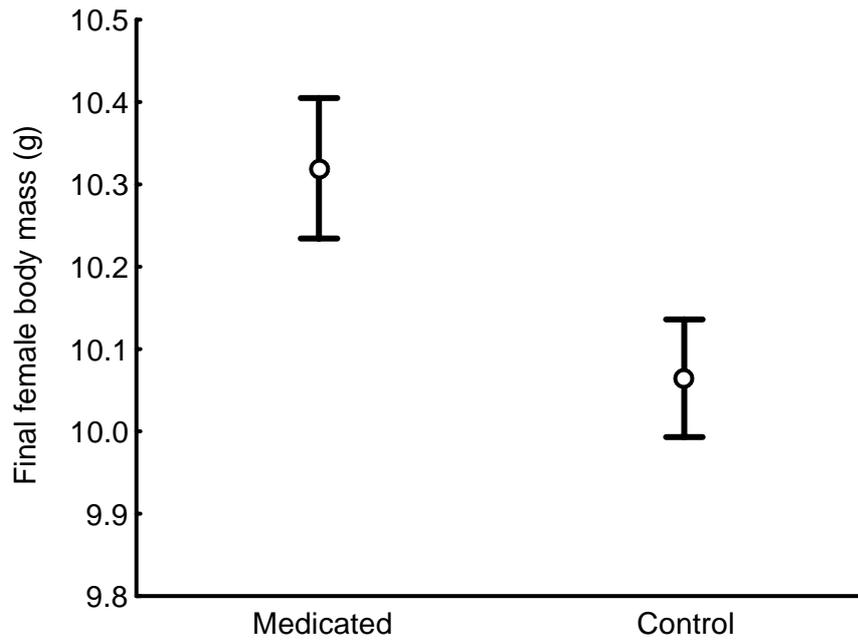


Fig. 4. Least square means (\pm SE) of final body mass in medicated and control female blue tits.

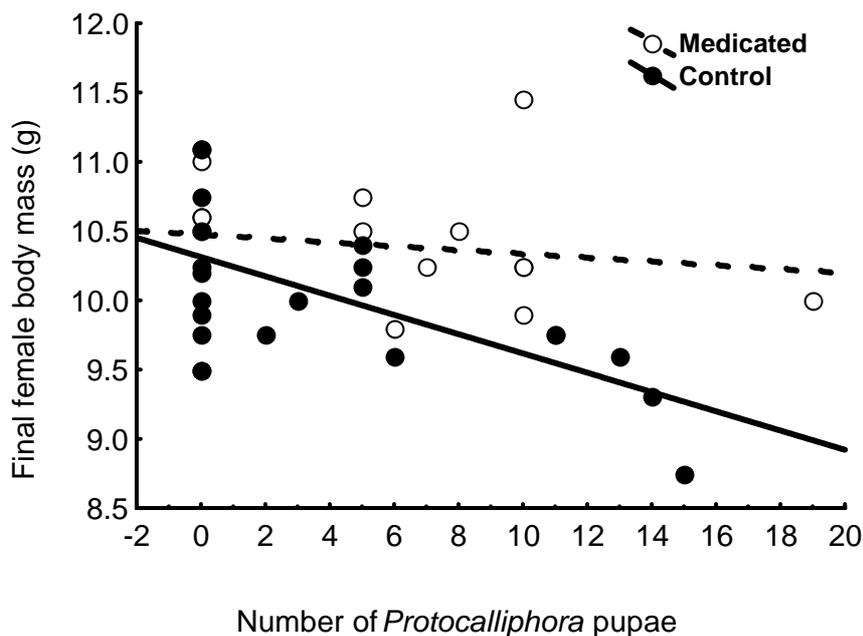


Fig. 5. Relationship between female body mass and number of *Protocalliphora* pupae in blue tit nests ($r = -0.16$, $p = 0.582$ for medicated females; $r = -0.66$, $p = 0.001$ for control females) at the time nestlings were 13 days old.

Contrary to our expectations, there were no significant differences between groups in fledging success ($F_{1,34} = 0.17$, $p = 0.681$), or nestling

measurements on day 13 (nestling mass: $F_{1,34} = 0.10$, $p = 0.760$; nestling tarsus length: $F_{1,34} = 0.53$, $p = 0.473$; nestling wing length: $F_{1,34} = 0.20$, $p =$

0.654). Nevertheless, nestling tarsus length and nestling mass were significantly and positively correlated with female final body mass (nestling tarsus length: $r = 0.45$, $p = 0.006$; nestling mass: $r = 0.45$, $p = 0.006$). To confirm whether the relationships between nestling size and final female body mass differed between treatments, we carried out ANCOVAs with treatment and final female body mass as factors and nestling tarsus length or nestling mass as the dependent variable. Both treatment (nestlings of control females having shorter tarsi), and final female body mass (nestlings with shorter tarsi were attended by females with lower mass), had a significant effect on nestling tarsus

length (treatment: $F_{1,32} = 4.96$, $p = 0.033$; final female mass: $F_{1,32} = 4.31$, $p = 0.046$). In addition, we found a significant interaction between treatment and final female body mass ($F_{1,32} = 5.02$, $p = 0.032$). Only tarsus lengths of nestlings reared by control females were positively and significantly correlated with final female body mass, while this was not the case for nestlings reared by medicated females (Fig. 6). Nestling body mass was significantly affected by female final body mass ($F_{1,32} = 6.83$, $p = 0.014$), but not by treatment or the interaction between treatment and final female body mass (both $p > 0.5$).

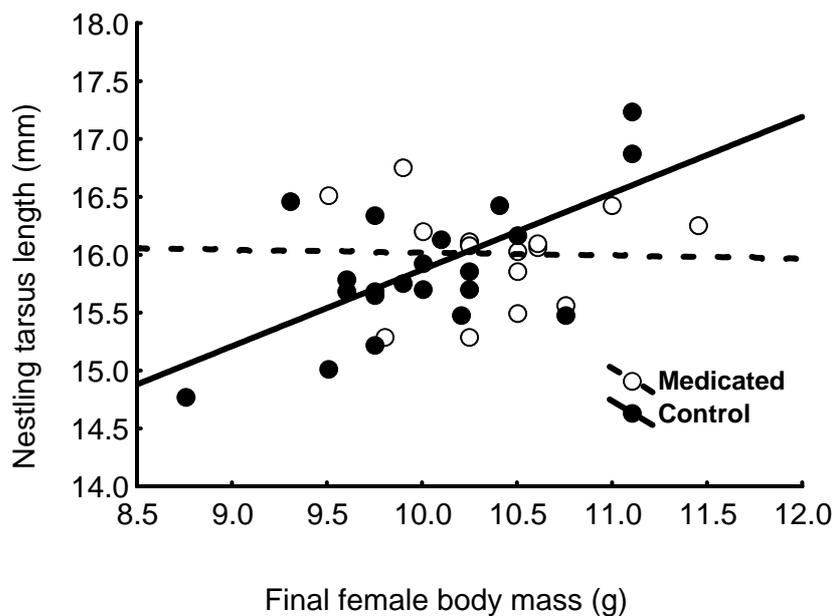


Fig. 6. Relationship between female body mass and mean nestling tarsus length when the nestlings were 13 days old ($r = -0.03$, $p = 0.920$ for medicated females; $r = 0.64$, $p = 0.002$ for control females).

DISCUSSION

The role of stress responses in the life histories of wild animals is receiving increasing attention by ecologists. Study of stress responses is stimulating as integrated knowledge of a wide range of behavioural, ecological and evolutionary processes are still not fully understood (Feder 1999; Feder and Hofmann 1999; Buchanan 2000; Sørensen et al. 2003). The function of HSPs in response to stress in almost all organisms so far studied could turn this group of proteins into one of the best candidates for acting as bioindicators in wild animal populations (Buchanan 2000). Despite the vast literature on host–parasite interactions, the relation between parasitism and HSP levels in hosts has not been examined in wild populations until recent years (Merino et al. 1998, 2002; Feder and Hofmann 1999).

Our experimental manipulation produced a reduction in intensity of infection by *H. majoris* and in prevalence of infection by *L. majoris* in female blue tits as expected (Merino et al. 2000). We also found experimental evidence for a parasite-induced stress response in the host: final HSP60 levels were significantly higher in

control females, whose parasite infection intensity was not experimentally reduced through medication (prediction 2, Fig. 1). Our data show that when parasitism is experimentally reduced, HSP60 levels show little variation, but in control females which maintain similar infection intensities throughout the nestling stage, a physiological response mediated by HSP60 levels is triggered. The tendency for individual change in *Haemoproteus* infection intensity to correlate positively with individual change in HSP60 level (Fig. 3a) adds support to the hypothesis that parasites are the stressors that cause the increase in HSP60 values in blue tits.

Some previous studies on birds, all dealing with hirundines, suggest a role for HSP60 in the response to parasitism. Merino et al. (1998) found higher levels of this protein in nestling house martins (*Delichon urbica*) infected by *Trypanosoma* sp. In another study with adult barn swallows (*Hirundo rustica*), Merino et al. (2002) linked parasite infection with higher levels of HSP60 by comparing uninfected birds with those infected by different species of blood parasites. However, to our knowledge, this is the first study reporting experimental evidence of a positive association

between parasite infection and HSP expression in a wild avian population. The mechanistic basis underlying this process will require further research. Parasites may cause increases in HSP60 by at least three different, non mutually exclusive mechanisms: (i) it could be a response to the fever occasioned by the infection, i.e. HSP60 could be increased in response to a heat shock (Garbe 1992); (ii) the increase in HSP60 could be due to a pathogen-induced necrosis (Matzinger and Fuchs 1996; Moseley 2000); and (iii) secretion/excretion products from parasites could induce protein expression (Martínez et al. 1999b).

In stressful conditions such as those produced by parasite infections, an increase in HSP60 expression by the host could be adaptive in order to maintain appropriate levels of erythrocyte functionality. Intraerythrocytic parasites could probably cause physiological stress to their hosts by means of cell destruction and haemoglobin consumption (Kirkpatrick and Suthers 1988; Atkinson and Van Riper 1991). In addition, parasites may obtain some benefit from the maintenance and correct functioning of cell machinery. It has been demonstrated that certain HSPs, such as HSP70 and HSP65, play

key roles in inhibiting apoptotic death of cells infected by intracellular parasites (Heussler et al. 2001; Kroemer 2001). This could be beneficial both for the parasite and for the host, because if HSP synthesis is induced in infected cells, the apoptotic machinery would be inhibited, resulting in mild disease. However, if HSP expression is suppressed, infected cells would be destroyed rapidly, and severe disease will follow (Hisaeda et al. 1997). Whether one mechanism or the other is favoured could depend on the virulence of the parasite strain (Hisaeda et al. 1997).

As previously found (Merino et al. 2002), blood HSP70 is not apparently associated with a host response against infection by blood parasites in birds. The exact function of this protein in the blood cells of birds remains unknown, and it is likely that HSP70 responds in a different manner, or in response to different stressors, than HSP60 does (Krebs and Loeschcke 1994b).

Trade-offs between physiological antiparasite defences and reproductive performance have been frequently suggested in birds (Svensson et al. 1998; Ilmonen et al. 1999, 2000; Hasselquist et al. 2001). Merino et al. (1998) showed that HSP60 could be costly to produce in growing birds,

since they found a negative relationship between HSP and wing length that may be due to a trade-off between energy allocations. In addition, it is important to indicate that the induction of HSPs has been shown to be deleterious in the absence of stress (Feder 1996). Further evidence that HSP expression is costly in ecological terms has been reported by Silbermann and Tatar (2000). In the present study, some of the costs imposed directly by parasites and/or indirectly through HSP60 expression were paid for by female blue tits in terms of post-breeding condition (in accordance with prediction 3; Fig. 4). In a similar experiment, Merino et al. (2000) showed that final body mass in non-medicated female blue tits was negatively related to final infection intensity by *Haemoproteus*.

Medicated females seemed to obtain some advantage from the reduction in blood parasitaemia, as they did not lose mass differentially in response to the degree of blow fly infestation suffered by their brood. We should expect condition-dependent survival prospects in female blue tits, especially in control females (Brown et al. 1995; Richner and Tripet 1999). In contrast to Merino et al. (2000), who found that broods attended by control females had lower fledging success than those of

medicated females, we found no short-term detrimental effects of parasites on fledging success, maybe because *Haemoproteus* infection intensities — as well as sample sizes — were lower in this study than in Merino et al. (2000). Nevertheless, we found significant effects of treatment, final female mass and their interaction on nestling tarsus length, in addition to a significant positive relationship between final female body mass and nestling tarsus length observed only for control females (Fig. 6). These results are in accordance with prediction 3, showing that control females produced nestlings of poorer quality than medicated females.

On the other hand, the fact that the initial immunoglobulin level is significantly related to final HSP60 level (Fig. 2), suggests that the initial health condition of birds plays an important role and must be taken into account to properly reveal relationships underlying host stress responses to blood parasites. The positive association between intensity of infection by *Haemoproteus* and immunoglobulin levels (Fig. 3b) also points out the role of immunoglobulins in managing parasite infections in wild birds. These results offer a new insight into how parasitism, stress response

and immune function may be connected in a three-way interaction, and thus merit further research.

To conclude, we have experimentally shown that infection by two of the most common avian blood parasites induces stress responses in wild birds. Fitness costs of either parasites and/or responses against them were detected with respect to current reproduction. The evaluation of the long-term effects on host fecundity and survival could help to better interpret the role played by HSPs in stress responses of wild birds facing parasite infections.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to an anonymous referee for comments on the manuscript. We thank Javier Donés (Director of “Montes de Valsain”) for permission to work in the study area. The Junta de Castilla y León authorized the ringing and handling of birds. This study was funded by projects BOS2000-1125 and BOS2003-05724 from Ministerio de Ciencia y Tecnología (to SM and J. Martínez) and BOS2001-0587 (to J. Moreno). The El Ventorrillo field station collaborated in this study. GT was partly supported by a FPI grant from the Comunidad de Madrid and an accommodation grant to reside at the Residencia de Estudiantes from the Ayuntamiento de Madrid.

REFERENCES

- ASAB (Association for the Study of Animal Behaviour) Ethical committee and ABS (Animal Behavior Society) Animal Care committee. 2003. Guidelines for the treatment of animals in behavioural research and teaching. *Animal Behaviour* **65**: 249–255.
- ATKINSON CT, DUSEK RJ, LEASE J. 2001a. Serological responses and immunity to superinfection with avian malaria in experimentally-infected hawaii amakihi. *Journal of Wildlife Diseases* **37**: 20–27.
- ATKINSON CT, LEASE JK, DRAKE BM, SHEMA NP. 2001b. Pathogenicity, serological responses, and diagnosis of experimental and natural infections in native hawaiian thrushes. *Condor* **103**: 209–218.
- ATKINSON CT, VAN RIPER C III. 1991. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon*, and *Haemoproteus*. In: Loye JE, Zuk M (eds.), *Bird-parasite Interactions. Ecology, evolution and behaviour*. Oxford University Press, Oxford, pp. 19–48.
- BENNETT GF, WHITWORTH TL. 1992. Host, nest, and ecological relationships of species of *Protocalliphora* (Diptera: Calliphoridae). *Canadian Journal of Zoology* **70**: 51–61.
- BROWN CR, BROWN MB, RANNALA B. 1995. Ectoparasites reduce long-term survival of their avian host. *Proceedings of the Royal Society of London B* **262**: 313–319.
- BUCHANAN KL. 2000. Stress and the evolution of conditiondependent signals. *Trends in Ecology and Evolution* **15**: 156–160.

- CLAYTON DH, MOORE J. 1997. *Host-parasite evolution: general principles and avian models*. Oxford University Press, Oxford.
- DE LOPE F, MØLLER AP, DE LA CRUZ C. 1998. Parasitism, immune response and reproductive success in the house martin *Delichon urbica*. *Oecologia* **114**: 188–193.
- EEVA T, TANHUANPÄÄ S, RÄBERGH C, AIRAKSINEN S, NIKINMAA M, LEHIKONEN E. 2000. Biomarkers and fluctuating asymmetry as indicators of pollution-induced stress in two hole-nesting passerines. *Functional Ecology* **14**: 235–243.
- FARGALLO JA, MERINO S. 1999. Brood size manipulation modifies the intensity of infection by haematozoa in female blue tits *Parus caeruleus*. *Ardea* **87**: 261–268.
- FEDER ME. 1996. Ecological and evolutionary physiology of stress proteins and the stress response: the *Drosophila melanogaster* model. In: Johnston IA, Bennett AF (eds.), *Animals and temperature*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 79–102.
- FEDER ME. 1999. Organismal, ecological, and evolutionary aspects of heat-shock proteins and the stress response: established conclusions and unresolved issues. *American Zoology* **39**: 857–864.
- FEDER ME, HOFMANN GE. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology* **61**: 243–282.
- FOLSTAD I, KARTER AJ. 1992. Parasites, bright males, and the immunocompetence handicap. *American Naturalist* **139**: 603–622.
- GARBE TR. 1992. Heat shock proteins and infection: Interactions of pathogen and hosts. *Experientia* **48**: 635–639.
- GEHRING WJ, WEHNER R. 1995. Heat shock protein synthesis and thermotolerance in *Cataglyphis*, an ant from the Sahara desert. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **92**: 2994–2998.
- GODFREY RD JR, FEDYNICH AM, PENCE DB. 1987. Quantification of hematozoa in blood smears. *Journal of Wildlife Diseases* **23**: 558–565.
- GRACZYK TK, CRANFIELD MR, SHIFF CJ. 1993. ELISA method for detecting anti-*Plasmodium relictum* and anti-*Plasmodium elongatum* antibody in infected duckling sera using *Plasmodium falciparum* antigens. *Journal of Parasitology* **79**: 879–885.
- GRACZYK TK, SHAW ML, CRANFIELD MR, BEALL FB. 1994. Hematological characteristics of avian malaria cases in African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*) during the first outdoor exposure season. *Journal of Parasitology* **80**: 302–308.
- HASSELQUIST D, WASSON MF, WINKLER DW. 2001. Humoral immunocompetence correlates with date of egg-laying and reflects work load in female tree swallows. *Behavioral Ecology* **12**: 93–97.
- HEUSSLER VT, KÜENZI P, ROTTENBERG S. 2001. Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *International Journal of Parasitology* **31**: 1166–1176.
- HISAEDA H, SAKAI T, ISHIKAWA H, MAEKAWA Y, YASUTOMO K, GOOD RA, HIMENO K. 1997. Heat shock protein 65 induced by gammadelta T cells prevents apoptosis of macrophages and contributes to host defense in mice infected with *Toxoplasma gondii*. *Journal of Immunology* **159**: 2375–2381.
- HURTREZ-BOUSSÈS S, PERRET P, RENAUD F, BLONDEL J. 1997. High blowfly parasitic loads affect breeding success in a Mediterranean population of blue tits. *Oecologia* **112**: 514–517.

- ILMONEN P, HAKKARAINEN H, KOIVUNEN V, KORPIMÄKI E, MULLIE A, SHUTLER D. 1999. Parental effort and blood parasitism in Tengmalm's owl: effects of natural and experimental variation in food abundance. *Oikos* **86**: 79–86.
- ILMONEN P, TAARNA T, HASSELQUIST D. 2000. Experimentally activated immune defence in female pied flycatchers results in reduced breeding success. *Proceedings of the Royal Society of London B* **267**: 665–670.
- ISOBE T, SUZUKI K. 1987. Immunoglobulin M and G immune response to *Leucocytozoon caulleryi* in chickens. *Japanese Journal of Veterinary Science* **49**: 333–339.
- KIRKPATRICK CE, SUTHERS HB. 1988. Epizootiology of blood parasite infections in passerine birds from Central New Jersey. *Canadian Journal of Zoology* **66**: 2374–2382.
- KREBS RA, LOESCHCKE V. 1994a. Effects of exposure to short-term heat stress on fitness components in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology* **7**: 39–49.
- KREBS RA, LOESCHCKE V. 1994b. Costs and benefits of activation of the heat-shock response in *Drosophila melanogaster*. *Functional Ecology* **8**: 730–737.
- KROEMER G. 2001. Heat shock protein 70 neutralizes apoptosis-inducing factor. *The Scientific World* **1**: 590–592.
- LOYE JE, ZUK M. 1991. *Bird-parasite interactions. Ecology, evolution and behaviour*. Oxford University Press, Oxford.
- LYASHKO VN, VIKULOVA VK, CHERNICOV VG, IVANOV VI, ULMASOV KH A, ZATSEPINA OG, EVGEN'EV MB. 1994. Comparison of the heat shock response in ethnically and ecologically different human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **91**: 12492–12495.
- MARIÑO F, WINTERS C, MORGAN AJ. 1999. Heat shock protein (hsp60, hsp70, hsp90) expression in earthworms exposed to metal stressors in the field and laboratory. *Pedobiologia* **43**: 615–624.
- MARTÍNEZ J, PÉREZ SERRANO J, BERNADINA WE, RODRÍGUEZ-CAABEIRO F. 1999a. In vitro stress response to elevated temperature, hydrogen peroxide and mebendazole in *Trichinella spiralis* muscle larvae. *International Journal of Parasitology* **29**: 1457–1464.
- MARTÍNEZ J, PÉREZ SERRANO J, BERNADINA WE, RODRÍGUEZ-CAABEIRO F. 1999b. Influence of parasitization by *Trichinella spiralis* on the levels of heat shock proteins in rat liver and muscle. *Parasitology* **118**: 201–209.
- MARTÍNEZ J, PÉREZ SERRANO J, BERNADINA WE, RODRÍGUEZ-CAABEIRO F. 2001. Stress response to cold in *Trichinella* species. *Cryobiology* **43**: 293–302.
- MARTÍNEZ J, TOMÁS G, MERINO S, ARRIERO E, MORENO J. 2003. Detection of serum immunoglobulins in wild birds by direct ELISA: a methodological study to validate the technique in different species using anti-chicken antibodies. *Functional Ecology* **17**: 700–706.
- MASSEY JG, GRACZYK TG, CRANFIELD MR. 1996. Characteristics of naturally acquired *Plasmodium relictum capistranoae* infections in naive hawaiian crows (*Corvus hawaiiensis*) in Hawaii. *Journal of Parasitology* **82**: 182–185.
- MATZINGER P, FUCHS EJ. 1996. Beyond self and non-self: Immunity is a conversation, not a war. *Journal of NIH Research* **8**: 35–39.
- MERINO S, MARTÍNEZ J, BARBOSA A, MØLLER AP, DE LOPE F, PÉREZ J, RODRÍGUEZ-CAABEIRO F. 1998. Increase in a heat-shock protein from blood cells in response of

- nestling house martins (*Delichon urbica*) to parasitism: an experimental approach. *Oecologia* **116**: 343–347.
- MERINO S, MARTÍNEZ J, MØLLER AP, BARBOSA A, DE LOPE F, RODRÍGUEZ-CAABEIRO F. 2002. Blood stress protein levels in relation to sex and parasitism of barn swallows (*Hirundo rustica*). *Écoscience* **9**: 300–305.
- MERINO S, MARTÍNEZ J, MØLLER AP, SANABRIA L, DE LOPE F, PÉREZ-SERRANO J, RODRÍGUEZ-CAABEIRO F. 1999. Phytohemagglutinin injection assay and physiological stress in nestling house martins. *Animal Behaviour* **58**: 219–222.
- MERINO S, MORENO J, SANZ JJ, ARRIERO E. 2000. Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). *Proceedings of the Royal Society of London B* **267**: 2507–2510.
- MERINO S, POTTI J. 1995a. High prevalence of hematozoa in nestlings of a passerine species, the Pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*). *Auk* **112**: 1041–1043.
- MERINO S, POTTI J. 1995b. Mites and blowflies decrease growth and survival in nestling pied flycatchers. *Oikos* **73**: 95–103.
- MERINO S, POTTI J, FARGALLO JA. 1997. Blood parasites of some passerine birds from central Spain. *Journal of Wildlife Diseases* **33**: 638–641.
- MORENO J, MERINO S, MARTÍNEZ J, SANZ JJ, ARRIERO E. 2002. Heterophil/lymphocyte ratios and heat-shock protein levels are related to growth in nestling birds. *Écoscience* **9**: 434–439.
- MORIMOTO RI. 1991. Heat shock: The role of transient inducible responses in cell damage, transformation, and differentiation. *Cancer Cells* **3**: 295–301.
- MOSELEY P. 2000. Stress proteins and the immune response. *Immunopharmacology* **48**: 299–302.
- NORRIS K, EVANS MR. 2000. Ecological immunology: life history trade-offs and immune defense in birds. *Behavioral Ecology* **11**: 19–26.
- OTS I, HÖRAK P. 1998. Health impact of blood parasites in breeding great tits. *Oecologia* **116**: 441–448.
- RICHNER H, TRIPET F. 1999. Ectoparasitism and the tradeoff between current and future reproduction. *Oikos* **86**: 535–538.
- ROITT I, BROSTOFF J, MALE D. 1996. *Immunology*. 4th ed. Mosby, London.
- SANZ JJ. 1995. Environmental restrictions on reproduction in the Pied Flycatcher *Ficedula hypoleuca*. *Ardea* **83**: 421–430.
- SCHMID-HEMPEL P. 2003. Variation in immune defence as a question of evolutionary ecology. *Proceedings of the Royal Society of London B* **270**: 357–366.
- SCHMID-HEMPEL P, EBERT D. 2003. On the evolutionary ecology of specific immune defence. *Trends in Ecology and Evolution* **18**: 27–32.
- SHELDON BC, VERHULST S. 1996. Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends in Ecology and Evolution* **11**: 317–321.
- SILBERMANN R, TATAR M. 2000. Reproductive costs of heat shock protein in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Evolution* **54**: 2038–2045.
- SØRENSEN JG, KRISTENSEN TN, LOESCHCKE V. 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters* **6**: 1025–1037.
- STATSOFT INC. 2001: *STATISTICA* (data analysis software system), version 6. Available on the web at <http://www.statsoft.com>.

- SVENSSON E, RABERG L, KOCH C, HASSELQUIST D. 1998. Energetic stress, immunosuppression and the costs of an antibody response. *Functional Ecology* **12**: 912–919.
- TOMÁS G, MARTÍNEZ J, MERINO S. 2004. Collection and analysis of blood samples to detect stress proteins in wild birds. *Journal of Field Ornithology* **75**: 281–287
- TOWBIN H, STAEBELIN T, GORDON J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **76**: 4350–4354.
- ZATSEPINA OG, ULMASOV KH A, BERESTEN SF, MOLODTSOV VB, RYBTSOV SA, EVGEN'EV MB. 2000. Thermotolerant desert lizards characteristically differ in terms of heat-shock system regulation. *Journal of Experimental Biology* **203**: 1017–1025.
- ZUK M, BRYANT MJ, KOLLURU GR, MIRMOVITCH V. 1996. Trade-offs in parasitology, evolution and behaviour. *Parasitology Today* **12**: 46–47.

Ajuste de los niveles de inmunoglobulinas y el esfuerzo reproductor en relación a la infección por parásitos sanguíneos: un experimento de medicación con un paseriforme silvestre

GUSTAVO TOMÁS, SANTIAGO MERINO, JUAN MORENO, JUDITH MORALES, JOSUÉ MARTÍNEZ-DE LA PUENTE

RESUMEN

El propósito de este trabajo es estudiar el compromiso postulado entre esfuerzo reproductor e inmunidad manipulando experimentalmente las parasitosis sanguíneas en un ave silvestre y evaluando los cambios producidos en función inmune y esfuerzo parental. Al inicio de la fase de alimentación de los polluelos, se medicó a las hembras de herrerillo común *Parus caeruleus* L. con una dosis alta (DA) o baja (DB) del compuesto antimalárico primaquina, o con solución salina (control), a fin de causar una reducción gradual en las parasitosis sanguíneas en función del tratamiento. Se observó que los niveles de inmunoglobulinas disminuyeron a lo largo del experimento en las hembras del grupo DA, mientras que aumentaron en las controles. Sólo las hembras del grupo DA aumentaron significativamente su tasa de cebas a los polluelos. La tasa de cebas totales (macho + hembra) aumentó significativamente en los grupos DA y DB, pero no en el grupo control. Los polluelos criados por hembras control sufrieron una mayor infestación por ectoparásitos. Se concluye que la medicación y la reducción asociada de los niveles de inmunoglobulinas permiten a las hembras destinar más recursos hacia el cuidado parental, resultando en beneficios para los polluelos. Este estudio apoya la existencia

del compromiso entre esfuerzo reproductor y defensa inmune en un sistema hospedador-parásito natural, y ayuda a entender el significado evolutivo de la conexión entre el parasitismo, la respuesta inmune, las decisiones de estrategias vitales y la eficacia biológica.

INTRODUCCIÓN

El parasitismo está siendo gradualmente aceptado como una de las mayores fuerzas de selección que afectan a las estrategias vitales de las aves (Price 1980; Loye y Zuk 1991; Clayton y Moore 1997). Las investigaciones centradas en los mecanismos fisiológicos que subyacen a las estrategias de los parásitos y los hospedadores se han revelado como una herramienta esencial en los campos de la ecología evolutiva y comportamental (Sheldon y Verhulst 1996; Wakelin 1997; Zuk y Stoehr 2002). Las respuestas inmunológicas de los hospedadores frente a los parásitos han sido estudiadas tanto en aves domésticas (Isobe y Suzuki 1987; Atkinson et al. 1988) como en poblaciones naturales de aves (Ots y Hõrak 1998; Garvin et al. 2003; Morales et al. 2004; Tomás et al. 2005; Capítulo 4). En estudios de diversos sistemas hospedador-parásito se han encontrado relaciones de la infección

por parásitos sanguíneos con los perfiles leucocitarios (p.ej. Graczyk et al. 1994; Massey et al. 1996; Ots y Hõrak 1998), las proteínas totales del plasma (p.ej. Ots y Hõrak 1998; Garvin et al. 2003) o los niveles de inmunoglobulinas (p.ej. Ots y Hõrak 1998; Atkinson et al. 2001; Morales et al. 2004; Tomás et al. 2005, Capítulo 4).

La así llamada inmunología ecológica ha abierto un fascinante campo de investigación, donde la mayor parte del trabajo probablemente aún esté por hacer (Sheldon y Verhulst 1996; Owens y Wilson 1999; Adamo 2004). Las correlaciones entre algunas medidas de capacidad inmune y medidas de infección o de rasgos relacionados con la eficacia biológica tienen difícil interpretación, ya que pueden reflejar bien inmunocompetencia o bien presencia de infección (Sheldon y Verhulst 1996; Norris y Evans 2000; Zuk y Stoehr 2002). Otro problema señalado con frecuencia tiene que ver con la complejidad inherente del sistema

inmune, cuyas diferentes ramas pueden actuar de modo distinto o incluso contrario en respuesta a un mismo patógeno (Norris y Evans 2000; Mallon et al. 2003; Schmid-Hempel 2003; Adamo 2004). Por consiguiente, es necesario un mayor número de estudios empíricos en poblaciones naturales para comprender mejor el papel que los parásitos juegan en la modulación de las estrategias vitales de las aves (Sheldon y Verhulst 1996; Norris y Evans 2000; Zuk y Stoehr 2002; Adamo 2004).

Se han documentado con frecuencia ajustes en la inversión reproductora en función de la infección por parásitos sanguíneos (p.ej. Korpimäki et al. 1993; Merino et al. 2000; Sanz et al. 2001; Marzal et al. 2005). Además, diversas medidas de éxito reproductor o condición post-reproductora se han encontrado afectadas negativamente por las infecciones parasitarias o las respuestas fisiológicas frente a ellas en varios estudios experimentales (Merino et al. 2000; Marzal et al. 2005; Tomás et al. 2005, Capítulo 4).

El compromiso postulado entre esfuerzo reproductor e inmunidad (Sheldon y Verhulst 1996) puede ayudar a explicar los costes asociados al parasitismo. Esta cuestión ha sido frecuentemente estudiada manipulando

el esfuerzo reproductor (p.ej. Nordling et al. 1998; Moreno et al. 1999; Saino et al. 2002a) o bien los componentes celular o humoral de la respuesta inmune (p.ej. Williams et al. 1999; Ilmonen et al. 2000; Råberg et al. 2000). En este último caso, se simula la infección de un patógeno inyectando a las aves un antígeno (fitohemaglutinina, eritrocitos de cordero, vacuna contra la difteria y el tétanos) o bien un patógeno inerte (p.ej. virus de la enfermedad de Newcastle). En el presente estudio, manipulamos experimentalmente el nivel de infección de parásitos sanguíneos reales que infectan comúnmente a las aves en la naturaleza, una aproximación muy útil y poco valorada que permite evaluar cambios significativos en aspectos de la inmunidad y los cambios asociados en esfuerzo reproductor (Sheldon y Verhulst 1996; Owens y Wilson 1999; Norris y Evans 2000; Zuk y Stoehr 2002).

Parece razonable predecir que los costes del parasitismo y/o de las respuestas fisiológicas asociadas deberían mostrar un ajuste gradual en función de la intensidad de infección, la virulencia de los parásitos, el estado de salud de los hospedadores u otras presiones ambientales. En el presente

estudio, se medicó a dos grupos de hembras de herrerillo común con dos dosis diferentes de primaquina, un compuesto antimalárico cuya eficacia para reducir las parasitosis sanguíneas ya ha sido previamente demostrada (Merino et al. 2000, 2004; Tomás et al. 2005; Capítulo 4). Un tercer grupo de hembras se mantuvo como control. Se cuantificó la variación en los niveles de inmunoglobulinas a partir de muestras de sangre. Además, se midieron la variación en las tasas de cebas a los polluelos y el rendimiento reproductor final en función del tratamiento experimental. Se predice una reducción gradual de la parasitosis sanguínea en las hembras de herrerillo común, y una reducción paralela asociada de los niveles de inmunoglobulinas totales. Se predice además un cambio en la tasa de cebas de las hembras acorde con el tratamiento experimental, de tal modo que las hembras deberían ser capaces de invertir más esfuerzo cuanto más se reduzca su parasitosis y su respuesta inmune. En consecuencia, se esperan diferencias en alguna medida del rendimiento reproductor entre tratamientos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población de estudio

El estudio se llevó a cabo durante la estación reproductora de 2002 en un bosque caducifolio de roble melojo (*Quercus pyrenaica* Willd.) situado a 1200 m de altitud en Valsain, Segovia (40°54'N, 4°01'O). La población de herrerillo común que cría en cajas-nido en esta zona ha sido estudiada desde 1991 (p.ej. Sanz 2002). Cada año, las cajas-nido son revisadas periódicamente con el fin de determinar los parámetros reproductores básicos.

Tratamiento experimental

Los nidos, ajustados por tamaño y fecha de puesta (día 1 = 1 de abril), se asignaron aleatoriamente a uno de los siguientes tres tratamientos experimentales. Se capturó a las hembras en las cajas-nido a los 3 días de edad de los polluelos (día de eclosión = día 0) y se les inyectó por vía subcutánea 0.1 mg de primaquina (Sigma, St Louis, MO, USA) diluida en 0.1 ml de solución salina (medicadas a dosis alta, DA), o alternativamente, se les inyectó 0.05 mg de primaquina

diluida en 0.1 ml de solución salina (medicadas a dosis baja, DB). Las hembras de un tercer grupo de nidos fueron inyectadas con el mismo volumen de solución salina como controles. La primaquina es un compuesto químico antimalárico que ya ha sido empleado con éxito para reducir las parasitosis sanguíneas en la especie estudiada (Merino et al. 2000, 2004; Tomás et al. 2005; Capítulo 4). Inmediatamente tras la captura y antes de la inyección, obtuvimos una muestra de sangre de la vena braquial con la ayuda de un capilar heparinizado (muestra inicial). En esta captura, se pesó a las hembras con una balanza (Baar, Suiza) de precisión 0.05 g y se les midió el tarso con un calibre digital de precisión 0.01 mm. Se identificó a las hembras con anillas metálicas numeradas cuando fue necesario. Para distinguir a los adultos en las filmaciones (véase más abajo), se anilló a las hembras con anillas de colores o se les pintó el vientre con rotulador rojo indeleble.

A los 13 días de edad de los polluelos, se recapturó a las hembras, se les pesó y se obtuvo una segunda muestra de sangre (muestra final) para determinar los niveles de inmunoglobulinas y las parasitosis tras el tratamiento. Se midió el tarso de los

polluelos con un calibre digital y se les pesó a los 13 días de edad. Como medida de condición corporal de la hembra y de los polluelos, hemos empleado el cociente peso/longitud del tarso. Las tasas de cebas a los polluelos fueron registradas filmando las cajas-nido durante una hora con una cámara de vídeo dispuesta a varios metros de distancia, a los 4 y 12 días de edad de los polluelos. Algunas filmaciones en las que uno de los adultos no fue observado cebando a los polluelos fueron descartadas. Las tasas de cebas de la hembra y las cebas totales (macho + hembra) no estuvieron relacionadas con la hora de filmación ($p > 0.30$ en todos los casos). Esto fue cierto tanto para las tasas de cebas iniciales como para las finales. Después de que los polluelos abandonaran el nido, éste fue desmenuzado sobre una hoja de papel blanca para contar las pupas del ectoparásito *Protocalliphora azurea* (Fallén), de acuerdo con Merino y Potti (1995a).

Análisis de las muestras de sangre

Se extendió una gota de sangre sobre un portaobjetos para la detección de parásitos sanguíneos y el resto de la

sangre fue centrifugada (2000 x g, 5 min) con una centrífuga portátil (Labnet, Mini Centrifuge, Cat. N° 1201-220V, Woodbridge, NJ, USA). Se separó el suero y se mantuvo en una nevera portátil hasta ser congelado para su análisis posterior. Los frotis sanguíneos fueron dejados secar al aire inmediatamente y después fijados con etanol (96 %) y teñidos con Giemsa (1/10 v/v) durante 45 minutos. Una de las dos mitades simétricas de cada frotis fue examinada al microscopio a 200 aumentos en busca de parásitos sanguíneos grandes como *Trypanosoma*, *Leucocytozoon* o microfilaria, mientras que los parásitos intracelulares más pequeños como *Haemoproteus* o *Hepatozoon* fueron detectados en la otra mitad del frotis a 1000 aumentos (Merino y Potti 1995b; Merino et al. 1997). La intensidad de infección por *Haemoproteus* se estimó en base al número de células infectadas por cada 2000 eritrocitos (Godfrey et al. 1987). Para *Trypanosoma*, *Leucocytozoon* y *Hepatozoon* se usaron índices de presencia / ausencia debido a sus bajas intensidades de infección.

Los niveles de inmunoglobulinas se cuantificaron a partir de las muestras de plasma mediante ELISA directo, usando un anticuerpo anti-gallina conjugado con peroxidasa (Sigma, St.

Louis, MO, USA). Las absorbancias se midieron en un espectrofotómetro a $\lambda = 405$ nm. Los detalles y la validación de este método han sido descritos por Martínez et al. (2003, Capítulo 3).

Análisis estadísticos

Se empleó estadística paramétrica cuando las variables cumplieron sus requerimientos, y cuando no fue el caso, se emplearon tests no paramétricos. El éxito de volantones se transformó con el arcoseno de la raíz cuadrada antes de usar tests paramétricos. La intensidad de infección por *Haemoproteus* y el número de pupas de *Protocalliphora* se transformaron logarítmicamente. Se llevaron a cabo ANOVAs de medidas repetidas con el tratamiento como factor para explorar los cambios desde la muestra inicial a la final en las variables de los adultos. Se examinó específicamente la interacción entre el tratamiento y el tiempo como factor de medidas repetidas. Todos los tests fueron de dos colas. Los valores presentados son medias \pm error estándar.

RESULTADOS

Dos nidos (uno DA y uno control) que compartieron un macho poligínico fueron descartados de los análisis. Por consiguiente, un total de 47 nidos fueron incluidos en el estudio (17 medicados a DB, 15 medicados a DA y 15 controles). Los tamaños de muestra difieren entre los distintos análisis debido a que en un caso la baja calidad de un frotis sanguíneo no permitió su examen, en dos casos el volumen de muestra sanguínea fue insuficiente para el análisis de las inmunoglobulinas y en dos casos las hembras escaparon antes de que se obtuviera su peso corporal. Las tasas de cebas inicial y final pudieron ser registradas para 27 nidos (11 del grupo DB, 7 del grupo DA y 9 del grupo control). Sin embargo, en varios casos no fue posible identificar el sexo de los adultos en alguno de los dos vídeos, y por tanto, al analizar de forma separada las tasas de cebas de las hembras, los tamaños muestrales se redujeron a 9 nidos para el grupo DB, 5 para el grupo DA y 4 para el grupo control.

Tratamiento e infección

Los nidos asignados a los distintos tratamientos no difirieron con respecto a su fecha de puesta o eclosión, tamaño de puesta, o número de polluelos al principio del experimento ($p > 0.05$ en todos los casos). El 89.1 % de las hembras estuvieron infectadas por parásitos sanguíneos al principio del experimento, siendo *Haemoproteus majoris* (Laveran) el más frecuente (76.1 %), seguido por *Trypanosoma avium* (Danilewsky) (39.1 %), *Leucocytozoon majoris* (Laveran) (30.4 %) y *Hepatozoon parvus* (Bennett y Peirce) (21.7 %). Sólo una hembra apareció infectada por microfilarias.

No hubo diferencias iniciales entre tratamientos en la intensidad de infección de las hembras por *Haemoproteus* ni en las prevalencias de *Leucocytozoon*, *Trypanosoma* o *Hepatozoon* ($p > 0.05$ en todos los casos).

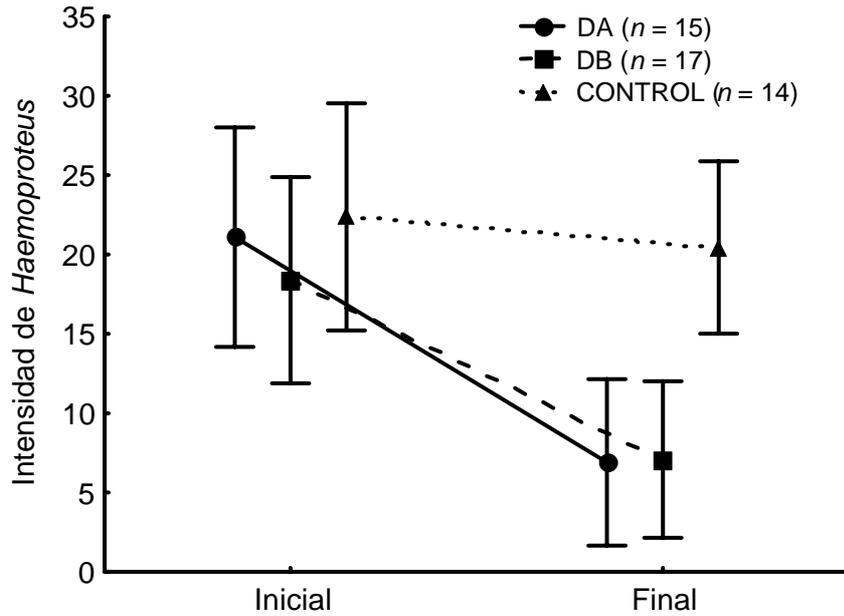


Fig. 1. Cambios en la intensidad de infección por *Haemoproteus* en hembras de herrillito asignadas a diferentes tratamientos experimentales. Las barras indican el error estándar.

Como se esperaba, la intensidad de infección por *Haemoproteus* disminuyó diferencialmente entre tratamientos ($F_{2,43} = 4.67$, $p = 0.015$, Fig. 1), de tal modo que las hembras DA y DB experimentaron una reducción en su nivel de infección, y no así las hembras control. No hubo diferencias entre tratamientos en la prevalencia final de infección por *Leucocytozoon* o *Trypanosoma* (ambas $p > 0.05$). Sin embargo, la prevalencia final de *Hepatozoon* fue significativamente menor en las hembras DA en comparación con las hembras control ($\chi^2 = 4.62$, $p = 0.032$).

Nivel de inmunoglobulinas

Antes del experimento, las hembras asignadas a diferentes tratamientos no diferían en sus niveles de inmunoglobulinas ($p > 0.05$). Sin embargo, encontramos una interacción significativa entre el tratamiento y el tiempo sobre los niveles de inmunoglobulinas de las hembras ($F_{2,41} = 3.54$, $p = 0.038$, Fig. 2), de tal modo que los niveles de inmunoglobulinas disminuyeron a lo largo del experimento en las hembras DA y aumentaron en las hembras control, mientras que las hembras DB mantuvieron niveles de

inmunoglobulinas similares durante el experimento.

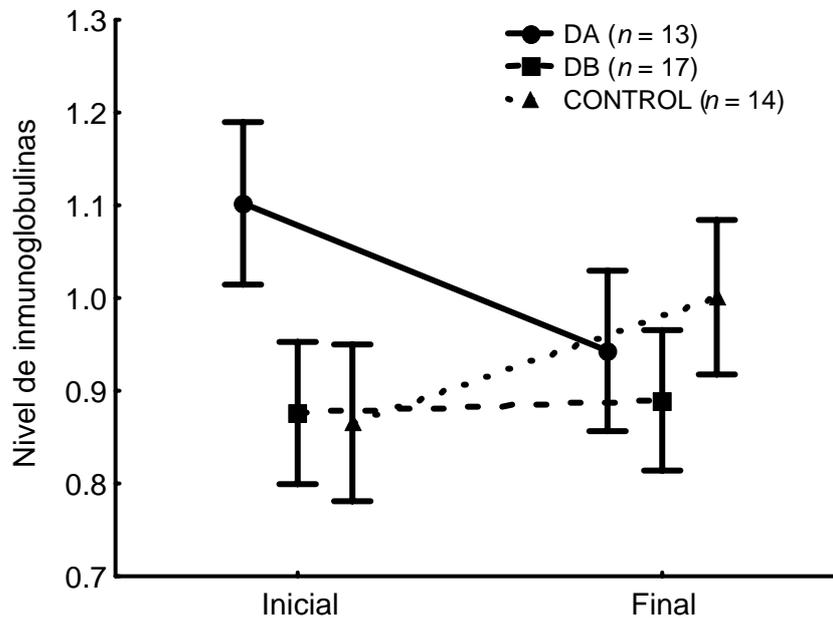


Fig. 2. Cambios en los niveles de inmunoglobulinas en hembras de herrerillo asignadas a diferentes tratamientos experimentales. Las barras indican el error estándar.

Condición de la hembra y tasas de cebas

La submuestra de nidos para los que se pudo registrar la tasa de cebas no difería en fecha de puesta o eclosión, tamaño de puesta o número de polluelos al inicio del experimento ($p > 0.10$ en todos los casos).

La condición corporal de las hembras en la primera captura no difería entre tratamientos ($p > 0.45$), ni tampoco las cebas iniciales de las hembras ni las cebas totales (macho + hembra) ($p > 0.05$). La condición corporal de las hembras de herrerillo

disminuyó a lo largo del período experimental ($F_{1,42} = 78.10$, $p < 0.001$), pero no de forma diferente entre tratamientos ($F_{2,42} = 1.38$, $p = 0.262$). La tasa de cebas totales aumentó significativamente durante el experimento ($F_{1,24} = 20.62$, $p < 0.001$), y diferencialmente entre tratamientos (interacción tiempo x tratamiento: $F_{2,24} = 3.93$, $p = 0.033$, Fig. 3). La tasa de cebas totales aumentó significativamente durante el experimento en los grupos DB y DA, pero no en el grupo control. La tasa final de cebas totales no difirió entre tratamientos ($p > 0.40$).

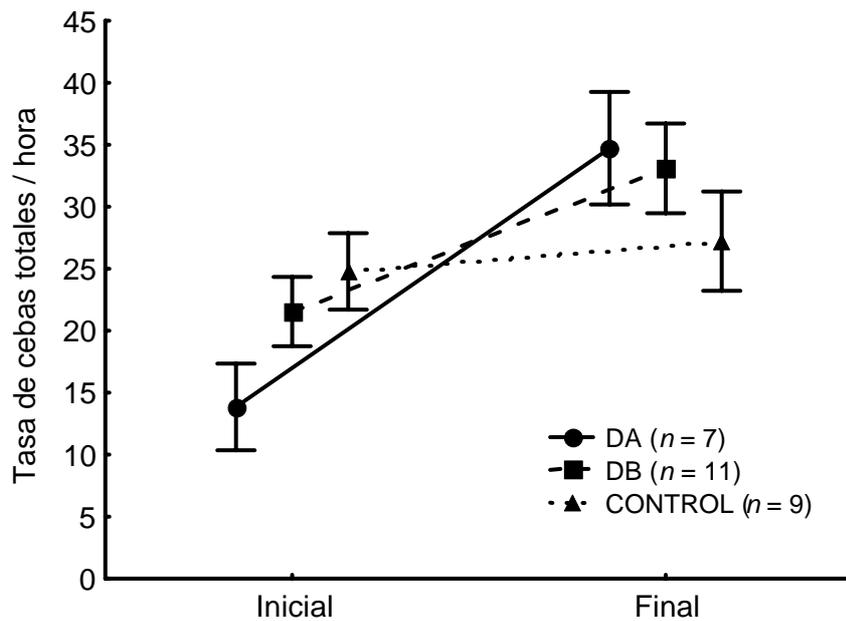


Fig. 3. Cambios en las tasas de cebras totales (macho + hembra) en relación al tratamiento experimental. Las barras indican el error estándar.

Se obtuvo un resultado similar al analizar las tasas de cebras de las hembras: encontramos una interacción significativa entre el tiempo y el tratamiento ($F_{2,14} = 4.45$, $p = 0.032$) tras controlar por el número de pupas de *Protocalliphora* presentes en el nido. Las hembras del grupo DA aumentaron significativamente sus tasas de cebras a lo largo del experimento, y no así las hembras de los grupos DB y control. Además, apareció una interacción marginalmente significativa entre el tiempo y el número de pupas de *Protocalliphora* ($F_{1,14} = 4.16$, $p = 0.061$), de modo que las hembras tendieron a incrementar más su

esfuerzo cuanto más abundantes fueron las *Protocalliphora*. No obstante, las tasas de cebras finales de las hembras no difirieron entre tratamientos ($p > 0.50$). Los resultados de las tasas de cebras no cambiaron cuando se incluyó el número de polluelos en los análisis.

Efectos sobre los polluelos

No hubo diferencias significativas entre grupos en el éxito de volantones ($F_{2,44} = 0.93$, $p = 0.401$) o la condición de los polluelos a los 13 días de edad ($F_{2,44} = 1.34$, $p = 0.273$). Sin embargo, los nidos de las hembras control contuvieron más larvas de *Protocalliphora* que los nidos de las

hembras DA o DB, tras controlar por el número de polluelos presentes en el nido a los 13 días de edad (tratamiento: $F_{2,43} = 3.31$, $p = 0.046$, Fig. 4; número de polluelos: $F_{1,43} = 6.76$, $p = 0.013$). El

número de larvas de *Protocalliphora* estuvo positivamente relacionado con el número de polluelos en el nido ($r = 0.35$; $p = 0.016$).

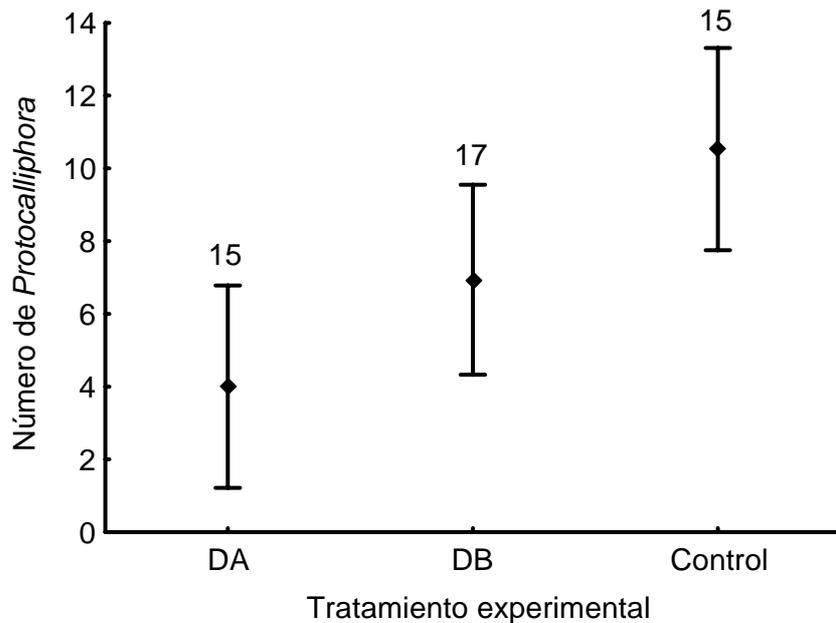


Fig. 4. Abundancia de *Protocalliphora* en los nidos de herrerillo en relación al tratamiento experimental. Las barras indican el error estándar. Los tamaños de muestra se indican sobre las barras.

DISCUSIÓN

Sheldon y Verhulst (1996) señalaron que para demostrar el papel del sistema inmune como mediador de los costes reproductivos se requeriría que la función inmunitaria fuese manipulada experimentalmente. Con este fin, recalcaron que se podría medicar a los hospedadores para controlar las infecciones y de este modo reducir su respuesta inmunitaria. Hasta donde

sabemos, sólo un estudio (Tomás et al. 2005, Capítulo 4) ha llevado a cabo este experimento y medido algún aspecto del sistema inmune en aves infectadas por parásitos sanguíneos en condiciones naturales. Hemos evaluado un aspecto del sistema inmune cuantificando los niveles totales de inmunoglobulinas, una medida empleada actualmente en numerosos estudios ecológicos (p.ej. Ots y Hõrak 1998; Johnsen y Zuk 1999; Szép y

Møller 1999; Morales et al. 2004; Tomás et al. 2005, Capítulo 4). Se ha encontrado una asociación entre las infecciones por parásitos sanguíneos y los niveles de inmunoglobulinas (Isobe y Suzuki 1987; Gustafsson et al. 1994; Wakelin y Apanius 1997; Ots y Hōrak 1998; Roitt et al. 2001; Morales et al. 2004; Tomás et al. 2005, Capítulo 4). Si bien no exento de controversia, los niveles de inmunoglobulinas podrían estar relacionados de alguna manera con la capacidad de los individuos de montar una respuesta inmunitaria (Gustafsson et al. 1994). Por ejemplo, se ha demostrado que los niveles totales de inmunoglobulinas están correlacionados con la respuesta inmune celular a la prueba de la fitohemaglutinina (Morales et al. 2005).

La medicación experimental con primaquina tuvo éxito reduciendo la intensidad de infección por *Haemoproteus majoris* en las hembras de herrerillo de los grupos DA y DB en comparación con las hembras control, y reduciendo la prevalencia de infección por *Hepatozoon parvus* en el grupo DA en comparación con el grupo control. Sin embargo, no tuvo efecto sobre la prevalencia de *Leucocytozoon*, a diferencia de Merino et al. (2000) y Tomás et al. (2005, Capítulo 4), quizá

porque la prevalencia de este parásito fue menor en nuestro estudio. Una mayor prevalencia de infección por *Hepatozoon* en este estudio permitió detectar una reducción asociada a la medicación con primaquina. Así, podemos asumir que el tratamiento experimental tuvo el efecto deseado, causando una reducción gradual de la parasitosis sanguínea de las hembras de herrerillo en función de la dosis de primaquina administrada.

Hemos mostrado que los niveles de inmunoglobulinas de las hembras cambiaron diferencialmente a lo largo del experimento en función del tratamiento que recibieron las hembras. Podemos asumir que este cambio estuvo asociado con la reducción experimental de las parasitosis sanguíneas, ya que se ha documentado previamente la relación existente entre los niveles de inmunoglobulinas y los parásitos sanguíneos (Isobe y Suzuki 1987; Ots y Hōrak 1998; Morales et al. 2004; Tomás et al. 2005, Capítulo 4). Por tanto, las hembras control necesitaron incrementar sus niveles de inmunoglobulinas, mientras que las hembras del grupo DB mostraron niveles similares durante el experimento y las hembras del grupo DA pudieron reducir sus niveles de inmunoglobulinas. Probablemente las

hembras control necesitaron aumentar sus niveles de anticuerpos en sangre para controlar la infección y minimizar así sus efectos deletéreos. Por el contrario, las hembras del grupo DA, al ser parcialmente liberadas del daño infringido por los parásitos, pudieron reducir los requerimientos energéticos dedicados a la respuesta inmunitaria (evaluada por los niveles de inmunoglobulinas), un ahorro importante ya que la expresión y mantenimiento de la respuesta inmune es costosa (Ilmonen et al. 2000; Lochmiller y Deerenberg 2000; Moret y Schmid-Hempel 2000; Råberg et al. 2000; Bonneaud et al. 2003; Hanssen et al. 2004; Martínez et al. 2004). Este compromiso puede verse particularmente acentuado en los períodos de mayor esfuerzo físico, y la reproducción de las aves es indudablemente una de las actividades más costosas que llevan a cabo durante su vida.

Probablemente, la reducción en la carga de parásitos y en los niveles de inmunoglobulinas permitió que las hembras del grupo DA aumentaran su esfuerzo durante la fase de crianza de los polluelos, algo que las hembras de los grupos DB y control no pudieron permitirse. Un mayor tamaño muestral para las cebas totales (macho +

hembra) hizo posible detectar este aumento también para el grupo DB. Si bien las tasas de cebas totales no difirieron entre grupos, hemos mostrado que el grupo control no fue capaz de incrementar su esfuerzo a lo largo del experimento. Es importante destacar que no hubo diferencias en la variación de la condición corporal de la hembra entre tratamientos. La respuesta comportamental de los individuos con altas parasitosis podría ser adaptativa si les permitiera sobrellevar la infección e incrementar sus posibilidades de supervivencia (Bonneaud et al. 2003). Se sabe que un nivel de actividad reducido ayuda a conservar energía y permite la reparación de los daños causados por la infección (Hart 1988). Este resultado concuerda con la existencia de un compromiso entre la energía destinada al esfuerzo reproductor y al control de los parásitos / inversión inmunológica (Sheldon y Verhulst 1996).

No encontramos ningún efecto directo de la parasitosis de la hembra sobre el éxito de volantones o la condición corporal de los polluelos en relación al tratamiento experimental. No obstante, demostramos la existencia de una conexión entre la carga de parásitos de la hembra y el estado de salud de los polluelos a través del nivel

de infestación por larvas de *Protocalliphora* en los nidos. Los nidos atendidos por hembras control contenían un mayor número de larvas que los atendidos por hembras de los grupos DA y DB. Las larvas de la mosca *Protocalliphora azurea* (Diptera: Calliphoridae) son ectoparásitos hematófagos comunes en las aves de la región Holártica (Bennett y Whitworth 1992). En nuestra población de estudio, las moscas del género *Protocalliphora* son probablemente los ectoparásitos más perjudiciales para los polluelos (Tomás et al. 2005, Capítulo 4), como ocurre en otras poblaciones de herrerillo en latitudes similares (Hurtrez-Boussès et al. 1997a). Cabe la posibilidad de que otras medidas del estado de salud de los polluelos no evaluadas en este estudio sí fueran afectadas por el tratamiento, ya que se sabe que este ectoparásito puede afectar de forma severa a la condición corporal de los polluelos de herrerillo común y presumiblemente a su supervivencia tras abandonar el nido (Hurtrez-Boussès et al. 1997a,b, 1998). La diferencia observada entre tratamientos puede haber estado mediada por la inversión parental en las tasas de cebas como causante de diferencias en la susceptibilidad de los polluelos a la

infestación por ectoparásitos (Hudson y Dobson 1997) o por diferencias en el tiempo destinado por los padres a actividades de saneamiento del nido (Hurtrez-Boussès et al. 2000). De manera análoga, se ha documentado que la inversión materna afecta a la prevalencia de tripanosomas en los polluelos de otro paseriforme que anida en cavidades (Merino et al. 1996). Esto puede ser debido a que los polluelos peor alimentados sean menos capaces de montar una respuesta inmunitaria eficiente (p.ej. Merino et al. 1996; Hudson y Dobson 1997; Saino et al. 1997; Saino et al. 2002b), y el mismo razonamiento podría aplicarse a nuestros resultados: un aumento en las tasas de cebas de las hembras permitiría que los polluelos adquiriesen unas defensas mejores. De hecho, el cambio en la intensidad de infección por *Haemoproteus* (intensidad final - intensidad inicial), el parásito más frecuente en las hembras, se relacionó negativamente y de forma significativa con la condición de los polluelos ($r = -0.44$, $p = 0.002$) y de forma positiva y marginalmente significativa con el número de pupas de *Protocalliphora* en el nido ($r = 0.25$, $p = 0.088$). Esto apoya la idea de que la parasitosis de la hembra tiene efectos negativos sobre la descendencia, lo que concuerda con

otros estudios previos (Merino et al. 2000; Tomás et al. 2005, Capítulo 4).

En resumen, hemos demostrado por vez primera que la reducción experimental de las parasitosis sanguíneas permite a los herrerillos ahorrar recursos destinados a la función inmunitaria. Ambos hechos, probablemente de forma conjunta, permiten a las hembras asignar más recursos hacia el esfuerzo reproductor, lo que redundaría en beneficios para los polluelos. El compromiso entre esfuerzo reproductor y defensa inmunitaria (Sheldon y Verhulst 1996) es apoyado en un sistema hospedador - parásito real. Creemos que los resultados presentados en este estudio ayudan a entender el significado evolutivo de la conexión entre el parasitismo, la defensa inmunitaria, las decisiones de estrategias vitales y la eficacia biológica (Norris y Evans 2000). La manipulación experimental conjunta de la carga de parásitos sanguíneos y la respuesta inmunitaria

en condiciones naturales (ésta última idealmente estimulando a las aves con aislados del mismo parásito inerte), podría ayudar a separar los costes asociados al daño causado por el parásito de los costes de activar una respuesta inmune contra él en un contexto ecológico realista.

AGRADECIMIENTOS

Javier Donés (Montes de Valsain) concedió los permisos necesarios para trabajar en el área de estudio, mientras que la Junta de Castilla y León autorizó el anillamiento y la manipulación de las aves. Este estudio se financió con los proyectos BOS2000-1125 y BOS2003-05724 del Ministerio de Ciencia y Tecnología (SM) y BOS2001-0587 (J. Moreno). Agradecemos a Tonantzin Calvo, László Z. Garamszegi, José Llama, Javier Martínez e Inma Nogueras por su ayuda. J. Morales disfrutó de una beca FPI del Ministerio de Ciencia y Tecnología. GT disfrutó de una beca FPI de la Comunidad de Madrid y parcialmente de una beca de alojamiento en la Residencia de Estudiantes del Ayuntamiento de Madrid. Este estudio es una contribución a la investigación desarrollada en la estación de campo "El Ventorrillo".

REFERENCIAS

- ADAMO SA. 2004. How should behavioural ecologists interpret measurements of immunity? *Animal Behaviour* **68**: 1443–1449.
- ATKINSON CT, DUSEK RJ, LEASE J. 2001. Serological responses and immunity to superinfection with avian malaria in experimentally-infected hawaii amakihi. *Journal of Wildlife Diseases* **37**: 20–27.

- ATKINSON CT, FORRESTER DJ, GREINER EC. 1988. Pathogenicity of *Haemoproteus meleagridis* (Haemosporina, Haemoproteidae) in experimentally infected domestic turkeys. *Journal of Parasitology* **74**: 228–239.
- BENNETT GF, WHITWORTH TL. 1992. Host, nest, and ecological relationships of species of *Protocalliphora* (Diptera: Calliphoridae). *Canadian Journal of Zoology* **70**: 51–61.
- BONNEAUD C, MAZUC J, GONZALEZ G, HAUSSY C, CHASTEL O, FAIVRE B, SORCI G. 2003. Assessing the cost of mounting an immune response. *American Naturalist* **161**: 367–379.
- CLAYTON DH, MOORE J. 1997. *Host-Parasite Evolution: General Principles and Avian Models*. Oxford University Press, Oxford.
- GARVIN MC, HOMER BL, GREINER EC. 2003. Pathogenicity of *Haemoproteus danilewskyi*, Kruse, 1890, in blue jays (*Cyanocitta cristata*). *Journal of Wildlife Diseases* **39**: 161–169.
- GODFREY RD JR, FEDYNICH AM, PENCE DB. 1987. Quantification of hematozoa in blood smears. *Journal of Wildlife Diseases* **23**: 558–565.
- GRACZYK TK, SHAW ML, CRANFIELD MR, BEALL FB. 1994. Hematological characteristics of avian malaria cases in African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*) during the first outdoor exposure season. *Journal of Parasitology* **80**: 302–308.
- GUSTAFSSON L, NORDLING D, ANDERSSON MS, SHELDON BC, QVARNSTRÖM A. 1994. Infectious diseases, reproductive effort and the cost of reproduction in birds. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* **346**: 323–331.
- HANSEN SA, HASSELQUIST D, FOLSTAD I, ERIKSTAD KE. 2004. Cost of immunity: immune responsiveness reduces survival in a vertebrate. *Proceedings of the Royal Society of London B* **271**: 925–930.
- HART B. 1988. Biological basis of the behaviour of sick animals. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **12**: 123–137.
- HUDSON PJ, DOBSON AP. 1997. Host-parasite processes and demographic consequences. En: Clayton DH, Moore J (eds), *Host-Parasite Evolution: General Principles and Avian Models*. Oxford University Press, Oxford, pp. 128–154.
- HURTREZ-BOUSSÈS S, BLONDEL J, PERRET P, FABREGUETTES J, RENAUD FR. 1998. Chick parasitism by blowflies affects feeding rates in a Mediterranean population of blue tits. *Ecology Letters* **1**: 17–20.
- HURTREZ-BOUSSÈS S, PERRET P, RENAUD F, BLONDEL J. 1997a. High blowfly parasitic loads affect breeding success in a Mediterranean population of blue tits. *Oecologia* **112**: 514–517.
- HURTREZ-BOUSSÈS S, BLONDEL J, PERRET P, RENAUD F. 1997b. Relationship between intensity of blowfly infestation and reproductive success in a Corsican population of Blue Tits. *Journal of Avian Biology* **28**: 267–270.
- HURTREZ-BOUSSÈS S, RENAUD F, BLONDEL J, PERRET P, GALÁN MJ. 2000. Effects of ectoparasites of young on parents' behaviour in a Mediterranean population of Blue Tits. *Journal of Avian Biology* **31**: 266–269.
- ILMONEN P, TAARNA T, HASSELQUIST D. 2000. Experimentally activated immune defence in female pied flycatchers results in reduced breeding success. *Proceedings of the Royal Society of London B* **267**: 665–670.
- ISOBE T, SUZUKI K. 1987. Immunoglobulin M and G immune response to *Leucocytozoon caulleryi* in chickens. *Japanese Journal of Veterinary Science* **49**: 333–339.

- JOHNSEN TS, ZUK M. 1999. Parasites and tradeoffs in the immune response of female red jungle fowl. *Oikos* **86**: 487–492.
- KORPIMÄKI E, HAKKARAINEN H, BENNETT GF. 1993. Blood parasites and reproductive success of tengmalm owls - detrimental effects on females but not on males. *Functional Ecology* **7**: 420–426.
- LOCHMILLER RL, DEERENBERG C. 2000. Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos* **88**: 87–98.
- LOYE JE, ZUK M. 1991. *Bird-Parasite Interactions. Ecology, Evolution and Behaviour*. Oxford University Press, Oxford.
- MALLON EB, LOOSLI R, SCHMID-HEMPEL P. 2003. Specific versus nonspecific immune response in the bumblebee, *Bombus terrestris* L. *Evolution* **57**: 1444–1447.
- MARTÍNEZ J, MERINO S, RODRÍGUEZ-CAABEIRO F. 2004. Physiological responses to *Trichinella spiralis* infection in Wistar rats: Is immune response costly? *Helminthologia* **41**: 67–71.
- MARTÍNEZ J, TOMÁS G, MERINO S, ARRIERO E, MORENO J. 2003. Detection of serum immunoglobulins in wild birds by direct ELISA: a methodological study to validate the technique in different species using anti-chicken antibodies. *Functional Ecology* **17**: 700–706.
- MARZAL A, DE LOPE F, NAVARRO C, MØLLER AP. 2005. Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. *Oecologia* **142**: 541–545.
- MASSEY JG, GRACZYK TG, CRANFIELD MR. 1996. Characteristics of naturally acquired *Plasmodium relictum capistranoae* infections in naive hawaiian crows (*Corvus hawaiiensis*) in Hawaii. *Journal of Parasitology* **82**: 182–185.
- MERINO S, MORENO J, SANZ JJ, ARRIERO E. 2000. Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). *Proceedings of the Royal Society of London B* **267**: 2507–2510.
- MERINO S, POTTI J. 1995a. Mites and blowflies decrease growth and survival in nestling pied flycatchers. *Oikos* **73**: 95–103.
- MERINO S, POTTI J. 1995b. High prevalence of hematozoa in nestlings of a passerine species, the pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*). *Auk* **112**: 1041–1043.
- MERINO S, POTTI J, FARGALLO JA. 1997. Blood parasites of some passerine birds from central Spain. *Journal of Wildlife Diseases* **33**: 638–641.
- MERINO S, POTTI J, MORENO J. 1996. Maternal effort mediates the prevalence of trypanosomes in the offspring of a passerine bird. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **93**: 5726–5730.
- MERINO S, TOMÁS G, MORENO J, SANZ JJ, ARRIERO E, FOLGUEIRA C. 2004. Changes in *Haemoproteus* sex ratios: fertility insurance or differential sex lifespan? *Proceedings of the Royal Society of London B* **271**: 1605–1609.
- MORALES J, MORENO J, MERINO S, TOMÁS G, MARTÍNEZ J, GARAMSZEGI LZ. 2004. Associations between immune parameters, parasitism, and stress in breeding pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*) females. *Canadian Journal of Zoology* **82**: 1484–1492.
- MORENO J, SANZ JJ, ARRIERO E. 1999. Reproductive effort and T-lymphocyte cell-mediated immunocompetence in female pied flycatchers *Ficedula hypoleuca*. *Proceedings of the Royal Society of London B* **266**: 1105–1109.

- MORET Y, SCHMID-HEMPEL P. 2000. Survival for immunity: the price of immune system activation for bumblebee workers. *Science* **290**: 1166–1168.
- NORDLING D, ANDERSSON M, ZOHARI S, GUSTAFSSON L. 1998. Reproductive effort reduces specific immune response and parasite resistance. *Proceedings of the Royal Society of London B* **265**: 1291–1298.
- NORRIS K, EVANS MR. 2000. Ecological immunology: life history trade-offs and immune defense in birds. *Behavioral Ecology* **11**: 19–26.
- OTS I, HÖRAK P. 1998. Health impact of blood parasites in breeding great tits. *Oecologia* **116**: 441–448.
- OWENS IPF, WILSON K. 1999. Immunocompetence: a neglected life history trait or conspicuous red herring? *Trends in Ecology and Evolution* **14**: 170–172.
- PRICE PW. 1980. *Evolutionary Biology of Parasites*. Princeton University Press, Princeton.
- RÄBERG L, NILSSON J-A, ILMONEN P, STJERNMAN M, HASSELQUIST D. 2000. The cost of an immune response: vaccination reduces parental effort. *Ecology Letters* **3**: 382–386.
- ROITT I, BROSTOFF J, MALE D. 2001. *Immunology*. Mosby-Harcourt Publishers, Londres.
- SAINO N, CALZA S, MØLLER AP. 1997. Immunocompetence of nestling barn swallows in relation to brood size and parental effort. *Journal of Animal Ecology* **66**: 827–836.
- SAINO N, INCAGLI M, MARTINELLI R, MØLLER AP. 2002a. Immune response of male barn swallows in relation to parental effort, corticosterone plasma levels, and sexual ornamentation. *Behavioral Ecology* **13**: 169–174.
- SAINO N, FERRARI RP, ROMANO M, AMBROSINI R, MØLLER AP. 2002b. Ectoparasites and reproductive trade-offs in the barn swallow (*Hirundo rustica*). *Oecologia* **133**: 139–145.
- SANZ JJ. 2002. Climate change and breeding parameters of great and blue tits throughout the Western Palearctic. *Global Change Biology* **8**: 409–422.
- SANZ JJ, ARRIERO E, MORENO J, MERINO S. 2001. Interactions between hemoparasite status and female age in the primary reproductive output of pied flycatchers. *Oecologia* **126**: 339–344.
- SCHMID-HEMPEL P. 2003. Variation in immune defence as a question of evolutionary ecology. *Proceedings of the Royal Society of London B* **270**: 357–366.
- SHELDON BC, VERHULST S. 1996. Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends in Ecology and Evolution* **11**: 317–321.
- SZÉP T, MØLLER AP. 1999. Cost of parasitism and host immune defence in the sand martin *Riparia riparia*: a role for parent-offspring conflict? *Oecologia* **119**: 9–15.
- TOMÁS G, MERINO S, MARTÍNEZ J, MORENO J, SANZ JJ. 2005. Stress protein levels and blood parasite infection in blue tits (*Parus caeruleus*): a medication field experiment. *Annales Zoologici Fennici* **42**: 45–56.
- WAKELIN D. 1997. Parasites and the immune system. Conflict or compromise? *BioScience* **47**: 32–40.
- WAKELIN D, APANIUS V. 1997. Immune defence: genetic control. En: Clayton DH, Moore J (eds). *Host-Parasite Evolution: General Principles and Avian Models*. Oxford University Press, Oxford, pp. 30–58.
- WILLIAMS TD, CHRISTIANS JK, AIKEN JJ, EVANSON M. 1999. Enhanced immune function does not depress reproductive output. *Proceedings of the Royal Society of London B* **266**: 753–757.

ZUK M, STOEHR AM. 2002. Immune defence and host life history. *American Naturalist* **160**: S9–S22.

Efecto del esfuerzo parental sobre los niveles de inmunoglobulinas y de la proteína de estrés HSP60 en hembras de herrerillo común: un experimento de manipulación del tamaño de la nidada

SANTIAGO MERINO, JUAN MORENO, GUSTAVO TOMÁS, JAVIER MARTÍNEZ, JUDITH MORALES, JOSUÉ MARTÍNEZ-DE LA PUENTE, JOSÉ LUIS OSORNO

RESUMEN

Se realizó una manipulación experimental del tamaño de la nidada en una población de herrerillo común *Parus caeruleus*, para estudiar el efecto del esfuerzo parental sobre los cambios en los niveles de la proteína de estrés HSP60 y de las inmunoglobulinas plasmáticas. Los niveles de HSP60 se redujeron en las hembras que atendieron nidadas reducidas, mientras que las hembras que atendieron nidadas aumentadas experimentaron una reducción en sus niveles de inmunoglobulinas. Además, los cambios en los niveles de ambas proteínas estuvieron relacionados positivamente. Al controlar por el cambio en los niveles de inmunoglobulinas, se detectó un incremento de la HSP60 de las hembras del grupo aumentado, presumiblemente para compensar los efectos deletéreos derivados de un esfuerzo incrementado. Así, la reducción en los niveles de inmunoglobulinas en estas hembras fue mayor de lo esperado según su asociación con los cambios en la HSP60. Ni el peso de los polluelos ni sus niveles de inmunoglobulinas y HSP60 difirieron entre los grupos. Estos resultados indican que el estrés fisiológico podría ser un factor limitante del esfuerzo parental durante la reproducción de los herrerillos.

INTRODUCCIÓN

Los paseriformes de pequeño tamaño suelen tener esperanzas de vida corta y por lo tanto disponen de un número muy limitado de oportunidades para reproducirse. Es por ello que podría haber una selección hacia maximizar su reproducción actual, sin poner en peligro la supervivencia de los padres antes de la emancipación de los polluelos (Tuomi 1990; Moreno 1993). En este escenario cabría esperar que las aves con esperanzas de vida corta estuvieran trabajando cerca de su límite de esfuerzo, diferente para cada individuo en cada estación reproductora (Peterson et al. 1990; Potti et al. 1999). En este sentido, varios estudios han mostrado las dificultades que entraña aumentar experimentalmente el esfuerzo reproductor en pequeños paseriformes (Smith et al. 1988; Moreno et al. 1995; Merino et al. 1998a; Moreno et al. 1999a), y en general, su consecuencia es que a los polluelos les va peor en nidadas aumentadas (Lindén y Møller 1989). La reticencia o la incapacidad observada con frecuencia en los padres a la hora de incrementar su nivel de esfuerzo podría estar relacionada con el riesgo que conllevaría sobrepasar unos

niveles de estrés fisiológico ya de por sí elevados para su supervivencia inmediata.

El esfuerzo parental comporta tasas metabólicas elevadas (Drent y Daan 1980), y se sabe que un nivel intenso de actividad física incrementa la producción de metabolitos como radicales libres de oxígeno, que son nocivos a nivel celular (Alonso-Alvarez et al. 2004; Wiersma et al. 2004), y en respuesta a los cuales se desencadenan una serie de respuestas en los organismos. Entre las respuestas más básicas y evolutivamente conservadas para mantener la homeostasis celular se encuentra la producción de las proteínas de choque térmico (HSPs). Estas proteínas intracelulares, hoy en día denominadas genéricamente proteínas de estrés, juegan un importante papel en el correcto ensamblaje de las proteínas de nueva síntesis necesarias en la respuesta frente a agentes estresantes externos, manteniendo por tanto el funcionamiento celular durante períodos de estrés (Morimoto 1991). Las HSPs son capaces de responder frente a infinidad de agentes estresantes, desde contaminantes a parásitos (véase revisión en Sørensen et al. 2003), y también puede incrementarse su expresión en

respuesta a requerimientos metabólicos de las células (Welch 1992; Merino et al. 2004). Se ha demostrado que los parásitos sanguíneos inducen la síntesis de proteínas de estrés (Tomás et al. 2005, Capítulo 4), hecho que ha de tenerse en cuenta al analizar la respuesta de estrés a la variación del esfuerzo parental. El significado ecológico de estas proteínas todavía no es bien conocido pero su importante función y su presencia en todos los seres vivos estudiados indican que tienen un papel muy importante en la neutralización del estrés en la naturaleza.

Asimismo, la actividad física intensa puede inducir inmunosupresión (Råberg et al. 1998; Pedersen y Hoffman-Goetz 2000), haciendo a los individuos más susceptibles a las enfermedades. Además, se sabe que en las aves diversas enfermedades como por ejemplo las infecciones maláricas pueden acentuarse durante la reproducción (Atkinson y Van Riper 1991). Varios estudios han mostrado también que las defensas inmunitarias se ven afectadas por el esfuerzo reproductor (Moreno et al. 1999b; Hasselquist et al. 2001; Saino et al. 2002), y que esta variación puede afectar a la resistencia frente a los parásitos (Nordling et al. 1998) o

incluso a la supervivencia (Hanssen et al. 2004). También es conocido que los parásitos pueden inducir aumentos en los niveles de inmunoglobulinas en sangre (Isobe y Suzuki 1987; Morales et al. 2004).

En este estudio se explora la variación en los niveles intracelulares de HSP60 e inmunoglobulinas plasmáticas en sangre periférica como dos indicadores indirectos del coste del esfuerzo reproductor actuando a diferentes niveles. Esto se llevó a cabo mediante la manipulación experimental del tamaño de la nidada en el herrerillo común (*Parus caeruleus*), un passeriforme poco longevo de pequeño tamaño. Los herrerillos comunes son unas de las aves más fecundas que existen, y podrían ser seleccionadas hacia maximizar su esfuerzo reproductor presente. Cabría esperar que un aumento en el esfuerzo parental tuviera un efecto inmunosupresor que pudiera verse reflejado en los niveles de inmunoglobulinas, tal como se ha mostrado con otras respuestas inmunitarias específicas en estudios previos (Deerenberg et al. 1997; Nordling et al. 1998). También se esperaría un incremento en la proteína de estrés HSP60 en respuesta a una mayor demanda metabólica y a los costes asociados a nivel celular

(Wiersma et al. 2004). Además, estos dos tipos de proteínas pueden estar relacionados directamente por la implicación de las proteínas de estrés en la producción de inmunoglobulinas (Moseley 2000), o indirectamente a través de una limitación de recursos para la producción de ambas. Por consiguiente, se exploró además la relación entre los dos tipos de proteínas y el efecto potencial de cada una sobre la otra.

MATERIAL Y MÉTODOS

Durante la primavera de 2003, se llevó a cabo un experimento en una población de herrerillo común que nidifica en cajas-nido en Valsain (Segovia). Mediante inspecciones periódicas de los nidos se monitorizó la reproducción de las aves. A los tres días de edad de los polluelos se capturó a las hembras en sus nidos (identificadas por la presencia de placa incubatriz) y se les extrajo una muestra de sangre de la vena braquial. Se les identificó individualmente con anillas metálicas y se obtuvo su peso corporal con una balanza (precisión 0.05 g). Ese mismo día, se trasladaron dos polluelos de un nido (nidos reducidos) a otro (nidos aumentados), mientras que un

tercer nido con igual fecha de eclosión fue mantenido como control, sacando a los polluelos y volviendo a colocarlos en el nido para equiparar las molestias causadas por la manipulación entre los tres grupos. Cada trío de nidos tenía un número original de polluelos similar (± 1 polluelo). Diez días después se recapturó a las hembras, se obtuvo su peso corporal y se les extrajo una segunda muestra de sangre. De igual modo, se extrajo también una muestra de sangre de cada polluelo y se obtuvo su peso a los 13 días de edad.

Análisis de la muestra sanguínea

Una gota de cada muestra de sangre de las hembras fue inmediatamente extendida sobre un portaobjetos y dejada secar al aire. Ya en el laboratorio, los frotis fueron fijados con etanol al 95 % y teñidos durante 45 min con Giemsa (1/10 v/v en tampón fosfato). Los frotis fueron examinados al microscopio en busca de parásitos sanguíneos como se describe en Merino et al. (1997). Los parásitos fueron cuantificados en base el número de células infectadas por cada 2000 eritrocitos (Godfrey et al. 1987).

El resto de la sangre fue centrifugada y las fracciones celular y plasmática separadas y congeladas para análisis posteriores. Las muestras de plasma fueron empleadas para cuantificar los niveles de inmunoglobulinas mediante ELISA directo, empleando un anticuerpo policlonal anti-IgG de gallina conjugado con peroxidasa (Sigma, St. Louis, MO, USA). Las absorbancias se midieron en un espectrofotómetro a $\lambda = 405$ nm. Los detalles y la validación del método han sido descritos por Martínez et al. (2003, Capítulo 3). Mezclando volúmenes iguales de plasma de cada uno de los polluelos del nido se obtuvo el nivel medio de inmunoglobulinas de los polluelos para cada nido.

La fracción celular de la sangre fue empleada para cuantificar la proteína de estrés HSP60 mediante Western blot, empleando anticuerpos monoclonales anti-HSP60 (clon LK2, Sigma, St. Louis, MO, USA), como se describe en Merino et al. (1998a) y Tomás et al. (2004, Capítulo 2). Estos anticuerpos se unen de forma específica a la HSP60 y han sido empleados en infinidad de vertebrados incluyendo aves. Las bandas de proteína fueron cuantificadas mediante un programa de análisis de imagen para entorno Windows (Scion Corporation).

La inmunoreactividad (unidades arbitrarias) se obtuvo con la siguiente fórmula: área x intensidad media de la banda. Mezclando la misma cantidad de proteína total de cada uno de los polluelos del nido se obtuvo el nivel medio de HSP60 de los polluelos para cada nido.

Análisis estadísticos

La exploración de los cambios entre los niveles inicial y final de HSP60 y de inmunoglobulinas de cada hembra en cada tratamiento se llevó a cabo mediante ANOVAs de medidas repetidas con el tratamiento (manipulación de la nidada) como factor. Se examinó específicamente la interacción entre el tratamiento y el tiempo (cambio entre el valor inicial y el final, como factor de medidas repetidas). Asimismo, se exploraron los posibles efectos de la infección (véase Morales et al. 2004; Tomás et al. 2005, Capítulo 4) sobre las variaciones en los niveles de proteínas, incluyendo como covariable la intensidad media de infección por *Haemoproteus* (intensidad final - intensidad inicial). Puesto que la intensidad de infección no cumplió los requerimientos de los tests paramétricos, los datos se

transformaron logarítmicamente. También se examinó el efecto de un tipo de proteína sobre la otra incluyendo el nivel medio de cada proteína (nivel final - nivel inicial) como covariable en el análisis de medidas repetidas de la otra. Las medias se presentan con su error estándar.

RESULTADOS

Se incluyeron 29 tríos de nidos en el experimento. Para cada análisis se

utilizó el máximo tamaño de muestra disponible, que varió debido a que no se pudo recapturar a tres hembras de cada tratamiento y a que la muestra de plasma de otra hembra fue insuficiente para el análisis de las inmunoglobulinas. Además, en tres nidos los polluelos murieron antes de los 13 días de edad y en otro nido no se pudo obtener sangre de los polluelos. Los tamaños de muestra para los diferentes análisis se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Tamaños de muestra disponibles para los diferentes análisis llevados a cabo.

Análisis	Hembras		Polluelos
	Inicial	Final	Final
HSP60	87	78	83
IGGs	86	78	83

Los nidos asignados a los diferentes tratamientos no difirieron en fecha de eclosión o número de polluelos al principio del experimento ($F_{2,84} = 0.01$, $p = 0.99$ y $F_{2,84} = 0.24$, $p = 0.78$ respectivamente). Al final del experimento, el tamaño de la nidada sí difirió entre los grupos (nidos

reducidos: 6.04 ± 0.30 , nidos control: 7.39 ± 0.35 , nidos aumentados: 9.03 ± 0.50 ; $F_{2,82} = 14.39$, $p < 0.0001$).

El parásito más frecuente en la población fue *Haemoproteus majoris*, infectando al 73.6 % de las hembras de herrerillo. La intensidad de infección media inicial fue de 18.52 ± 2.59

células infectadas por 2000 eritrocitos, y la final fue de 14.65 ± 2.34 . La intensidad de infección disminuyó a lo largo del experimento (factor tiempo: $F_{1,74} = 6.17$, $p = 0.02$), pero no de forma diferencial entre los tratamientos (interacción tratamiento x tiempo: $F_{2,74}$

$= 1.20$, $p = 0.31$). Ni los niveles de infección iniciales ni finales difirieron entre los grupos experimentales ($F_{2,84} = 0.017$, $p = 0.98$ y $F_{2,74} = 0.14$, $p = 0.87$, respectivamente).

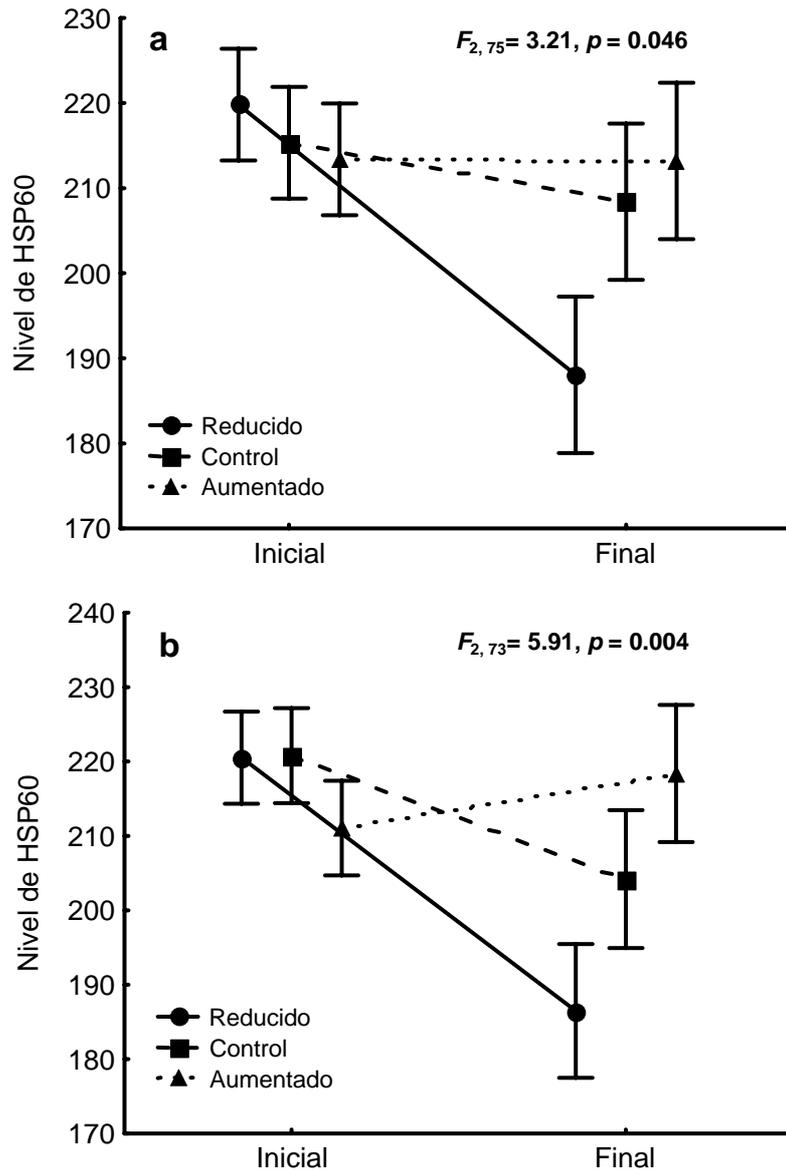


Fig. 1. a) Cambios en los niveles de HSP60 de las hembras de herrerillo común asignadas a los distintos tratamientos experimentales. b) Cambios en los niveles de HSP60 de las hembras de herrerillo común asignadas a los distintos tratamientos experimentales tras controlar por el cambio en los niveles de inmunoglobulinas (nivel final - nivel inicial) como covariable en el análisis. Las barras indican el error estándar.

Hubo una interacción significativa entre el tratamiento y el tiempo para los niveles de HSP60 ($F_{2,75} = 3.21$, $p = 0.046$, Fig. 1a), mostrando una reducción significativamente mayor de los niveles de esta proteína en las hembras que atendieron nidadas reducidas en comparación con las que atendieron nidadas control o aumentadas. Este resultado no varió al incluir la intensidad de infección por *Haemoproteus* como covariable ($F_{2,73} = 3.83$, $p = 0.026$). Los niveles iniciales de HSP60 de las hembras no diferían entre los grupos ($F_{2,84} = 0.16$, $p = 0.85$), pero los niveles finales tendieron a ser menores en las hembras del grupo reducido ($F_{2,73} = 2.76$, $p = 0.07$).

Para los niveles de inmunoglobulinas, la interacción entre el tratamiento y el tiempo también fue significativa ($F_{2,74} = 3.45$, $p = 0.037$, Fig.2a), mostrando una reducción durante el experimento en las hembras que atendieron nidadas aumentadas en comparación con los otros dos tratamientos. Este resultado no varió al controlar por la intensidad de infección por *Haemoproteus* ($F_{2,72} = 3.29$, $p = 0.043$). No obstante, ni los niveles iniciales ni finales de inmunoglobulinas difirieron entre los grupos experimentales ($F_{2,82} = 0.17$, $p = 0.84$ y $F_{2,73} = 0.94$, $p = 0.40$ respectivamente).

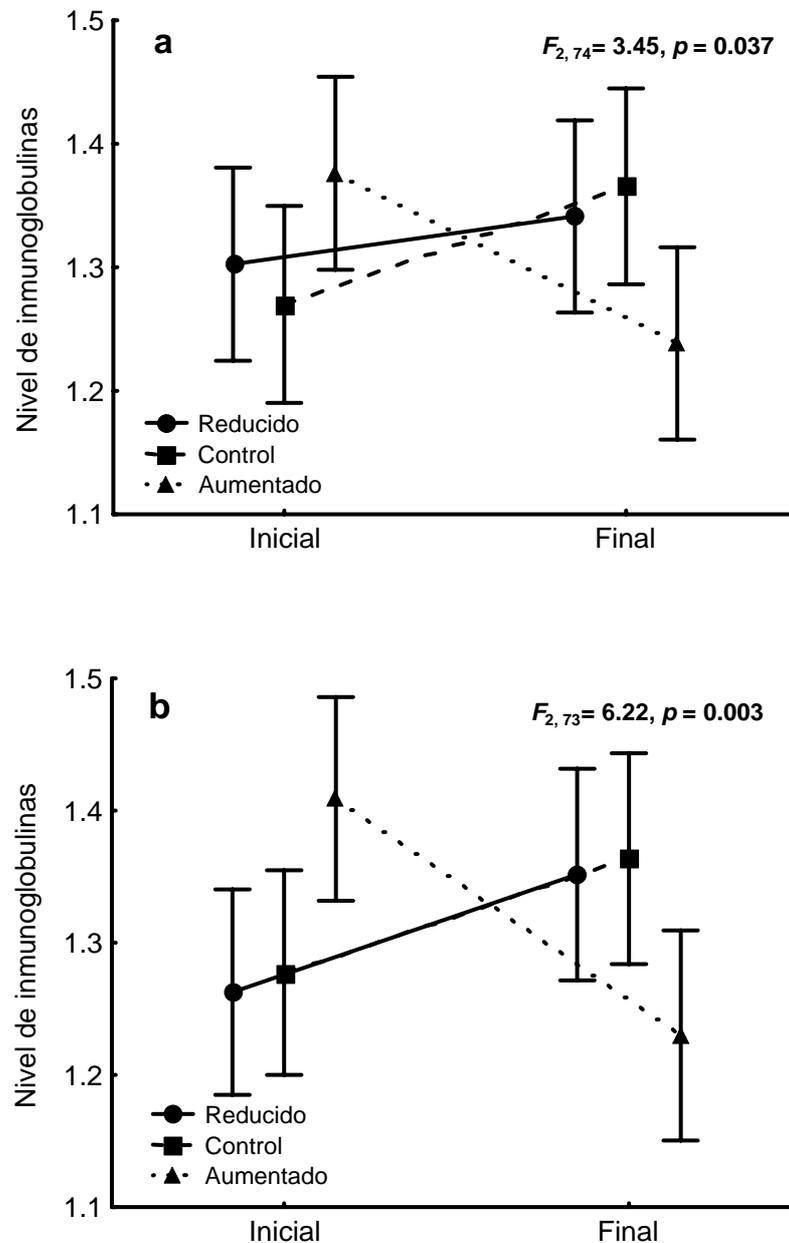


Fig. 2. a) Cambios en los niveles de inmunoglobulinas de las hembras de herrerillo común asignadas a los distintos tratamientos experimentales. b) Cambios en los niveles de inmunoglobulinas de las hembras de herrerillo común asignadas a los distintos tratamientos experimentales tras controlar por el cambio en los niveles de HSP60 (nivel final - nivel inicial) como covariable en el análisis. Las barras indican el error estándar.

Los niveles iniciales de inmunoglobulinas y de HSP60 se relacionaron marginalmente de forma positiva ($r = 0.21$, $p = 0.05$), no así los niveles finales ($r = 0.02$, $p = 0.87$). Sin embargo, la magnitud del cambio (nivel final - nivel inicial) de cada tipo de proteína estuvo directamente relacionada con la magnitud del cambio de la otra ($r = 0.32$, $p = 0.005$; Fig. 3). Al incluir el cambio en los niveles de inmunoglobulinas en el análisis de medidas repetidas de la

HSP60, se detectó una disminución en los niveles de HSP60 en los grupos control y reducido y un incremento en el grupo aumentado ($F_{2,73} = 5.91$, $p = 0.004$; Fig. 1b). A la inversa, al incluir el cambio en los niveles de HSP60 en el análisis de las inmunoglobulinas, se detectó un incremento en los niveles de inmunoglobulinas en los grupos control y reducido, y una marcada disminución en el grupo aumentado ($F_{2,73} = 6.22$, $p = 0.003$; Fig. 2b).

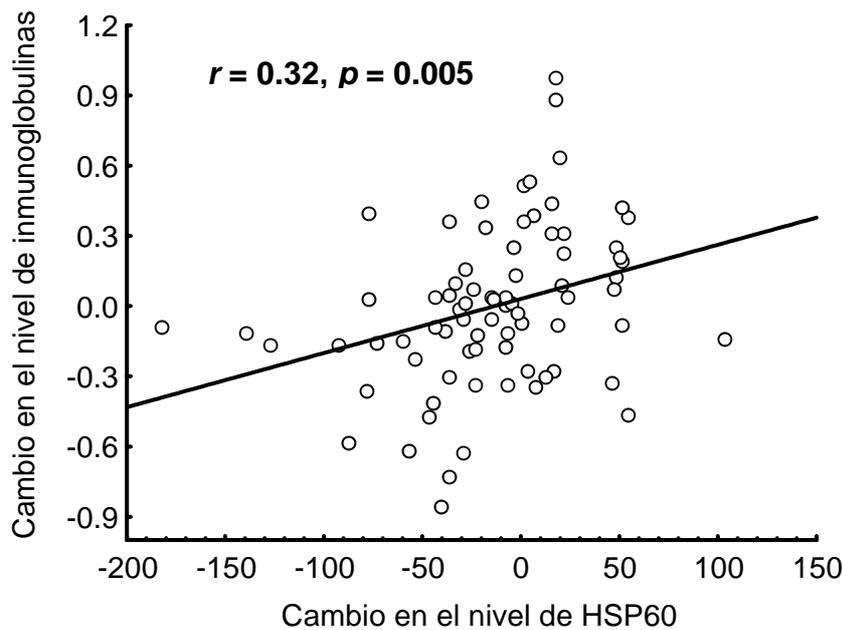


Fig. 3. Relación entre el cambio (nivel final - nivel inicial) en los niveles de inmunoglobulinas y el cambio en los niveles de HSP60.

Las hembras perdieron peso corporal durante el experimento (factor tiempo: $F_{1,70} = 154.42$, $p < 0.0001$), pero no de forma diferente entre los tratamientos (interacción tratamiento x

tiempo: $F_{2,70} = 0.19$, $p = 0.82$). El peso medio de los polluelos tendió a diferir entre los grupos ($F_{2,81} = 2.49$, $p = 0.09$), señalando una tendencia hacia un mayor peso corporal en los polluelos

del grupo reducido con respecto a los polluelos de los grupos control y aumentado. Los niveles de HSP60 e inmunoglobulinas de los polluelos no difirieron entre tratamientos ($F_{2,80} = 0.53$, $p = 0.59$ y $F_{2,80} = 0.34$, $p = 0.71$, respectivamente), y tampoco estuvieron correlacionados entre sí ($r = 0.001$, $p = 0.99$).

DISCUSIÓN

Nuestro experimento evidencia por vez primera que el esfuerzo parental afecta al estrés fisiológico de las aves medido con proteínas de estrés (pero véase Saino et al. 2002 e Ilmonen et al. 2003 para medidas hormonales de estrés). Las hembras que atendieron nidadas reducidas experimentaron una disminución en sus niveles de la proteína del estrés HSP60 en sangre a lo largo del experimento, mientras que las hembras de los nidos controles y aumentados mantuvieron niveles constantes. Esta diferencia podría implicar que las aves trabajan de forma natural cerca de su nivel máximo de estrés celular, y que sólo una disminución en su tasa de esfuerzo les permite reducir esta respuesta celular de estrés. Basándonos en la conocida función de la proteína de estrés HSP60

en otros organismos, que responde a diferentes agentes estresantes a nivel mitocondrial (Welch 1992; Hartman y Gething 1996), podemos especular que la reducción del número de polluelos que están siendo criados conlleva una reducción de la actividad metabólica de la hembra, que en último lugar se expresa en la actividad de las mitocondrias de las células sanguíneas, donde la HSP60 está implicada en el correcto ensamblaje de proteínas de nueva síntesis (Voellmy 1996). A pesar de que se ha demostrado que la infección por *Haemoproteus* origina un incremento de los niveles de HSP60 en el herrerillo común (Tomás et al. 2005, Capítulo 4), la disminución de los niveles de esta proteína de estrés se mantiene aún controlando por el efecto de la infección, lo que implicaría que las consecuencias de la manipulación del tamaño de la nidada son más importantes que las de la infección a este respecto. Es interesante señalar aquí que los niveles finales de HSP60 no difirieron significativamente entre los grupos, lo que indicaría que los límites para la reducción de los niveles de esta proteína son estrechos. El requerimiento de un cierto nivel de HSP60 para controlar los efectos de la infección podría impedir que se alcancen niveles más bajos de esta

proteína en las células (véase Tomás et al. 2005, Capítulo 4), y al mismo tiempo el incremento en la respuesta de HSP60 podría estar limitado por los costes de una sobre-expresión (Merino et al. 1998a; Sørensen et al. 2003).

Las diferentes funciones, modos de actuación y vías de regulación de las inmunoglobulinas con respecto a las proteínas de estrés pueden explicar por qué disminuyeron los niveles de inmunoglobulinas en las hembras que atendieron nidadas aumentadas y los niveles de HSP60 en las hembras que atendieron nidadas reducidas. Es bien conocido que la actividad física intensa causa una reducción de los niveles de inmunoglobulinas en una interacción más o menos compleja con las hormonas liberadas durante la reproducción y otros períodos de actividad elevada (Pedersen y Hoffman-Goetz 2000). Sin embargo, las proteínas de estrés están involucradas en la respuesta frente a agentes estresantes muy diversos y se esperaría que aumentase su expresión a consecuencia de un esfuerzo adicional, para tratar así de contrarrestar los efectos de un mayor nivel de estrés oxidativo, y de la infección que conllevaría una reducción de los niveles de inmunoglobulinas. Por otra parte, la expresión de la HSP60 es un

compromiso entre costes y beneficios, y como se ha indicado anteriormente, el incremento de sus niveles podría estar limitado por un potencial efecto negativo sobre el crecimiento, el desarrollo y la fertilidad asociado a su sobre-expresión (Merino et al. 1998a, 2004; Sørensen et al. 2003). En este sentido, la producción de un tipo de proteína puede estar limitada por la producción de la otra, si ambas compiten por los mismos metabolitos o la energía disponibles, o si la síntesis de una depende de la producción de la otra. Las proteínas de estrés están implicadas en la producción y ensamblaje de otras proteínas, incluyendo inmunoglobulinas (Martínez et al. 1999; Moseley 2000; Wallin et al. 2002). La relación marginalmente significativa entre los niveles iniciales de ambas proteínas y la correlación positiva entre la magnitud de sus cambios podrían representar la primera evidencia de dicha asociación en una población natural de vertebrados. No obstante, la ausencia de asociación entre los niveles finales de ambas proteínas señala que el tratamiento alteró esta relación. De hecho, al controlar estadísticamente el efecto de los cambios en una proteína sobre el cambio en la otra, encontramos que la reducción en los niveles de

inmunoglobulinas en el grupo aumentado es mayor de lo esperado en función del cambio en la HSP60. La HSP60 está implicada en otras funciones de mantenimiento de la homeostasis celular, y su síntesis puede activarse con otros fines no relacionados con la producción de inmunoglobulinas (Welch 1992). Por lo tanto, cuando se controla por la asociación entre los cambios en los niveles de HSP60 y de inmunoglobulinas, se observa un mayor incremento en el nivel de HSP60 en respuesta al aumento de la nidad. Esta relación apoya en cierta medida la hipótesis de la inmunosupresión mediada por las limitaciones energéticas (Sheldon y Verhulst 1996), si bien el hecho de que la HSP60 pueda provocar respuestas autoinmunes (Yang y Feige 1992) podría conectar la disminución en los niveles de inmunoglobulinas con la evitación de patologías autoinmunes (Råberg et al. 1998).

La interpretación de los niveles de inmunoglobulinas es controvertida, al poder reflejar tanto una función inmunitaria adecuada como la presencia de infección. No obstante, varios estudios han mostrado que podrían ser un indicador de la susceptibilidad al estrés y de las

infecciones parasitarias (Morales et al. 2004), e incluso de las perspectivas de supervivencia (Christe et al. 2001). Se ha demostrado que el esfuerzo reproductor afecta negativamente a la respuesta mediada por anticuerpos frente a antígenos específicos (Deerenberg et al. 1997; Nordling et al. 1998). Esto podría estar relacionado con una depresión general de la producción de anticuerpos, como sugiere nuestro resultado con los niveles totales de inmunoglobulinas en sangre. El mecanismo que subyace al efecto negativo del esfuerzo sobre la inmunocompetencia aún no está claro, si bien la competencia por los recursos energéticos o los nutrientes (Sheldon y Verhulst 1996) y la posibilidad de evitar patologías autoinmunes (Råberg et al. 1998) son en la actualidad las explicaciones más convincentes.

Se han evidenciado de forma experimental incrementos en los niveles de anticuerpos tras la infección por diversos tipos de parásitos (Isobe y Suzuki 1987; Atkinson et al. 2001). También se ha documentado una relación entre la intensidad de infección por *Haemoproteus*, el esfuerzo reproductor e incrementos en los niveles de inmunoglobulinas (Hõrak et al. 1998; Nordling et al. 1998; Morales et al. 2004). En el

presente estudio, sin embargo, el efecto de la manipulación del tamaño de la nidada se mantiene incluso controlando por los efectos de la infección por *Haemoproteus*, y no detectamos ninguna influencia de la infección sobre los cambios en los niveles de inmunoglobulinas durante el experimento. Esto puede ser debido a una reducida variación en los niveles de inmunoglobulinas durante el período reproductor (Morales et al. 2004), si bien los patrones para las aves de los distintos tratamientos sí difirieron.

Tal como se ha mostrado previamente (Nur 1984; Deerenberg et al. 1996), asumimos que las aves que atendieron nidadas aumentadas incrementaron su esfuerzo reproductor con respecto a las de los grupos control y reducido. Aunque no detectamos un efecto de la manipulación sobre el cambio en el peso corporal de las hembras, los costes reproductivos también pueden aparecer en términos fisiológicos (Hörak et al. 1998; Wiersma et al. 2004; este estudio) o de supervivencia (Nur 1984; Hörak 1995). Las nidadas aumentadas produjeron más polluelos que las controles, y los polluelos tuvieron niveles de inmunoglobulinas y HSP60 similares. Por lo tanto, un supuesto incremento en el esfuerzo reproductor es

aparentemente capaz de compensar la mayor demanda de la nidada, en lo que respecta a la condición de los polluelos.

La habilidad para contrarrestar el estrés mediante respuestas fisiológicas puede permitir a los individuos sobrellevar los intensos requerimientos energéticos y el esfuerzo inherentes a la reproducción. Varios estudios han demostrado la existencia de restricciones sobre el esfuerzo reproductivo en passeriformes de pequeño tamaño (Smith et al. 1988; Moreno et al. 1995, 1999a; Merino et al. 1998b), indicando que los padres trabajan normalmente cerca de su límite de esfuerzo. Hemos mostrado que las aves obligadas a sacar adelante a dos polluelos extra son reticentes o incapaces de incrementar sus niveles de HSP60 como medida de respuesta al estrés, y cuando llevan a cabo este incremento, es a costa de la disminución de los niveles de otras proteínas. Cualquier reducción en la demanda de la nidada se traduce en una reducción de la síntesis de proteínas de estrés, debido probablemente a que es costoso producir y mantener estas proteínas en respuesta al estrés (Merino et al. 1998a; Svensson et al. 1998; Sørensen et al. 2003; Martínez et al. 2004), y las aves deben reducir sus niveles siempre que les sea posible. La

manipulación experimental de los niveles de proteínas de estrés podría ayudar a esclarecer los mecanismos que relacionan sus niveles con los niveles de inmunoglobulinas.

del Ministerio de Ciencia y Tecnología. J. Morales y G. Tomás estuvieron respaldados por becas FPI del MCYT y la CAM respectivamente. Agradecemos a Tonantzin Calvo y Consuelo Corral su ayuda en el campo. Javier Donés (Montes de Valsain) concedió los permisos necesarios para trabajar en el área de estudio, mientras que la Dirección General del Medio Natural (Junta de Castilla y León) autorizó el anillamiento y la manipulación de las aves. Este estudio es una contribución a la investigación desarrollada en la estación de campo "El Ventorrillo".

AGRADECIMIENTOS

Este estudio se financió con los proyectos BOS2003-05724 (S. Merino y J. Martínez), y BOS2001-0587 (J. Moreno),

REFERENCIAS

- ALONSO-ALVAREZ C, BERTRAND S, DEVEVEY G, PROST J, FAIVRE B, SORCI G. 2004. Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. *Ecology Letters* **7**: 363–368.
- ATKINSON CT, LEASE JK, DRAKE BM, SHEMA NP. 2001. Pathogenicity, serological responses, and diagnosis of experimental and natural malarial infections in native Hawaiian Thrushes. *Condor* **103**: 209–218.
- ATKINSON CT, VAN RIPER III C. 1991. Pathogenicity and epizootiology of avian haematzoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon*, and *Haemoproteus*. En: Loye JE, Zuk M (eds.) *Bird-parasite interactions. Ecology, evolution and behaviour*. Oxford University Press, Oxford, pp. 19–48.
- CHRISTE P, DE LOPE F, GONZÁLEZ G, SAINO N, MØLLER AP. 2001. The influence of environmental conditions on immune responses, morphology and recapture probability of nestling house martins (*Delichon urbica*). *Oecologia* **126**: 333–338.
- DEERENBERG C, APANIUS V, DAAN S, BOS N. 1997. Reproductive effort decreases antibody responsiveness. *Proceedings of the Royal Society of London B* **264**: 1021–1029.
- DEERENBERG C, DE KOGEL CH, OVERKAMP GJF. 1996. Cost of reproduction in the Zebra Finch *Taenopygia guttata*: manipulation of brood size in the laboratory. *Journal of Avian Biology* **27**: 321–326.
- DRENT RH, DAAN S. 1980. The prudent parent: Energetic adjustments in avian breeding. *Ardea* **68**: 225–252.
- GODFREY RD, FEDYNICH AM, PENCE DB. 1987. Quantification of hematozoa in blood smears. *Journal of Wildlife Diseases* **23**: 558–565.
- HANSEN SA, HASSELQUIST D, FOLSTAD I, ERIKSTAD KE. 2004. Cost of immunity: immune responsiveness reduces survival in a vertebrate. *Proceedings of the Royal Society of London B* **271**: 925–930.
- HARTMAN D, GETHING MJ. 1996. Normal protein folding machinery. En: Feige U, Morimoto RI, Yahara BS (eds.) *Stress-Inducible Cellular Responses*. Birkhäuser Verlag, Switzerland, pp. 3–24.

- HASSELQUIST D, WASSON MF, WINKLER DW. 2001. Humoral immunocompetence correlates with date of egg-laying and reflects work load in female tree swallows. *Behavioral Ecology* **12**: 93–97.
- HÕRAK P. 1995. Brood reduction facilitates female but not offspring survival in the great tit. *Oecologia* **102**: 515–519.
- HÕRAK P, OTS I, MURUMÄGI A. 1998. Haematological health state indices of reproducing great tits: a response to brood size manipulation. *Functional Ecology* **12**: 750–756.
- ILMONEN P, HASSELQUIST D, LANGERFORS A, WIEHN J. 2003. Stress, immunocompetence and leukocyte profiles of pied flycatchers in relation to brood size manipulation. *Oecologia* **136**: 148–154.
- ISOBE T, SUZUKI K. 1987. Immunoglobulin M and G immune response to *Leucocytozoon caulleryi* in chickens. *Japanese Journal of Veterinary Science* **49**: 333–339.
- LINDÉN M, MØLLER AP. 1989. Costs of reproduction and covariation of life history traits in birds. *Trends in Ecology and Evolution* **4**: 367–370.
- MARTÍNEZ J, MERINO S, RODRÍGUEZ-CAABEIRO F. 2004. Physiological responses to *Trichinella spiralis* infection in Wistar rats: Is immune response costly? *Helminthologia* **41**: 67–71.
- MARTÍNEZ J, PÉREZ-SERRANO J, BERNARDINA WE, RODRÍGUEZ-CAABEIRO F. 1999. Using heat shock proteins as indicators of the immune function in Wistar rats during a secondary *Trichinella spiralis* infection. *Veterinary Parasitology* **85**: 269–275.
- MARTÍNEZ J, TOMÁS G, MERINO S, ARRIERO E, MORENO J. 2003. Detection of serum immunoglobulins in wild birds by direct ELISA: a methodological study to validate the technique in different species using antichickens antibodies. *Functional Ecology* **17**: 700–706.
- MERINO S, BLÁZQUEZ MC, MARTÍNEZ J, RODRÍGUEZ-ESTRELLA R. 2004. Stress protein expression is related to tail loss in two species of iguanid lizards. *Canadian Journal of Zoology* **82**: 436–441.
- MERINO S, MARTÍNEZ J, BARBOSA A, MØLLER AP, DE LOPE F, PÉREZ J, RODRÍGUEZ-CAABEIRO F. 1998a. Increase in a heat shock protein from blood cells in response to parasitism of nestling house martins (*Delichon urbica*): An experimental approach. *Oecologia* **116**: 343–347.
- MERINO S, MORENO J, POTTI J, DE LEÓN A, RODRÍGUEZ R. 1998b. Nest ectoparasites and maternal effort in pied flycatchers. *Biologia e Conservazione della Fauna* **102**: 200–205.
- MERINO S, POTTI J, FARGALLO JA. 1997. Blood parasites of some passerine birds from central Spain. *Journal of Wildlife Diseases* **33**: 638–641.
- MORALES J, MORENO J, MERINO S, TOMÁS G, MARTÍNEZ J, GARAMSZEGI LZ. 2004. Associations between immune parameters, parasitism and stress in breeding pied flycatcher females *Ficedula hypoleuca*. *Canadian Journal of Zoology* **82**: 1484–1492.
- MORENO J. 1993. Physiological mechanisms underlying reproductive trade-offs. *Etologia* **3**: 41–56.
- MORENO J, COWIE RJ, SANZ JJ, WILLIAMS RSR. 1995. Differential response by males and females to brood manipulations in the pied flycatcher: energy expenditure and nestling diet. *Journal of Animal Ecology* **64**: 721–732.

- MORENO J, MERINO S, POTTI J, DE LEÓN A, RODRÍGUEZ R. 1999a. Maternal effort does not change with flight cost or food availability in the pied flycatcher: cost and benefits for nestlings. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **46**: 244–251.
- MORENO J, SANZ JJ, ARRIERO E. 1999b. Reproductive effort and T lymphocyte cell mediated immunocompetence in female pied flycatchers *Ficedula hypoleuca*. *Proceedings of the Royal Society of London B* **266**: 1105–1109.
- MORIMOTO RI. 1991. Heat shock: The role of transient inducible responses in cell damage, transformation, and differentiation. *Cancer Cells* **3**: 295–301.
- MOSELEY P. 2000. Stress proteins and the immune response. *Immunopharmacology* **48**: 299–302.
- NORDLING D, ANDERSSON M, ZOHARI S, GUSTAFSSON L. 1998. Reproductive effort reduces specific immune response and parasite resistance. *Proceedings of the Royal Society of London B* **265**: 1291–1298.
- NUR N. 1984. The consequences of brood size for breeding blue tits I. Adult survival, weight change and the cost of reproduction. *Journal of Animal Ecology* **53**: 479–496.
- PEDERSEN BK, HOFFMAN-GOETZ L. 2000. Exercise and the immune system: Regulation, integration, and adaptation. *Physiological Reviews* **80**: 1055–1081.
- PETERSON CC, NAGY KA, DIAMOND J. 1990. Sustained metabolic scope. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **87**: 2324–2328.
- POTTI J, MORENO J, MERINO S. 1999. Repeatability of parental effort in male and female pied flycatchers as measured with doubly-labelled water. *Canadian Journal of Zoology* **77**: 174–179.
- RÅBERG L, GRAHN M, HASSELQUIST D, SVENSSON E. 1998. On the adaptative significance of stress induced immunosuppression. *Proceedings of the Royal Society of London B* **265**: 1637–1641.
- SAINO N, INCAGLI M, MARTINELLI R, MØLLER AP. 2002. Immune response of male barn swallows in relation to parental effort, corticosterone plasma levels, and sexual ornamentation. *Behavioral Ecology* **13**: 169–174.
- SHELDON BC, VERHULST S. 1996. Ecological immunology: costly parasite defences and trade offs in evolutionary ecology. *Trends in Ecology and Evolution* **11**: 317–321.
- SMITH HG, KÅLLANDER H, FONTELL K, LJUNGSTRÖM M. 1988. Feeding frequency and parental division of labour in the double-brooded great tit *Parus major*. *Behavioural Ecology and Sociobiology* **22**: 447–453.
- SØRENSEN JG, KRISTENSEN TN, LOESCHCKE V. 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters* **6**: 1025–1037.
- SVENSSON E, RÅBERG L, KOCH C, HASSELQUIST D. 1998. Energetic stress, immunosuppression and the costs of an antibody response. *Functional Ecology* **12**: 912–919.
- TOMÁS G, MARTÍNEZ J, MERINO S. 2004. Collection and analysis of blood samples to detect stress proteins in wild birds. *Journal of Field Ornithology* **75**: 281–287.
- TOMÁS G, MERINO S, MARTÍNEZ J, MORENO J, SANZ JJ. 2005. Stress protein levels and blood parasite infection in blue tits (*Parus caeruleus*): a medication field experiment. *Annales Zoologici Fennici* **42**: 45–56.
- TUOMI J. 1990. On clutch size and parental survival. *Oikos* **58**: 387–389.

- VOELLMY R. 1996. Sensing stress and responding to stress. En: Feige U, Morimoto RI, Yahara I, Polla BS (eds.) *Stress-inducible cellular responses*. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, pp. 121–138.
- WALLIN RPA, LUNDQVIST A, MORÉ SH, VON BONIN A, KIESSLING R, LJUNGGREN HG. 2002. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends in Immunology* **23**: 130–135.
- WELCH WJ. 1992. Mammalian stress response: Cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiological Reviews* **72**: 1063–1081.
- WIERSMA P, SELMAN C, SPEAKMAN JR, VERHULST S. 2004. Birds sacrifice oxidative protection for reproduction. *Proceedings of the Royal Society of London B (Suppl.)* **271**: S360–S363.
- YANG XD, FEIGE U. 1992. Heat shock proteins in autoimmune disease: From causative antigen to specific therapy? *Experientia* **48**: 650–656.

Consecuencias del parasitismo y la reutilización de los nidos para las hembras de herrerillo común (*Parus caeruleus*)

GUSTAVO TOMÁS, SANTIAGO MERINO, JUAN MORENO, JUDITH MORALES

RESUMEN

Exploramos las consecuencias de la reutilización de los nidos ofreciendo a los herrerillos tres tipos de cajas-nido para anidar: cajas-nido con un nido viejo (N), cajas vacías (V) y cajas-nido con un nido viejo fumigado con insecticida (F). Los grupos experimentales difirieron en la abundancia de ectoparásitos; las cajas-nido N tuvieron la mayor abundancia de ectoparásitos y las cajas-nido F la menor. Nuestros resultados muestran que los herrerillos que reutilizan cavidades que contienen nidos viejos de la estación anterior pagan un coste causado por la presencia de ectoparásitos. Este coste surgió en términos de un menor éxito reproductor y un menor peso corporal de las hembras tras la reproducción. Curiosamente, apareció un coste adicional en forma de mayor infección por parásitos sanguíneos en las hembras cuanto mayor fue la abundancia de ectoparásitos. Los costes de reutilización de los nidos podrían verse reducidos en aquellas áreas y/o años con baja incidencia del ectoparasitismo, como demuestran los resultados obtenidos para el grupo con nidos viejos fumigados.

INTRODUCCIÓN

Los parásitos son unos de los organismos más comunes y son, por definición, perjudiciales para sus hospedadores, representando por lo tanto una importante fuerza de selección para los animales en la naturaleza (Price 1980; Loye y Zuk 1991; Clayton y Moore 1997). En las últimas décadas, los ecólogos han prestado mayor atención a las presiones directas e indirectas que los parásitos pueden infringir en la modulación de las estrategias vitales de sus hospedadores (Møller 1997). En este sentido, las asociaciones entre aves y ectoparásitos son uno de los sistemas modelo más fructíferos para afrontar esta cuestión, habiendo proporcionado numerosos ejemplos influyentes sobre ecología y evolución mediadas por parásitos (Møller et al. 1990; Møller 1991a; Richner 1998; Proctor y Owens 2000).

Varios artrópodos, incluyendo pulgas, adultos y larvas de dípteros, ácaros y garrapatas se alimentan de la sangre de las aves adultas y sus polluelos durante su estancia en el nido (p.ej. Møller et al. 1990; Loye y Zuk 1991 y referencias allí citadas). Numerosos estudios observacionales y

experimentales han demostrado que estos ectoparásitos pueden tener impactos negativos severos sobre la condición de los hospedadores, su rendimiento reproductor y su supervivencia (revisado en Loye y Zuk 1991; Lehmann 1993; Clayton y Moore 1997). La mayoría de estos estudios se ha llevado a cabo en sistemas modelo en los que interviene una única especie de ectoparásito (o dos con menos frecuencia) (véase Martin et al. 2001), si bien una plétora de especies con diferentes ciclos biológicos y características ecológicas pueden estar habitando simultáneamente el nido de un hospedador dado. De hecho, en lo que respecta a las especies de aves que anidan en cavidades, que son estudiadas normalmente en cajas-nido, parece probable que este escenario se podría ajustar mejor a las cavidades naturales donde las aves y los ectoparásitos del nido han evolucionado (Møller 1989). Sin embargo, apenas existen datos disponibles en este sentido (pero véase Wesolowski y Stańska 2001). Por otra parte, la mayoría de los estudios se ha llevado a cabo con aves coloniales, y la información disponible sobre los efectos de los ectoparásitos en especies solitarias es comparativamente más

escasa (Loye y Carroll 1998; Merino et al. 2001).

Además de tener efectos directos sobre los hospedadores, los ectoparásitos hematófagos pueden transmitir enfermedades (virus, protozoos,...) entre las aves (Macfie y Thomson 1929; Price 1980; Marshall 1981). Sin embargo, poco se conoce sobre el papel real de los ectoparásitos como vectores de enfermedades en poblaciones silvestres de aves (Allander y Bennett 1994; Proctor y Owens 2000; Votýpka et al. 2002), y por lo tanto, se necesita claramente más información para comprender mejor sus implicaciones ecológicas, comportamentales y evolutivas en el contexto de las interacciones entre hospedadores y parásitos.

Para establecer el efecto de los parásitos sobre la eficacia biológica de sus hospedadores es necesario manipular la abundancia de parásitos dentro del rango natural de infestación y en condiciones naturales (Lehmann 1993; Proctor y Owens 2000). La validez de los avances en ecología de aves usando poblaciones que nidifican en cajas-nido fue cuestionada por Møller (1989, 1992). Møller argumentó que la práctica extendida entre los investigadores de eliminar cada año los nidos de la temporada anterior de las

cajas-nido podría sesgar los resultados de muchos de estos estudios, en parte debido a que las abundancias de ectoparásitos podrían verse reducidas y por tanto sus dinámicas poblacionales artificialmente alteradas. Después, muchos estudios han encontrado evidencias en favor de la crítica planteada por Møller (p.ej. Thompson y Neill 1991; Oppliger et al. 1994; Merino y Potti 1995a; pero véase Mappes et al. 1994; Wesolowski 2000). Por otra parte, Wesolowski y Stańska (2001) han mostrado recientemente que las abundancias de ectoparásitos podrían ser artificialmente elevadas en las cajas-nido en comparación con las cavidades naturales. Por lo tanto, la controversia acerca de si (y en qué medida) la eliminación de los nidos viejos puede afectar a las poblaciones de ectoparásitos, y en sentido más amplio, sobre qué tal simulan los estudios con cajas-nido las condiciones naturales está aún lejos de ser resuelta.

En el presente estudio experimental, ofrecimos tres tipos de cajas-nido a los herrerillos comunes (*Parus caeruleus*) para nidificar: i) Cajas-nido con un nido viejo que simula la situación natural en que las cavidades son reutilizadas en años sucesivos (niveles naturales de ectoparasitismo). ii) Cajas-nido vacías

que reflejan la práctica común entre los investigadores en que el material del nido es eliminado tras cada época reproductora, eliminando por lo tanto la mayoría de los ectoparásitos (Møller 1989). iii) Cajas-nido con un nido viejo fumigado con insecticida, que representa la situación natural pero sin ectoparásitos.

Predecimos que las cajas-nido con nidos viejos deberían albergar un mayor número de ectoparásitos que las cajas-nido vacías, puesto que parte de sus poblaciones pueden pasar el invierno en el material del nido, esperando a nuevos hospedadores a los que parasitar en la primavera siguiente (Burt et al. 1991; Harper et al. 1992; Møller 1992; pero véase Mappes et al. 1994). Obviamente, las cajas-nido fumigadas deberían presentar las abundancias más bajas de ectoparásitos. Nuestras predicciones son 1) las cajas-nido con mayor infestación deberían ser menos preferidas por los herrerillos (revisado en Loye y Carroll 1998; pero véase Mappes et al. 1994; Olsson y Allander 1995); 2) debería haber un retraso en la fecha de puesta en los nidos más infestados (p.ej. Oppliger et al. 1994; pero véase Møller 1990); 3) debería haber efectos negativos de los ectoparásitos sobre el éxito de eclosión

(p.ej. Møller et al. 1990; Oppliger et al. 1994; pero véase Richner et al. 1993), el éxito reproductor (p.ej. Møller 1990; Fitze et al. 2004), el peso corporal de la hembra tras la reproducción (p.ej. Christe et al. 2002; pero véase Tripet y Richner 1997a) y el tamaño y peso de los polluelos (p.ej. Merino y Potti 1995b; Hurtrez-Boussès et al. 1998); y 4) como los parásitos sanguíneos son a menudo transmitidos por ectoparásitos (Price 1980; Marshall 1981), predecimos que las intensidades y prevalencias de infección por parásitos sanguíneos de las hembras deberían ser mayores a medida que aumenta el ectoparasitismo. Curiosamente, esta última predicción rara vez ha sido probada en el contexto de las interacciones entre hospedadores y parásitos a este nivel de escala entre nidos (pero véase Christe et al. 2002).

Hay evidencias de que el tamaño óptimo de la puesta varía en función de si los ectoparásitos tienen ciclos de vida largo o corto (véase Richner y Heeb 1995 y referencias allí citadas). Sin embargo, dado que nuestra población padece infestaciones tanto por ectoparásitos con ciclo de vida largo (pulgas y moscas del género *Protocalliphora*) como con ciclo de vida corto (ácaros), no tenemos una predicción a priori sobre cómo podría

diferir el tamaño de puesta entre los grupos experimentales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Área y especies de estudio

El estudio se llevó a cabo durante la estación reproductora de 2002 en un bosque caducifolio de roble melojo (*Quercus pyrenaica*) cerca de La Granja, provincia de Segovia (40°54'N, 4°01'O, 1200 m s.n.m.). Las cajas-nido han estado disponibles para las aves en el área de estudio desde 1991 (p.ej. Sanz 2002). Los nidos viejos son eliminados cada año tras la reproducción, excepto en determinadas ocasiones. El herrerillo común es un paseriforme pequeño (10 - 12 g) bastante común en los bosques caducifolios y mixtos de la región Paleártica Occidental (Cramp y Perrins 1998). Nidifica en cavidades y se adapta perfectamente a criar en cajas-nido. En la población estudiada, las hembras realizan una única puesta cada año (con un promedio de 9.14 huevos), que comienza generalmente a principios de mayo (Sanz 2002).

La pulga *Ceratophyllus gallinae* (Siphonaptera: Ceratophyllidae) es un ectoparásito común de las aves y

particularmente abundante en los nidos de páridos, siendo el herrerillo común su principal hospedador (Harper et al. 1992; Tripet y Richner 1997b). Los adultos se alimentan regularmente de la sangre de las aves adultas y sus polluelos, y suelen completar una o dos generaciones durante el período de estancia de los polluelos en el nido (Tripet y Richner 1999a,b). En el análisis de los Berlese (véase más abajo) distinguimos también estadios larvarios, que crecen en el material del nido y se alimentan de desechos y heces excretadas por los adultos (p.ej. Lehane 1991).

La larva de la mosca *Protocalliphora azurea* (Diptera: Calliphoridae) es un ectoparásito común de las aves en la región Holártica (Bennett y Whitworth 1991, 1992). Los adultos, de vida libre, depositan sus huevos en el material del nido tras el nacimiento de los polluelos. Los tres estadios larvarios viven en el nido y se alimentan de la sangre de los polluelos, completando una única generación durante el período de estancia de los polluelos en el nido.

El ácaro *Dermanyssus gallinoides* (Acari: Dermanyssidae) es un ácaro de movimiento rápido en el que tanto los adultos como algunos estadios ninfales son hematófagos. Este ácaro tiene un

ciclo vital breve y puede constituir poblaciones enormes muy rápidamente (Richner y Heeb 1995; Proctor y Owens 2000).

Protocolo experimental

Un total de 99 cajas-nido dispuestas en una cuadrícula con 25 m entre cajas adyacentes fueron asignadas alternativamente a uno de los siguientes tratamientos dos semanas antes del inicio de la reproducción de los herrerillos: i) Cajas-nido vacías (V), donde todo el material del nido viejo fue cuidadosamente eliminado. ii) Cajas-nido con un nido viejo (N); para crear este grupo se utilizaron nidos de párido que no habían sido retirados en la primavera anterior, y que fueron transportados en bolsas de plástico precintadas. iii) Cajas-nido con nido fumigado (F); se emplearon nidos viejos como en el grupo N, pero aplicando un insecticida (Stockade ©, Fort Dodge Veterinaria, S.A., Vall de Bianya, Girona) con permetrina al 0.5 % y butóxido de piperonilo al 1 % durante el transporte en las bolsas (ca. 15 min). Algunos ectoparásitos pasan el invierno entre el material del nido y se vuelven activos por estimulación mecánica (p.ej. las pulgas, Humpries

1968). Por tanto, para minimizar la emigración o muerte de los parásitos debida a una emergencia o activación demasiado temprana, se intentó iniciar el experimento lo más próximo posible al inicio de la reproducción de los herrerillos, pero antes de que éstos hubieran seleccionado las cajas-nido.

Se consideraron como nidos ocupados aquellos donde se inició la puesta. Mediante inspecciones periódicas, se determinó el tamaño de puesta y las fechas de puesta y eclosión para cada uno de los nidos ocupados. Los nidos pertenecientes al grupo F fueron refumigados a los 7 días de edad de los polluelos (fecha de eclosión = día 0), retirando los polluelos del nido durante unos instantes y devolviéndolos tras la fumigación. Los otros nidos fueron manipulados de la misma manera en esa fecha, pulverizando agua en lugar de insecticida. De esta manera eliminamos las posibles diferencias de humedad entre los grupos, que de otro modo podrían haber afectado a las poblaciones de ectoparásitos (Bennett y Whitworth 1991; Chilton et al. 2000; Heeb et al. 2000), así como las posibles diferencias debidas a la manipulación de los polluelos.

Se capturó a las hembras de herrerillo en las cajas-nido a los 13 días

de edad de los polluelos, se dataron como juveniles o adultas (de más de un año) según Svensson (1992) y se les anilló con anillas metálicas numeradas cuando fue necesario. Se registró el peso corporal de las hembras con una balanza (Baar, Suiza) de precisión 0.05 g, y se les midió la longitud del tarso con un calibre digital de precisión 0.01 mm y la longitud del ala con una regla de precisión 0.5 mm. Se extrajo una muestra de sangre de la vena braquial de las hembras con la ayuda de un capilar y se extendió sobre un portaobjetos. Los frotis sanguíneos fueron dejados secar al aire y después fijados con etanol (96 %) y teñidos con Giemsa (1/10 v/v) durante 45 minutos. Una de las dos mitades simétricas del frotis fue examinada a 200 aumentos en busca de parásitos sanguíneos grandes como *Trypanosoma*, *Leucocytozoon* o microfilaria, mientras que los parásitos intracelulares más pequeños como *Haemoproteus* o *Hepatozoon* fueron detectados en la otra mitad del frotis a 1000 aumentos (Merino y Potti 1995c; Merino et al. 1997). La intensidad de infección (abundancia) de *Haemoproteus* se estimó en base al número de células infectadas por cada 2000 eritrocitos (Godfrey et al. 1987). Para *Trypanosoma* y *Leucocytozoon* se utilizaron índices de presencia/ausencia

debido a sus bajas intensidades de infección. *Hepatozoon* y microfilaria no fueron analizados en relación al tratamiento debido al reducido número de aves infectadas, pero fueron considerados para el análisis del número de especies de parásitos sanguíneos que aparecieron infectando a las hembras.

El peso y la longitud del tarso de todos los polluelos fueron registrados a los 13 días de edad de igual modo que para las hembras. Una vez los polluelos hubieron abandonado el nido, es decir 20 días después de la eclosión, los nidos fueron recogidos en bolsas de plástico precintadas y etiquetadas individualmente. Los nidos se almacenaron a 4 °C, y antes de que pasara un mes desde su recolección, fueron dispuestos en embudos de Berlese para ser examinados en busca de ectoparásitos. Esto se llevó a cabo durante 48 h, bajo condiciones de temperatura e iluminación constantes proporcionadas por lámparas de 60 w colocadas a 20 cm sobre los nidos. Se colocó una tela fina precintando la parte superior de los embudos a fin de evitar posibles escapes de ectoparásitos. Este método es uno de los más rigurosos para cuantificar algunos ectoparásitos de los nidos como los ácaros (Proctor y Owens

2000). De este modo, los ectoparásitos pequeños (ácaros y adultos y larvas de pulga) fueron recolectados en viales con etanol al 70 % y cuantificados gracias a una lupa binocular. Los nidos fueron desmenuzados cuidadosamente en busca de pupas o larvas de mosca así como ácaros, pulgas u otros ectoparásitos no obtenidos por este método (véase Merino y Potti 1995b). Las bolsas en las que se recolectaron los nidos fueron también inspeccionadas.

Análisis estadísticos

Los tamaños de muestra difirieron entre los distintos análisis (Tabla 1) debido a que los datos pertenecientes a tres nidos abandonados sólo fueron incluidos hasta la fecha de abandono y a que algunas hembras no se capturaron a causa del mal tiempo. Las abundancias de parásitos fueron transformadas logarítmicamente. El éxito de eclosión (proporción de huevos que eclosionan) y el éxito reproductor (proporción de huevos que resultan en volantones) fueron transformados con el arcoseno de la raíz cuadrada antes de los análisis. Ya que no teníamos una predicción previa sobre cómo podría variar el tamaño de

puesta en relación al tratamiento, se empleó un ANOVA para explorar las diferencias entre grupos. Hay una hipótesis direccional clara según la cual la abundancia de ectoparásitos en los nidos debería aumentar en el orden *grupo F < grupo V < grupo N*, y que los efectos de los ectoparásitos deberían operar consecuentemente en el mismo sentido. Por lo tanto, se derivan predicciones direccionales obvias según las cuales la elección de caja-nido, el peso de la hembra tras la reproducción, el tamaño corporal de los polluelos, el éxito de eclosión y el éxito reproductor deberían aumentar en el orden contrario (*grupo F > grupo V > grupo N*). Asimismo, esperamos que la fecha de puesta difiera entre grupos en el orden *grupo F < grupo V < grupo N*. Véase la introducción para el razonamiento de estas predicciones. Por consiguiente, los efectos de los tres tratamientos fueron analizados mediante regresiones isotónicas (Gaines y Rice 1990). Cuando no se pudo aplicar la regresión isotónica (variables con una respuesta binomial, p.ej. prevalencias), empleamos tests de heterogeneidad ordenada (tests OH) siguiendo las recomendaciones de Rice y Gaines (1994a). Todos los tests OH fueron de una cola porque tenemos predicciones direccionales claras sobre

el efecto del tratamiento. No obstante, el empleo de tests de dos colas no cambia los resultados principales del trabajo. Los tests de heterogeneidad subyacentes a los tests OH fueron ANOVAs con errores binomiales y una función logit. Tanto la regresión isotónica como el test OH

proporcionan una ganancia importante de potencia estadística (es decir, reducen los errores de tipo II) al analizar predicciones ordenadas (Gaines y Rice 1990; Rice y Gaines 1994a,b,c).

Tabla 1. Tamaños de muestra disponibles de cada variable analizada para cada tratamiento experimental. Grupo F: cajas-nido con un nido fumigado; grupo V: cajas-nido vacías; grupo N: cajas-nido con un nido viejo.

	Grupo F	Grupo V	Grupo N
Fecha de puesta	12	15	9
Tamaño de puesta	12	15	9
Éxito de eclosión	12	14	9
Medidas de polluelos	11	14	8
Éxito reproductor	11	14	8
Ectoparásitos	11	14	8
Edad de la hembra	9	14	5
Medidas de la hembra ^a	9	11	5
Parásitos sanguíneos de la hembra	9	11	5

^a Una hembra del grupo V escapó antes de obtener su peso corporal, por lo que el tamaño de muestra para el peso de la hembra fue $n = 10$.

Para explorar más en profundidad las relaciones entre las abundancias de ectoparásitos y las infecciones por parásitos sanguíneos de las hembras, se llevaron a cabo modelos GRM (para la

intensidad de *Haemoproteus*) o GLZ (para las prevalencias de *Trypanosoma* y *Leucocytozoon*) (Statsoft 2001) aplicando resolución por pasos hacia atrás e incluyendo el número de pulgas

adultas, ácaros y larvas de mosca como variables explicativas. Incluyendo el tratamiento como factor o aplicando resolución por pasos hacia delante no se modificaron los resultados.

RESULTADOS

Tratamiento y abundancia de ectoparásitos

En conjunto, 31 de los 33 nidos (93.9 %) en los que volaron polluelos estuvieron infestados por algún ectoparásito. Se encontraron tres especies de ectoparásitos en los nidos de herrerillo común recogidos justo después de que los polluelos volasen. En concreto, hubo ácaros en 27 nidos (81.8 %), pulgas en 20 (60.6 %) y larvas de mosca del género *Protocalliphora* en 19 nidos (57.6 %). El tratamiento tuvo éxito creando diferencias en la infestación de cada uno de los ectoparásitos en la dirección predicha (Tabla 2). Los nidos del grupo F mantuvieron las abundancias más bajas de parásitos, mientras que los

nidos del grupo V tuvieron abundancias intermedias y los nidos del grupo N tuvieron las mayores abundancias. Además, el número medio de especies de ectoparásitos presentes difirió significativamente entre grupos en la misma dirección predicha (Tabla 2). La naturaleza y potencia de la regresión isotónica permitió detectar diferencias significativas entre grupos en la dirección predicha para la abundancia de ácaros, a pesar de que la media de ésta fue menor en el grupo N que en el grupo V. Las prevalencias de pulgas adultas, de pulgas totales (adultos + larvas) y de larvas de mosca difirieron significativamente entre grupos en la dirección predicha (tests OH, $p = 0.028, 0.001, 0.010$, respectivamente). En todos los casos, el grupo F mostró la prevalencia más baja y el grupo N la más alta. Las prevalencias de larvas de pulga y de ácaros mostraron un patrón similar, si bien las diferencias entre grupos en la dirección predicha no fueron estadísticamente significativas (tests OH, $p > 0.20$).

Tabla 2. Número de ectoparásitos (media (error estándar)) en los nidos de herrerillo común en relación al tratamiento experimental. Grupo F: cajas-nido con un nido fumigado; grupo V: cajas-nido vacías; grupo N: cajas-nido con un nido viejo.

	Grupo F	Grupo V	Grupo N	E^2_3	p^a
Pulgas (adultos)	0.27 (0.19)	7.5 (6.15)	41.75 (34.34)	0.19	0.013
Pulgas (larvas)	0.00 (0.00)	295.43 (91.12)	546.00 (281.46)	0.44	<0.001
Pulgas (total)	0.27 (0.19)	302.93 (94.88)	587.75 (276.40)	0.42	<0.001
Larvas de mosca	3.36 (2.07)	10.07 (2.48)	12.75 (4.51)	0.19	0.016
Ácaros	14.55 (6.55)	1017.14 (432.08)	493.75 (344.84)	0.25	0.004
Nº de especies	1.18 (0.23)	2.36 (0.17)	2.50 (0.19)	0.46	<0.001

^a Valores de probabilidad de las regresiones isotónicas (E^2 ; Gaines y Rice 1990) analizando las predicciones direccionales según las cuales las abundancias de ectoparásitos y el número de especies de ectoparásitos varían entre tratamientos según el orden *grupo F* < *grupo V* < *grupo N*. Los tests se han realizado sobre datos transformados logarítmicamente, excepto para el número de especies de ectoparásitos.

Tratamiento y rendimiento reproductor

No hubo diferencias significativas en la tasa de ocupación de las cajas-nido de los diferentes tratamientos experimentales por los herrerillos (OH test, $p = 0.22$). Las hembras de diferente edad (juveniles o adultas) no ocuparon las cajas-nido diferencialmente en relación al tratamiento (Pearson χ^2 , $p > 0.50$), y tampoco hubo diferencias en la longitud del ala y el tarso de las hembras que ocuparon cajas-nido de

distintos tratamientos (ANOVA, ambos $p > 0.50$). No se encontraron diferencias significativas entre grupos en la fecha de puesta en la dirección predicha (regresión isotónica, $p > 0.35$). El tamaño de puesta no difirió entre los grupos experimentales (ANOVA, $p > 0.85$). El éxito de eclosión tendió a diferir entre los grupos en la dirección *grupo F* > *grupo V* > *grupo N* (regresión isotónica, $E^2_3 = 0.11$, $p = 0.060$). No se encontraron diferencias significativas en la dirección predicha para las medidas medias de los polluelos a día 13

(regresión isotónica, $E^2_3 = 0.01$, $p = 0.42$ para el peso corporal; $E^2_3 = 0.04$, $p = 0.25$ para la longitud del tarso). Sin embargo, hubo un efecto del tratamiento sobre el éxito reproductor en la dirección predicha (regresión isotónica, $E^2_3 = 0.21$, $p = 0.010$, Fig. 1a), debida especialmente a un

reducido éxito del grupo N. Además, hubo una diferencia significativa entre los tres grupos en la misma dirección predicha para el peso corporal de la hembra al final del experimento (regresión isotónica, $E^2_3 = 0.32$, $p = 0.006$, Fig. 1b).

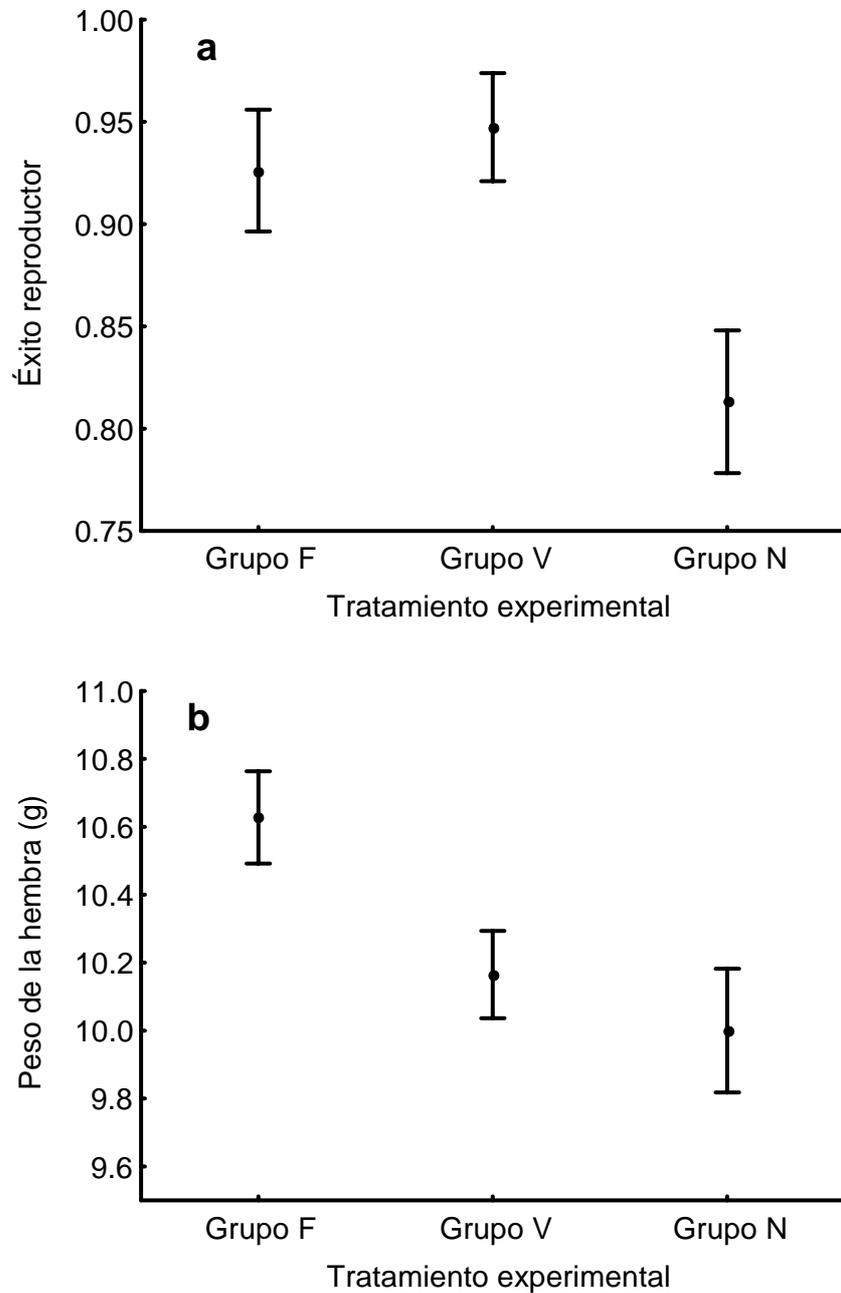


Fig. 1. Éxito reproductor medio (a) y peso corporal medio de las hembras de herrerillo común a los 13 días de edad de los polluelos (b) en relación al tratamiento experimental. Grupo F: cajas-nido con un nido fumigado; grupo V: cajas-nido vacías; grupo N: cajas-nido con un nido viejo. Las barras indican el error estándar.

Tratamiento y abundancia de parásitos sanguíneos

A los 13 días de edad de los polluelos, el 96 % (24 de 25) de las hembras capturadas aparecieron infectadas por parásitos sanguíneos. El parásito más común fue *Haemoproteus majoris* (68 %, $n = 17$), seguido por *Leucocytozoon majoris* (56 %, $n = 14$), *Trypanosoma avium* (40 %, $n = 10$) y *Hepatozoon parus* y microfilaria (ambos 20 %, $n = 5$). Las prevalencias de *Leucocytozoon* y *Trypanosoma* estuvieron afectadas claramente por el tratamiento en la dirección predicha: las hembras del grupo F mostraron las prevalencias más bajas y las hembras del grupo N las más altas (tests OH; $p = 0.036$ para *Leucocytozoon*, y $p = 0.023$ para *Trypanosoma*; Fig. 2). La intensidad de infección por *Haemoproteus* mostró un

patrón similar, aunque las diferencias entre los grupos en la dirección predicha no fueron significativas (grupo F: 7.50 ± 3.06 , grupo V: 27.42 ± 11.48 , grupo N: 28.98 ± 9.10 , regresión isotónica, $E^2_3 = 0.11$, $p = 0.107$). Asimismo, hubo diferencias significativas entre los grupos en la dirección predicha para el número medio de especies de parásitos que infectaban a las hembras (regresión isotónica, $E^2_3 = 0.20$, $p = 0.029$, Fig. 3). En promedio, las hembras del grupo F estuvieron infectadas por el menor número de especies de parásitos sanguíneos (1.56 ± 0.24), mientras que las hembras del grupo V estuvieron infectadas por un número intermedio (2.09 ± 0.28) y las hembras del grupo N estuvieron infectadas por el mayor número de especies (2.80 ± 0.58).

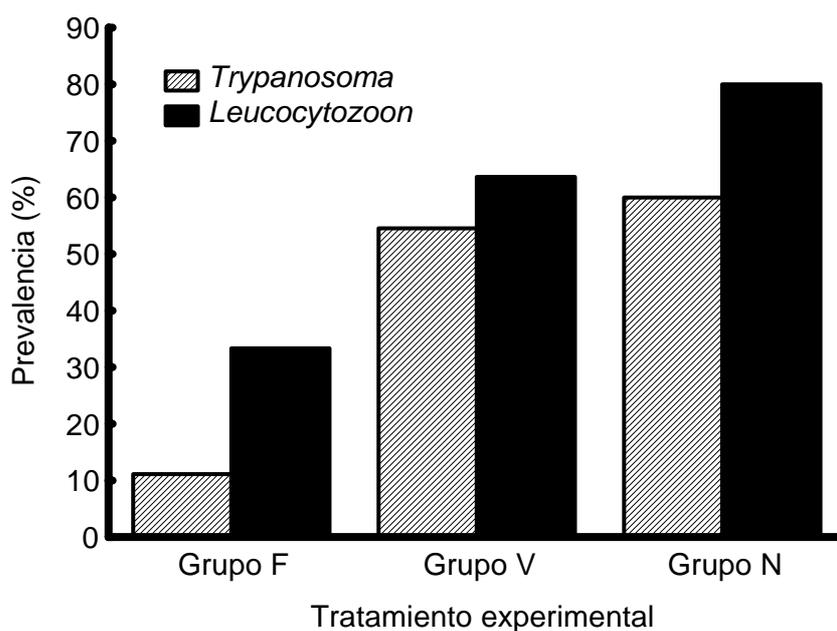


Fig. 2. Prevalencias (%) de *Trypanosoma* y *Leucocytozoon* en las hembras de herrerillo común a los 13 días de edad de los polluelos en relación al tratamiento experimental. Grupo F: cajas-nido con un nido fumigado; grupo V: cajas-nido vacías; grupo N: cajas-nido con un nido viejo.

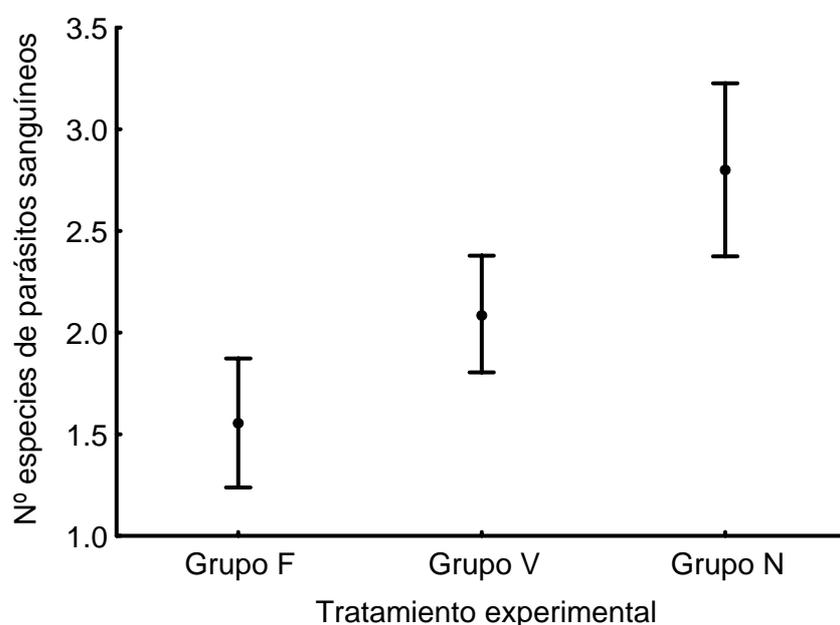


Fig. 3. Número medio (\pm error estándar) de especies de parásitos sanguíneos que aparecieron infectando a las hembras de herrerillo común a los 13 días de edad de los polluelos en relación al tratamiento experimental. Grupo F: cajas-nido con un nido fumigado; grupo V: cajas-nido vacías; grupo N: cajas-nido con un nido viejo.

La prevalencia de *Leucocytozoon* no estuvo relacionada con ninguna especie de ectoparásito (todas $p > 0.05$). Sin embargo, la prevalencia de *Trypanosoma* estuvo significativamente relacionada con la abundancia de larvas de mosca (Estadístico de Wald = 3.90, $p = 0.048$). La intensidad de infección por *Haemoproteus* estuvo significativamente relacionada con la abundancia de pulgas adultas ($F_{1,23} = 7.71$, $p = 0.011$).

DISCUSIÓN

Tratamiento y abundancia de ectoparásitos

Nuestro tratamiento experimental tuvo éxito creando diferencias en cada una de las especies de ectoparásitos que fueron registradas infestando los nidos de los herrerillos. Los nidos del grupo F tuvieron las menores abundancias de ectoparásitos, mientras que el grupo V tuvo abundancias intermedias y el grupo N tuvo las mayores abundancias. Aunque no evaluamos de forma directa la posible extracción de material del nido viejo por los herrerillos, encontramos nidos viejos más o menos intactos bajo los nuevos materiales,

sugiriendo que los herrerillos en nuestra población no removieron el material del nido viejo de forma sustancial. El hecho de que la prevalencia y abundancia de larvas de mosca fuese mayor en el grupo N que en el grupo V es un resultado bastante sorprendente, ya que se supone que las moscas del género *Protocalliphora* no pasan el invierno, o raramente lo hacen, entre el material del nido (Bennett y Whitworth 1991). Alternativamente, podría argumentarse que las señales olorosas más intensas en las cajas-nido con nidos viejos podrían facilitar su detección por parte de las moscas adultas. En cualquier caso, queda abierta la posibilidad de que la eliminación de los nidos viejos llevada a cabo con frecuencia por los investigadores pueda afectar a las poblaciones de moscas del género *Protocalliphora* de modo similar al mostrado para las pulgas (Rendell y Verbeek 1996a, este estudio) y los ácaros (este estudio), parásitos para los que es mejor conocido que parte de sus poblaciones pueden pasar el invierno en las cajas-nido (Burt et al. 1991; Harper et al. 1992).

Tratamiento y rendimiento reproductor

Los herrerillos en nuestra población de estudio no parecieron evitar las cavidades con un mayor nivel de ectoparasitismo, lo que concuerda con resultados previos para esta especie (Olsson y Allander 1995). Otras especies de aves tampoco evitan las cavidades infestadas por ectoparásitos (Olsson y Allander 1995) o las que contienen nidos viejos (Thompson y Neill 1991; Johnson 1996), pudiendo incluso preferir las cavidades con nidos viejos (Orell et al. 1993; Davis et al. 1994; Mappes et al. 1994; Olsson y Allander 1995; Pacejka y Thompson 1996). Sin embargo, numerosos estudios han mostrado que las aves pueden evitar activamente las cavidades infestadas por ectoparásitos para reproducirse (Oppliger et al. 1994; Merino y Potti 1995a; Rendell y Verbeek 1996b; Rytönen et al. 1998; véase también Loye y Carroll 1998) y para pasar la noche (Christe et al. 1994; Merilä y Allander 1995). Estas discrepancias podrían responder a características específicas de las estrategias vitales de los hospedadores o de la presión de los ectoparásitos (Orell et al. 1993; Merino y Potti

1995a). Nuestros resultados sugieren que los herrerillos podrían ser incapaces de evaluar y predecir la abundancia de ectoparásitos antes de la reproducción, de modo similar a lo que se ha propuesto para las golondrinas (Møller 1991b, 1993). Alternativamente, seleccionar una caja-nido que contenga un nido viejo puede ser ventajoso si ello reduce el esfuerzo de construcción del nido (Collias y Collias 1984; Møller 1990; Hansell 2000). Esto sería más probable que ocurriera en zonas con escasos efectos negativos de los ectoparásitos (p.ej. Orell et al. 1993) o en aquellos años en que se espere una abundancia baja de ectoparásitos. Por lo tanto, las aves pueden experimentar un compromiso entre ahorrar energía y tiempo destinados a la construcción del nido y padecer los efectos negativos del ectoparasitismo. Esto podría explicar la ausencia de preferencia observada entre las distintas cajas-nido ofrecidas a los herrerillos para reproducirse. Por otra parte, cabe indicar que nuestro diseño experimental puede no haber permitido que todas las parejas pudieran elegir entre los tres tipos de cajas-nido, ya que los herrerillos son aves territoriales, y a menudo defienden territorios pequeños (Cramp y Perrins 1998).

Se ha documentado un retraso en la fecha de puesta en carboneros comunes (*Parus major*) como una respuesta para evitar a los ectoparásitos (Oppliger et al. 1994). El razonamiento se basa en que algunos ectoparásitos, por ejemplo las pulgas (Humphries 1968; Tripet et al. 2002a), comienzan a abandonar la caja-nido si ésta no es ocupada a medida que avanza la estación reproductora. Por ello, los hospedadores podrían experimentar un compromiso entre la reducción del éxito reproductor causada por un retraso en la fecha de puesta (p.ej. Barba et al. 1995) y el coste de reproducirse más temprano con una abundancia mayor de ectoparásitos (Oppliger et al. 1994; Richner 1998). Sin embargo, otros ectoparásitos pueden ser más perjudiciales para las aves a medida que avanza la estación (p.ej. *Protocalliphora*, Merino y Potti 1995b). La necesidad de sopesar las diferentes presiones infringidas por los diferentes ectoparásitos, junto con otros factores como la disminución estacional en la disponibilidad de alimento, podría explicar por qué no se detectaron diferencias en la fecha de puesta entre los grupos experimentales.

No se encontraron diferencias significativas en el tamaño de puesta entre grupos. Como hemos sugerido

previamente, esto podría indicar que las hembras de herrerillo son incapaces de ajustar el tamaño de la puesta a una impredecible abundancia de ectoparásitos, lo que estaría de acuerdo con otros estudios previos (Møller 1991b, 1993). Por otra parte, Richner y Heeb (1995) propusieron que el tamaño de puesta óptimo sería diferente según el tipo de ectoparásito, de modo que las aves pondrían puestas mayores en presencia de ectoparásitos de ciclo largo que en presencia de ectoparásitos de ciclo corto. Dado que nuestra población de herrerillos está infestada por ectoparásitos tanto de ciclo largo (pulgas y moscas del género *Protocalliphora*) como corto (ácaros), esto podría constituir una explicación alternativa, no excluyente, al hecho de que no hubiera diferencias en el tamaño de puesta entre los grupos experimentales.

Los ectoparásitos pueden afectar a la eficacia de los padres para incubar los huevos, causando una reducción del éxito de eclosión (p.ej. Møller et al. 1990; De Lope et al. 1993; Oppliger et al. 1994). Nuestros resultados muestran que el éxito de eclosión tendió a disminuir a medida que aumentó la abundancia de ectoparásitos, si bien esta tendencia no fue estadísticamente significativa.

Este estudio muestra que los ectoparásitos pueden tener efectos negativos dramáticos sobre el éxito reproductor de los herrerillos, en consonancia con estudios previos en ésta (Bañbura et al. 2004) y otras especies (p.ej. Møller 1990, 1993; De Lope et al. 1993; Merino y Potti 1995b; Fitze et al. 2004). Hurtrez-Boussès et al. (1997a,b) no encontraron un efecto de los ectoparásitos sobre el éxito reproductor de los herrerillos, si bien detectaron efectos deletéreos sobre el peso y el tamaño corporal de los polluelos. En nuestro estudio, probablemente el esfuerzo de los padres consiguió contrarrestar los efectos negativos de los ectoparásitos sobre los polluelos, ya que no encontramos diferencias en el peso ni en el tamaño corporal de los mismos entre tratamientos, si bien tuvo que ocurrir una reducción de nidada diferencial para que los polluelos de los distintos tratamientos alcanzaran tamaños corporales similares (De Lope et al. 1993; Merino y Potti 1995b; Richner y Heeb 1995).

En cualquier caso, es conocido que determinados ectoparásitos aumentan los requerimientos energéticos de los polluelos, que de hecho demandan más alimento (Tripet y Richner 1997a) y reciben más cebas por parte de los

adultos (Tripet y Richner 1997a; Hurtrez-Boussès et al. 1998). Merino et al. (1998) mostraron que las hembras de Papamocas Cerrojillo *Ficedula hypoleuca* incrementan su gasto energético para compensar los efectos negativos del ectoparasitismo sobre sus polluelos, pero sólo hasta un cierto nivel más allá del cual las hembras podrían verse afectadas sin conseguir compensar el efecto sobre los polluelos. Por lo tanto, las hembras pueden haber compensado a su costa el efecto de los ectoparásitos sobre los polluelos. Así, además de verse reducido su éxito reproductor, las hembras de herrerillo pagaron costes adicionales en términos de un menor peso corporal tras la reproducción y una mayor infección por parásitos sanguíneos.

Las diferencias observadas entre tratamientos en el peso corporal de las hembras al final del período de crianza de los polluelos pueden deberse a que las hembras se esforzaron más en los nidos más infestados, incrementando sus tasas de cebas (Hurtrez-Boussès et al. 1998; Tripet et al. 2002b) o sus actividades de saneamiento del nido (Tripet et al. 2002b; véase también Merino et al. 1998). No obstante, estas diferencias podrían atribuirse también a un efecto directo de los ectoparásitos

sobre su peso corporal (Christe et al. 2002), o al daño infringido por los parásitos sanguíneos (Merino et al. 2000; Tomás et al. 2005, Capítulo 4).

Tratamiento y abundancia de parásitos sanguíneos

A escalas ecológicas y geográficas reducidas la prevalencia de parásitos sanguíneos se asocia con la abundancia de sus ectoparásitos vectores (p.ej. Van Riper et al. 1986; Garvin y Remsen 1997; Apanius et al. 2000; Sol et al. 2000). Hemos mostrado que a medida que aumenta el ectoparasitismo, las hembras están infectadas con mayor probabilidad por *Trypanosoma* y *Leucocytozoon*, y albergan un mayor número de especies de parásitos sanguíneos. La intensidad de infección por *Haemoproteus* mostró un patrón semejante, si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas. En un experimento similar, Christe et al. (2002) no encontraron un efecto del ectoparasitismo sobre la prevalencia y la intensidad de infección por parásitos sanguíneos en aviones comunes (*Delichon urbica*) adultos, aunque sólo una especie de *Haemoproteus* apareció infectando a las aves. Los períodos de prepatencia de *Trypanosoma* y

Leucocytozoon (24-48 h, Bennett 1970; y 5-6 días, Desser y Bennett 1993, respectivamente) son lo bastante breves para detectar nuevas infecciones durante el curso del experimento. En comparación, el período entre la infección inicial y la liberación de gametocitos en sangre para *Haemoproteus* es de unos 12-13 días (Fallis y Bennett 1961; datos propios no publicados), y este período de prepatencia mayor puede enmascarar los resultados concernientes a este parásito.

Alternativamente, las diferencias encontradas en las parasitosis sanguíneas entre grupos pueden estar relacionadas no sólo con diferencias en la abundancia de ectoparásitos sino también con diferencias en el esfuerzo reproductor (Norris et al. 1994; Richner et al. 1995; Oppliger et al. 1996; Fargallo y Merino 1999) o incluso con ambos factores a la vez. La idea de que las diferencias en las parasitosis sanguíneas son una consecuencia directa de las diferencias en abundancia de ectoparásitos es apoyada por las relaciones encontradas entre la abundancia de larvas de mosca y la prevalencia de *Trypanosoma* y entre la abundancia de pulgas y la intensidad de *Haemoproteus*. Por lo tanto, nuestros resultados sugerirían que algunos de

los ectoparásitos aquí estudiados podrían actuar como vectores de los parásitos sanguíneos detectados (véase Macfie y Thompson 1929). No obstante, debemos señalar que el método empleado para la cuantificación de ectoparásitos no permite detectar otros insectos como los jejenes (Diptera, Ceratopogonidae), que son conocidos vectores de parásitos sanguíneos (Fallis y Wood 1957; Votýpka et al. 2002) y comunes en nuestra zona de estudio (datos propios no publicados). Sin embargo, es posible que el tratamiento afectase a los jejenes de manera similar al resto de ectoparásitos, en cuyo caso las relaciones observadas entre los ectoparásitos y los parásitos sanguíneos podrían deberse no a las abundancias de pulgas, larvas de mosca y ácaros, sino a la abundancia de jejenes que estaría correlacionada con éstas. En cualquier caso, nuestros resultados muestran que las infecciones por parásitos sanguíneos de las hembras están relacionadas con la infestación por ectoparásitos del nido, implicando un coste adicional indirecto de la reutilización de los nidos.

Podría argumentarse que las diferencias observadas en éxito reproductor, peso corporal y parasitosis sanguínea de las hembras tras la

reproducción estuviesen originadas por diferencias en la calidad o la dominancia de las aves que anidaron en las cajas-nido de los distintos tratamientos. En el herrerillo, el tamaño corporal o la edad pueden reflejar medidas de calidad individual (Kempnaers et al. 1992) o dominancia social (Braillet et al. 2002). La comparación de las longitudes de tarso y ala de las hembras entre tratamientos no mostró diferencia alguna, y tampoco se encontraron diferencias en la edad de las hembras entre tratamientos. Por lo tanto, es improbable que las diferencias observadas tengan su origen en factores relacionados con las diferencias fenotípicas de las aves (véase Oppliger et al. 1994).

Nuestros resultados corroboran la suposición según la cual la eliminación de los nidos viejos de las cajas-nido puede alterar las poblaciones de ectoparásitos, y subrayan que las poblaciones de parásitos sanguíneos pueden ser alteradas también, como Møller (1989) sugirió. De esta manera, si las poblaciones de ectoparásitos son artificialmente elevadas en las cajas-nido en comparación con las cavidades naturales tal como mostraron Wesolowski y Stańska (2001), y las infecciones por parásitos sanguíneos están relacionadas con la abundancia

de ectoparásitos en el nido (este estudio), entonces las poblaciones de aves que nidifican en cajas-nido podrían estar expuestas a unos niveles de parasitismo sanguíneo artificialmente elevados. Este hecho implicaría que los estudios con cajas-nido representan una oportunidad excepcional para probar predicciones sobre la interacción parásito sanguíneo - hospedador, y por otra parte, que las extrapolaciones a las condiciones naturales deberían hacerse con cierta cautela.

Conclusiones

Los herrerillos comunes que reutilizan cavidades que contienen nidos viejos del año anterior pagan costes a diferentes niveles causados por la presencia de ectoparásitos del nido. Estos costes incluyen un menor éxito reproductor y una mayor pérdida de peso corporal y una mayor infección por parásitos sanguíneos en las hembras tras la reproducción, lo que sugiere que su supervivencia y reproducción futuras pueden verse también afectadas negativamente (Brown et al. 1995; Richner et al. 1995; Richner y Tripet 1999; pero véase Fitze et al. 2004). Estos costes de la

reutilización de nidos podrían ser menores en zonas y/o años con menor incidencia del ectoparasitismo, como demuestran los resultados obtenidos para el grupo con nidos viejos fumigados.

Nuestro conocimiento sobre el impacto de los ectoparásitos como vectores o inductores de enfermedades en las aves en condiciones naturales es todavía escaso (Proctor y Owens 2000; Votýpka et al. 2002), y se debería profundizar en su estudio para dilucidar la importancia de este efecto indirecto del ectoparasitismo sobre los hospedadores. Los estudios futuros en esta dirección ayudarán a comprender mejor las implicaciones ecológicas y evolutivas de la interacción entre los parásitos sanguíneos, los ectoparásitos y sus hospedadores aviarios.

AGRADECIMIENTOS

Javier Donés (Montes de Valsaín) concedió los permisos necesarios para trabajar en el área de estudio, mientras que la Junta de Castilla y León autorizó el anillamiento y la manipulación de las aves. Este estudio se financió con los proyectos BOS2000-1125 y BOS2003-05724 del Ministerio de Ciencia y Tecnología (SM) y BOS2001-0587 (J. Moreno). Agradecemos a Tonantzin Calvo, László Z. Garamszegi, José Llama, Javier Martínez e Inma Noguera por su ayuda, y a Diego Gil por sugerir el test OH. J. Morales disfrutó de una beca FPI del Ministerio de Ciencia y Tecnología. GT disfrutó de una beca FPI

de la Comunidad de Madrid y parcialmente de una beca de alojamiento en la Residencia de Estudiantes del Ayuntamiento de Madrid. Este estudio es

una contribución a la investigación desarrollada en la estación de campo de "El Ventorrillo".

REFERENCIAS

- ALLANDER K, BENNETT GF. 1994. Prevalence and intensity of haematozoan infection in a population of great tits *Parus major* from Gotland, Sweden. *Journal of Avian Biology* **25**: 69–74.
- APANIUS V, YORINKS N, BERMINGHAM E, RICKLEFS RE. 2000. Island and taxon effects in parasitism and resistance of Lesser Antillean birds. *Ecology* **81**: 1959–1969.
- BAÑBURA J, PERRET P, BLONDEL J, THOMAS DW, CARTAN-SON M, LAMBRECHTS MM. 2004. Effects of Protocalliphora parasites on nestling food composition in Corsican Blue Tits *Parus caeruleus*: consequences for nestling performance. *Acta Ornithologica* **39**: 93–103.
- BARBA E, GIL-DELGADO JA, MONRÓS JS. 1995. The costs of being late: consequences of delaying great tit *Parus major* first clutches. *Journal of Animal Ecology* **64**: 642–651.
- BENNETT GF, WHITWORTH TL. 1991. Studies on the life-history of some species of *Protocalliphora* (Diptera, Calliphoridae). *Canadian Journal of Zoology* **69**: 2048–2058.
- BENNETT GF, WHITWORTH TL. 1992. Host, nest, and ecological relationships of species of *Protocalliphora* (Diptera, Calliphoridae) *Canadian Journal of Zoology* **70**: 51–61.
- BENNETT GF. 1970. *Trypanosoma avium* Danilewsky in the avian host. *Canadian Journal of Zoology* **48**: 803–807.
- BRAILLET C, CHARMANTIER A, ARCHAUX F, DOS SANTOS A, PERRET P, LAMBRECHTS MM. 2002. Two blue tit *Parus caeruleus* populations from Corsica differ in social dominance. *Journal of Avian Biology* **33**: 444–450.
- BROWN CR, BROWN MB, RANNALA B. 1995. Ectoparasites reduce long-term survival of their avian host. *Proceedings of the Royal Society of London B* **262**: 313–319.
- BURTT EH JR, CHOW W, BABBITT GA. 1991. Occurrence and demography of mites of Tree Swallow, House Wren, and Eastern Bluebird nests. En: Loye JE, Zuk M (eds.), *Bird-parasite interactions. Ecology, evolution and behaviour*. Oxford University Press, pp. 104–122.
- CHILTON NB, ANDREWS RH, BULL CM. 2000. Influence of temperature and relative humidity on the moulting success of *Amblyomma limbatum* and *Aponomma hydrosauri* (Acari: Ixodidae) larvae and nymphs. *International Journal of Parasitology* **30**: 973–979.
- CHRISTE P, MØLLER AP, GONZÁLEZ G, DE LOPE F. 2002. Intraseasonal variation in immune defence, body mass and hematocrit in adult house martins *Delichon urbica*. *Journal of Avian Biology* **33**: 321–325.
- CHRISTE P, OPPLIGER A, RICHNER H. 1994. Ectoparasite affects choice and use of roost sites in the great tit, *Parus major*. *Animal Behaviour* **47**: 895–898.
- CLAYTON DH, MOORE J. 1997. *Host-parasite evolution: general principles and avian models*. Oxford University Press.

- COLLIAS NE, COLLIAS EC. 1984. *Nest Building and Bird Behaviour*. Princeton Univ. Press.
- CRAMP S, PERRINS CM. 1998. *The Complete Birds of the Western Palearctic on CD-ROM*. Version 1.0 for PC. Oxford University Press.
- DAVIS WH, KALISZ PJ, WELLS RJ. 1994. Eastern bluebirds prefer boxes containing old nests. *Journal of Field Ornithology* **65**: 250–253.
- DE LOPE F, GONZÁLEZ G, PÉREZ JJ, MØLLER AP. 1993. Increased detrimental effects of ectoparasites on their bird hosts during adverse environmental conditions. *Oecologia* **95**: 234–240.
- DESSER SS, BENNETT GF. 1993. The genera *Leucocytozoon*, *Haemoproteus* and *Hepatocystis*. En: Kreier JP (ed.). *Parasitic Protozoa*. Academic Press, pp. 273–307.
- FALLIS AM, BENNETT GF. 1961. Sporogony of *Leucocytozoon* and *Haemoproteus* in simuliids and ceratopogonids and a revised classification of the Haemosporidiida. *Canadian Journal of Zoology* **39**: 215–228.
- FALLIS AM, WOOD DM. 1957. Biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) as intermediate hosts for *Haemoproteus* of ducks. *Canadian Journal of Zoology* **35**: 425–435.
- FARGALLO JA, MERINO S. 1999. Brood size manipulation modifies the intensity of infection by haematzoa in female blue tits *Parus caeruleus*. *Ardea* **87**: 261–268.
- FITZE PS, TSCHIRREN B, RICHNER H. 2004. Life history and fitness consequences of ectoparasites. *Journal of Animal Ecology* **73**: 216–226.
- GAINES SD, RICE WR. 1990. Analysis of biological data when there are ordered expectations. *American Naturalist* **135**: 310–317.
- GARVIN MC, REMSEN JVJ. 1997. An alternative hypothesis for heavier parasite loads of brightly colored birds: exposure at the nest. *Auk* **114**: 179–191.
- GODFREY RD JR, FEDYNICH AM, PENCE DB. 1987. Quantification of hematozoa in blood smears. *Journal of Wildlife Diseases* **23**: 558–565.
- HANSELL M. 2000. *Bird Nests and Construction Behaviour*. Cambridge University Press.
- HARPER GH, MARCHANT A, BODDINGTON DG. 1992. The ecology of the hen flea *Ceratophyllus gallinae* and the moorhen flea *Dasyptillus gallinulae* in nestboxes. *Journal of Animal Ecology* **61**: 317–327.
- HEEB P, KÖLLIKER M, RICHNER H. 2000. Bird-ectoparasite interactions, nest humidity and ectoparasite community structure. *Ecology* **81**: 958–968.
- HUMPRIES DA. 1968. The host-finding behaviour of the hen flea, *Ceratophyllus gallinae* (Schränk). *Parasitology* **58**: 403–414.
- HURTREZ-BOUSSÈS S, BLONDEL J, PERRET P, FABREGUETTES J, RENAUD FR. 1998. Chick parasitism by blowflies affects feeding rates in a Mediterranean population of blue tits. *Ecology Letters* **1**: 17–20.
- HURTREZ-BOUSSÈS S, PERRET P, RENAUD F, BLONDEL J. 1997a. High blowfly parasitic loads affect breeding success in a Mediterranean population of blue tits. *Oecologia* **112**: 514–517.
- HURTREZ-BOUSSÈS S, BLONDEL J, PERRET P, RENAUD F. 1997b. Relationship between intensity of blowfly infestation and reproductive success in a Corsican population of Blue Tits. *Journal of Avian Biology* **28**: 267–270.
- JOHNSON LS. 1996. Removal of old nest material from the nesting sites of House wrens: effects on nest site attractiveness and ectoparasite loads. *Journal of Field Ornithology* **67**: 212–221.

- KEMPENAERS B, VERHEYEN GR, VAN DEN BROEK M, BURKE T, VANBROECKHOVEN C, DHONDT AA. 1992. Extrapair paternity results from female preference for high quality males in the blue tit (*Parus caeruleus*). *Nature* **537**: 494–496.
- LEHANE MJ. 1991. *Biology of blood sucking insects*. Harper Collins Academic, Londres.
- LEHMANN T. 1993. Ectoparasites: direct impact on host fitness. *Parasitology Today* **9**: 8–13.
- LOYE JE, CARROLL SP. 1998. Ectoparasite behavior and its effects on avian nest site selection. *Annals of the Entomological Society of America* **91**: 159–163.
- LOYE JE, ZUK M. 1991. *Bird-parasite interactions. Ecology, evolution and behaviour*. Oxford University Press.
- MACFIE JWS, THOMSON JG. 1929. A trypanosome of the canary (*Serinus canarius* Koch). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **14**: 231–234.
- MAPPES T, MAPPES J, KOTIAHO J. 1994. Ectoparasites, nest site choice and breeding success in the pied flycatcher. *Oecologia* **98**: 147–149.
- MARSHALL AG. 1981. *The ecology of ectoparasitic insects*. Academic Press.
- MARTIN TE, MØLLER AP, MERINO S, CLOBERT J. 2001. Does clutch size evolve in response to parasites and immunocompetence? *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **98**: 2071–2076.
- MERILÄ J, ALLANDER K. 1995. Do great tits (*Parus major*) prefer ectoparasite-free roost sites? - an experiment. *Ethology* **99**: 53–60.
- MERINO S, MARTÍNEZ J, MØLLER AP, BARBOSA A, DE LOPE F, RODRÍGUEZ-CAABEIRO F. 2001. Physiological and haematological consequences of a novel parasite on the red-rumped swallow *Hirundo daurica*. *International Journal of Parasitology* **31**: 1187–1193.
- MERINO S, MORENO J, POTTI J, DE LEÓN A, RODRÍGUEZ R. 1998. Nest ectoparasites and maternal effort in Pied Flycatchers. *Biologia e Conservazione della Fauna* **102**: 200–205.
- MERINO S, MORENO J, SANZ JJ, ARRIERO E. 2000. Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). *Proceedings of the Royal Society of London B* **267**: 2507–2510.
- MERINO S, POTTI J. 1995a. Pied flycatchers prefer to nest in clean nest boxes in an area with detrimental nest ectoparasites. *Condor* **97**: 828–831.
- MERINO S, POTTI J. 1995b. Mites and blowflies decrease growth and survival in nestling pied flycatchers. *Oikos* **73**: 95–103.
- MERINO S, POTTI J. 1995c. High prevalence of hematozoa in nestlings of a passerine species, the pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*). *Auk* **112**: 1041–1043.
- MERINO S, POTTI J, FARGALLO JA. 1997. Blood parasites of some passerine birds from central Spain. *Journal of Wildlife Diseases* **33**: 638–641.
- MØLLER AP. 1989. Parasites, predators and nest boxes: facts and artefacts in nest box studies of birds? *Oikos* **56**: 421–423.
- MØLLER AP. 1990. Effects of parasitism by a hematophagous mite on reproduction in the barn swallow. *Ecology* **71**: 2345–2357.
- MØLLER AP. 1991a. Parasites, sexual ornaments, and mate choice in the barn swallow. En: Loye JE, Zuk M (eds.), *Bird-parasite interactions. Ecology, evolution and behaviour*. Oxford University Press, pp. 328–343.

- MØLLER AP. 1991b. Ectoparasite loads affect optimal clutch size in swallows. *Functional Ecology* **5**: 351–359.
- MØLLER AP. 1992. Nest boxes and the scientific rigour of experimental studies. *Oikos* **63**: 309–311.
- MØLLER AP. 1993. Ectoparasites increase the cost of reproduction in their hosts. *Journal of Animal Ecology* **62**: 309–322.
- MØLLER AP. 1997. Parasitism and the evolution of host life history. En: Clayton DH, Moore J (eds.) *Host-parasite evolution: general principles and avian models*. Oxford University Press, pp. 105–127.
- MØLLER AP, ALLANDER K, DUFVA R. 1990. Fitness effects of parasites on passerine birds: A review. En: Blondel J, Gosler A, Lebreton J, McCleery RH (eds.) *Population biology of passerine birds*. Springer-Verlag, pp. 269–280.
- NORRIS K, ANWAR M, READ AF. 1994. Reproductive effort influences the prevalence of haematozoan parasites in great tits. *Journal of Animal Ecology* **63**: 601–610.
- OLSSON K, ALLANDER K. 1995. Do fleas, and/or old nest material, influence nest-site preference in hole-nesting passerines? *Ethology* **101**: 160–170.
- OPPLIGER A, CHRISTE P, RICHNER H. 1996. Clutch size and malaria resistance. *Nature* **381**: 565.
- OPPLIGER A, RICHNER H, CHRISTE P. 1994. Effect of an ectoparasite on lay date, nest-site choice, desertion, and hatching success in the great tit (*Parus major*). *Behavioral Ecology* **5**: 130–134.
- ORELL M, RYTKÖNEN S, ILOMÄKI K. 1993. Do pied flycatchers prefer nest boxes with old nest material? *Annales Zoologici Fennici* **30**: 313–316.
- PACEJKA AJ, THOMPSON CF. 1996. Does removal of old nests from nestboxes by researchers affect mite populations in subsequent nests of House wrens? *Journal of Field Ornithology* **67**: 558–564.
- PRICE PW. 1980. *Evolutionary biology of parasites*. Princeton Univ. Press.
- PROCTOR H, OWENS I. 2000. Mites and birds: diversity, parasitism and coevolution. *Trends in Ecology and Evolution* **15**: 358–364.
- RENDELL WB, VERBEEK NAM. 1996a. Are avian ectoparasites more numerous in nest boxes with old nest material? *Canadian Journal of Zoology* **74**: 1819–1825.
- RENDELL WB, VERBEEK NAM. 1996b. Old nest material in nest boxes of tree swallows: Effects on nest-site choice and nest building. *Auk* **113**: 319–328.
- RICE WR, GAINES SD. 1994a. Extending nondirectional heterogeneity tests to evaluate simply ordered alternative hypotheses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **91**: 225–226.
- RICE WR, GAINES SD. 1994b. The ordered-heterogeneity family of tests. *Biometrics* **50**: 746–752.
- RICE WR, GAINES SD. 1994c. Heads I win, tails you lose - testing directional alternative hypotheses in ecological and evolutionary research. *Trends in Ecology and Evolution* **9**: 235–237.
- RICHNER H. 1998. Host-ectoparasite interactions and life-history evolution. *Zoology* **101**: 333–344.
- RICHNER H, CHRISTE P, OPPLIGER A. 1995. Paternal investment affects prevalence of malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **92**: 1192–1194.

- RICHNER H, HEEB P. 1995. Are clutch and brood size patterns in birds shaped by ectoparasites? *Oikos* **73**: 435–431.
- RICHNER H, OPPLIGER A, CHRISTE P. 1993. Effect of an ectoparasite on reproduction in great tits. *Journal of Animal Ecology* **62**: 703–710.
- RICHNER H, TRIPET F. 1999. Ectoparasitism and the trade-off between current and future reproduction. *Oikos* **86**: 535–538.
- RYTKÖNEN S, LEHTONEN R, ORELL M. 1998. Breeding Great Tits *Parus major* avoid nestboxes infested with fleas. *Ibis* **140**: 687–690.
- SANZ JJ. 2002. Climate change and breeding parameters of great and blue tits throughout the Western Palearctic. *Global Change Biology* **8**: 409–422.
- SOL D, JOVANI R, TORRES J. 2000. Geographical variation in blood parasites in feral pigeons: the role of vectors. *Ecography* **23**: 307–314.
- STATSOFT, INC. 2001. *STATISTICA (data analysis software system)*, version 6. www.statsoft.com.
- SVENSSON L. 1992. *Identification Guide to European Passerines*. Lars Svensson.
- THOMPSON CF, NEILL AJ. 1991. House wrens do not prefer clean nestboxes. *Animal Behaviour* **42**: 1022–1024.
- TOMÁS G, MERINO S, MARTÍNEZ J, MORENO J, SANZ JJ. 2005. Stress protein levels and blood parasite infection in blue tits (*Parus caeruleus*): a medication field experiment. *Annales Zoologici Fennici* **42**: 45–56.
- TRIPET F, JACOT A, RICHNER H. 2002a. Larval competition affects the life histories and dispersal behavior of an avian ectoparasite. *Ecology* **83**: 935–945.
- TRIPET F, GLASER M, RICHNER H. 2002b. Behavioural responses to ectoparasites: time-budget adjustments and what matters to Blue Tits *Parus caeruleus* infested by fleas. *Ibis* **144**: 461–469.
- TRIPET F, RICHNER H. 1997a. Host responses to ectoparasites: food compensation by parent blue tits. *Oikos* **78**: 557–561.
- TRIPET F, RICHNER H. 1997b. The coevolutionary potential of a 'generalist' parasite, the hen flea *Ceratophyllus gallinae*. *Parasitology* **115**: 419–427.
- TRIPET F, RICHNER H. 1999a. Dynamics of Hen Flea *Ceratophyllus gallinae* subpopulations in Blue Tit nests. *Journal of Insect Behaviour* **12**: 159–174.
- TRIPET F, RICHNER H. 1999b. Density-dependent processes in the population dynamics of a bird ectoparasite *Ceratophyllus gallinae*. *Ecology* **80**: 1267–1277.
- VAN RIPER III C, VAN RIPER SG, GOFF ML, LAIRD M. 1986. The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaiian land birds. *Ecological Monographs* **56**: 327–344.
- VOTÝPKA J, OBORNÍK M, VOLF P, SVOBODOVÁ M, LUKEŠ J. 2002. *Trypanosoma avium* of raptors (Falconiformes): phylogeny and identification of vectors. *Parasitology* **125**: 253–263.
- WESOŁOWSKI T. 2000. What happens to old nests in natural holes? *Auk* **117**: 498–500.
- WESOŁOWSKI T, STAŃSKA M. 2001. High ectoparasite loads in hole-nesting birds - a nestbox bias? *Journal of Avian Biology* **32**: 281–285.

Peso del nido, eficiencia en la incubación y estado de salud de la hembra en el herrerillo común (*Parus caeruleus*)

GUSTAVO TOMÁS, SANTIAGO MERINO, JUAN MORENO, JUAN JOSÉ SANZ, JUDITH MORALES, SONIA GARCÍA-FRAILE

RESUMEN

En este trabajo se examinan dos de las varias hipótesis que se han propuesto para explicar la variabilidad intraespecífica en el tamaño del nido. La hipótesis de la termorregulación sugiere que el tamaño del nido se optimizaría para mantener la temperatura de los huevos y minimizar las fluctuaciones de temperatura. Recientemente, se ha sugerido que el tamaño del nido podría reflejar el estado de salud o la calidad fenotípica de su constructor, actuando así como un carácter sujeto a selección sexual (hipótesis de la señalización sexual). Durante dos años, se registró el peso de los nidos de herrerillo común de una población que nidifica en cajas-nido en el centro de España al inicio de la reproducción. Se registraron los parámetros reproductores y se midió a los adultos, obteniendo una muestra de sangre de las hembras, a los tres días de edad de los polluelos. Se detectó una relación significativa entre el peso del nido y el período de incubación, que apoyaría la hipótesis de la termorregulación. Las puestas eclosionaron antes en los nidos más grandes en comparación con los pequeños. Asimismo, se encontró una relación positiva entre el peso del nido y el éxito de eclosión en uno de los años de estudio. Los niveles de inmunoglobulinas de las hembras a los tres días de edad de los polluelos se relacionaron negativamente con el peso del nido, y las hembras no infectadas por

Trypanosoma sp. construyeron nidos significativamente más grandes que las infectadas en uno de los años de estudio. Un análisis GRM controlando por las posibles variables que pudieran afectar al peso del nido reveló que la fecha de puesta y el período de incubación estuvieron negativamente relacionados con el peso del nido. Además, se detectó una interacción significativa entre el año y la prevalencia de tripanosomas en las hembras, verificando el efecto de la infección por tripanosomas sobre el peso del nido en uno de los años de estudio. Nuestros resultados sugieren que el peso del nido en esta especie está adaptado principalmente a las necesidades de termorregulación de la puesta, y que algunas medidas de la salud de la hembra pueden estar involucradas en el esfuerzo destinado a la construcción del nido en algunos años, dependiendo probablemente de las condiciones ambientales.

INTRODUCCIÓN

Los nidos son estructuras más o menos complejas que son construidas por la mayoría de las especies de aves con fines reproductivos. La construcción del nido puede acarrear costes evidentes en términos de gasto de tiempo y energía o exposición a los depredadores, y por esta razón, cabe esperar que el tamaño del nido esté cuidadosamente ajustado en función de las presiones de selección que operen en cada especie e individuo. Asimismo, cabe esperar que las propiedades del nido se ajusten apropiadamente a los requerimientos de la incubación y la crianza de los polluelos.

Existe una extensa bibliografía dedicada al estudio de la variabilidad

intra- e interespecífica en el tamaño del nido (Hansell 2000), especialmente para especies con nidos abiertos. No obstante, el tamaño del nido puede también ser importante para las especies que anidan en cavidades. Los nidos construidos en cavidades están más protegidos de las condiciones externas, y no es probable que estén expuestos a un riesgo de caída, pero pueden sufrir inundaciones ocasionales (Wesołowski et al. 2002). Puesto que los nidos situados en cavidades no pueden ser observados desde fuera, no es probable que el riesgo de detección por parte de depredadores visuales actúe como fuerza selectiva importante sobre las características del nido.

Varias hipótesis han tratado de explicar la variabilidad intraespecífica natural observada en el tamaño del nido

de las aves, algunas de las cuales pueden ser aplicadas tanto a nidos abiertos como a nidos construidos en cavidades. En este trabajo se examinan dos de las hipótesis planteadas, que no son mutuamente excluyentes. La hipótesis de la termorregulación sugiere que el material del nido podría ayudar a mantener la temperatura de los huevos y minimizar las fluctuaciones de temperatura (White y Kinney 1974; Whittow y Berger 1977; Kern 1984; Hoi et al. 1994), y por lo tanto el peso del nido debería estar asociado a la longitud del período de incubación y al éxito de eclosión. Otra hipótesis más reciente sugiere que el tamaño del nido podría reflejar el estado de salud o la calidad fenotípica de su constructor (hipótesis de la señalización sexual, Moreno et al. 1994; Soler et al. 1998a). En este escenario, cabría esperar una asociación entre el peso del nido y alguna medida de la calidad o la salud del constructor.

El esfuerzo que invierte un ave en la construcción del nido puede estar mediado por su estado de salud o su calidad fenotípica (Lens et al. 1994), ya que los nidos más grandes (Lens et al. 1994; Soler et al. 1998b) o los construidos en menos tiempo (De Neve y Soler 2002) están asociados a

individuos en mejor condición. Para las aves que anidan en cavidades, los costes de construcción del nido se han achacado principalmente al riesgo de depredación del adulto durante el período de construcción (Collias y Collias 1984) y al coste energético del transporte del material en vuelo (Slagsvold 1989a). En general, diversos tipos de evidencias apoyan la idea de que el esfuerzo de construcción del nido ha sido tan importante en términos de pérdida de tiempo y energía que la selección ha favorecido su minimización (Hansell 2000). Tamaños de nido reducidos (p.ej. Snow 1978), robo de materiales de los nidos de conoespecíficos (p.ej. Carrascal et al. 1995; Moreno et al. 1995), o la usurpación de nidos dentro de y entre especies (p.ej. Lindell 1996), son algunos ejemplos que apoyan esta idea. En el herrerillo capuchino (*Parus cristatus*), que anida en cavidades, la fecha de puesta puede adelantarse si el macho ayuda a la hembra en la construcción del nido, lo que redundaría en mejores posibilidades de supervivencia para los polluelos, y la decisión del macho de ayudar o no depende de su condición corporal (Lens et al. 1994).

Los herrerillos comunes *Parus caeruleus* nidifican en cavidades o

agujeros ya excavados en árboles, y aceptan de buen grado las cajas-nido cuando se les proporcionan. Construyen un nido en forma de copa, que consiste en una base de musgo, a menudo mezclado con paja o hierba seca, y un forro hecho de hierba fina seca, pelo, lana o algunas plumas. En algunos casos, se añaden al nido algunos fragmentos de plantas verdes que pudieran contener compuestos secundarios con propiedades antiparasitarias (Lambrechts y Dos Santos 2000). El nido lo construye la hembra sola (Cramp y Perrins 1998), si bien se ha documentado que el macho puede colaborar en determinados casos (Lens et al. 1994). Siguiendo la clasificación de Hansell (2000), las técnicas de construcción empleadas por el herrerillo incluyen la acumulación del musgo, el entrelazado de los fragmentos de paja y hierba seca, y finalmente el enredado cuidadoso de los materiales del cuenco.

Para las especies que anidan en cavidades, hay una limitación obvia sobre el tamaño del nido inherente a las dimensiones de la cavidad (p.ej. Karlsson y Nilsson 1977; Slagsvold 1989a). Por ello, los estudios en cajas-nido representan un escenario ideal para estudiar la variación en el tamaño del nido en una especie que nidifica en

cavidades, puesto que todas las parejas reproductoras comienzan la construcción en una cavidad de dimensiones conocidas e idénticas. Por otra parte, la mayoría de los estudios sobre características de los nidos están basados en medidas del nido obtenidas después de que los polluelos hayan volado, a pesar de que la incubación y la crianza de los polluelos pueden provocar perturbaciones en las características del nido (p.ej. Palomino et al. 1998). Los nidos de algunas especies que anidan en cavidades poseen una estructura delicada que no puede manipularse sin ser dañada. En cambio, los nidos de herrerillo común permiten la manipulación, ya que son una estructura compacta que puede sacarse con facilidad y devolverse a la caja-nido tras su exploración.

En nuestra población de estudio, los nidos de herrerillo muestran una gran variabilidad de tamaños, por lo que el propósito de este estudio es explorar los factores que determinan dicha variabilidad, a la luz de dos de las hipótesis planteadas. Si los requerimientos de termorregulación son primordiales, predecimos una asociación negativa del peso del nido con la fecha de puesta y la duración del período de incubación, y positiva con el éxito de eclosión. Si el tamaño del

nido o su construcción actúan como una señal de la condición corporal de la hembra, predecimos una asociación positiva del peso del nido con alguna medida indicadora de su salud.

MATERIAL Y MÉTODOS

Área de estudio y medidas de los nidos

El estudio se llevó a cabo en un bosque caducifolio de roble melojo (*Quercus pyrenaica*) situado en Valsain (Segovia, 40°54'N, 4°01'O, 1200 m s.n.m.). La población de herrerillo común (*Parus caeruleus*) que nidifica en cajas-nido en esta área ha sido estudiada desde 1991 (Sanz 2002). Cada año, las cajas nido (área interna de la base: 125 x 117 mm) son inspeccionadas periódicamente para determinar los parámetros reproductores, y son vaciadas al final de la estación reproductora. Se estimó el período de incubación como el tiempo transcurrido desde la puesta del penúltimo huevo hasta la fecha de eclosión. Como estimador del tamaño del nido y el esfuerzo de construcción, se registró el peso del nido. En 2001, se retiraron cuidadosamente los huevos durante la puesta y se sacaron los nidos

de la caja-nido para obtener su peso con una balanza portátil de precisión 0.1 g (Pocket-240; Gram Precision, S.L., Barcelona). En 2002, se obtuvo el peso de los nidos a los tres días de edad de los polluelos, a fin de evitar la manipulación de los huevos. En 2004, se registró el peso de varios nidos de herrerillo en estos dos momentos, mostrando que ambas medidas están fuertemente correlacionadas ($r^2 = 0.90$, $p = 0.015$, $n = 5$), como se ha demostrado en otros estudios (p.ej. Hoi et al. 1996). En 2005, se obtuvo el peso y se midió la altura (desde el fondo de la caja hasta el borde del cuenco) de varios nidos durante la incubación, para probar que el peso del nido es un buen estimador de su tamaño ($r^2 = 0.88$, $p < 0.001$, $n = 14$).

Medidas de los adultos

A los tres días de edad de los polluelos (fecha de eclosión = día 0), se capturó a los adultos mientras alimentaban a los polluelos en las cajas-nido. Machos y hembras fueron datados como juveniles o de más de un año según Svensson (1992), y se obtuvo su peso corporal con una balanza de precisión 0.05 g. Inmediatamente tras la captura, se extrajo sangre de la vena braquial de

las hembras con la ayuda de un capilar heparinizado. Una gota de sangre fue extendida sobre un portaobjetos para la detección de parásitos sanguíneos, y el resto fue centrifugado (2000 x g, 5 min) con una centrífuga portátil (Labnet, Mini Centrifuge, Cat. N° 1201-220V, Woodbridge, NJ, USA). Las fracciones plasmáticas fueron separadas y congeladas para su posterior análisis. Los frotis sanguíneos se dejaron secar al aire inmediatamente y después se fijaron con etanol (96 %) y se tiñeron con Giemsa (1/10 v/v) durante 45 min. Una de las dos mitades simétricas de cada frotis fue examinada al microscopio a 200 aumentos en busca de parásitos grandes como *Trypanosoma* o *Leucocytozoon*, mientras que los parásitos intracelulares más pequeños como *Haemoproteus* fueron detectados a 1000 aumentos (Merino y Potti 1995; Merino et al. 1997). A partir de la muestra de plasma, se determinaron los niveles de inmunoglobulinas mediante ELISA directo empleando un anticuerpo anti-gallina conjugado con peroxidasa (Sigma), según Martínez et al. (2003, Capítulo 3).

Análisis estadísticos

Para evitar la pseudorreplicación, los datos de las hembras que criaron en ambos años se emplearon sólo una vez (2001 ó 2002), según una selección aleatoria, en aquellos análisis en que se juntaron los dos años. Se llevaron a cabo correlaciones o ANOVA para examinar las relaciones entre el peso del nido y cada variable individualmente. Se realizó un modelo de regresión general (GRM, Statsoft 2001) aplicando resolución por pasos hacia atrás para identificar los factores significativos que determinaron el peso del nido. El peso del nido se introdujo como variable dependiente, con el año y la prevalencia de *Trypanosoma* de la hembra como variables categóricas y la fecha de puesta, el tamaño de puesta, el período de incubación y el éxito de eclosión como variables continuas. Asimismo, se exploraron las interacciones entre año y prevalencia de *Trypanosoma*, año y período de incubación, y año y éxito de eclosión. Los parásitos sanguíneos para los que no se detectó ningún efecto sobre el peso del nido en ninguno de los dos años de estudio no fueron incluidos en el GRM. En los análisis que incluyen el período de incubación, se descartaron

los nidos con períodos de incubación estimados superiores a una desviación típica sobre la media de la población. El éxito de eclosión (proporción de huevos que eclosionan) se transformó con el arcoseno de la raíz cuadrada antes de emplear tests paramétricos. Los niveles de inmunoglobulinas en los análisis son los residuos una vez controlado el efecto de la variabilidad que existe entre placas. No fue posible comparar los niveles de inmunoglobulinas entre años, ya que los análisis de laboratorio se realizaron en años distintos con lotes de anticuerpo distintos, y no se incluyeron controles en las placas de ELISA. La repetibilidad del peso del nido de la hembra entre años se estimó calculando el coeficiente de correlación intraclase. Los componentes de la varianza se estimaron con un ANOVA de una vía (Lessels y Boag 1987; Sokal y Rohlf 1995). Todos los análisis son de dos colas. Los valores mostrados son medias \pm error estándar.

RESULTADOS

Inicialmente, se incluyeron en el estudio un total de 162 nidos (103 en 2001 y 59 en 2002). El peso de los nidos contruidos por los herrerillos en

nuestra población de estudio osciló entre 13.3 g y 38.5 g, con una media de 24.6 ± 0.44 g ($n = 135$). La repetibilidad (R) entre años del peso del nido construido por las mismas hembras fue significativa ($R = 0.33$; $F_{26,27} = 2.00$; $p = 0.040$; $n = 27$). El peso del nido no difirió entre años ($t = 0.75$; $gl = 133$; $p = 0.456$), y tampoco el tamaño de puesta (test de la U de Mann-Whitney: $Z = -0.49$; $p = 0.622$). Las fechas de puesta ($t = -4.04$; $gl = 133$; $p < 0.001$) y de eclosión ($t = -2.02$; $gl = 130$; $p = 0.045$) fueron más tempranas en 2001 que en 2002. El período de incubación fue más largo en 2001 que en 2002 ($t = 2.77$; $gl = 103$; $p = 0.007$). El éxito de eclosión fue mayor en 2002 que en 2001 ($t = -3.00$; $gl = 130$; $p = 0.003$).

El peso del nido no estuvo correlacionado con la fecha ni el tamaño de puesta en ninguno de los dos años ($p > 0.50$), pero se correlacionó negativamente con la fecha de eclosión ($F_{1,128} = 4.56$; $p = 0.034$; año: $F_{1,128} = 1.95$; $p = 0.165$; año x fecha de eclosión: $F_{1,128} = 2.02$; $p = 0.157$), de modo que las puestas eclosionaron antes en los nidos más grandes. El período de incubación fue significativamente más corto en los nidos más grandes (Fig. 1a; peso del nido: $F_{1,101} = 4.73$; $p = 0.032$; año:

$F_{1,101} = 4.24$; $p = 0.042$; fecha de puesta: $F_{1,101} = 26.77$; $p < 0.001$). Las puestas más tempranas tuvieron períodos de incubación más largos que las puestas más tardías (Fig. 1b). Solamente en 2002, los nidos más grandes mostraron un mayor éxito de eclosión ($r_{59} = 0.27$, $p = 0.035$; Fig. 2). Sin embargo, el peso del nido estuvo

sólo marginalmente correlacionado con el éxito de eclosión cuando se controló por el año y la fecha de puesta (peso del nido: $F_{1,127} = 3.55$; $p = 0.062$; año: $F_{1,127} = 2.10$; $p = 0.149$; fecha de puesta: $F_{1,127} = 11.38$; $p = 0.001$; peso del nido x año: $F_{1,127} = 3.66$; $p = 0.058$).

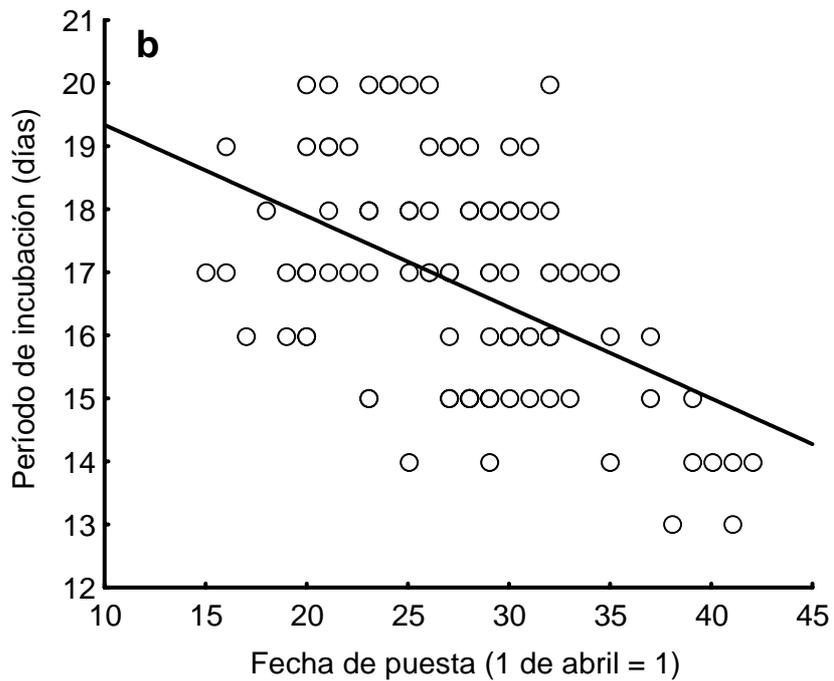
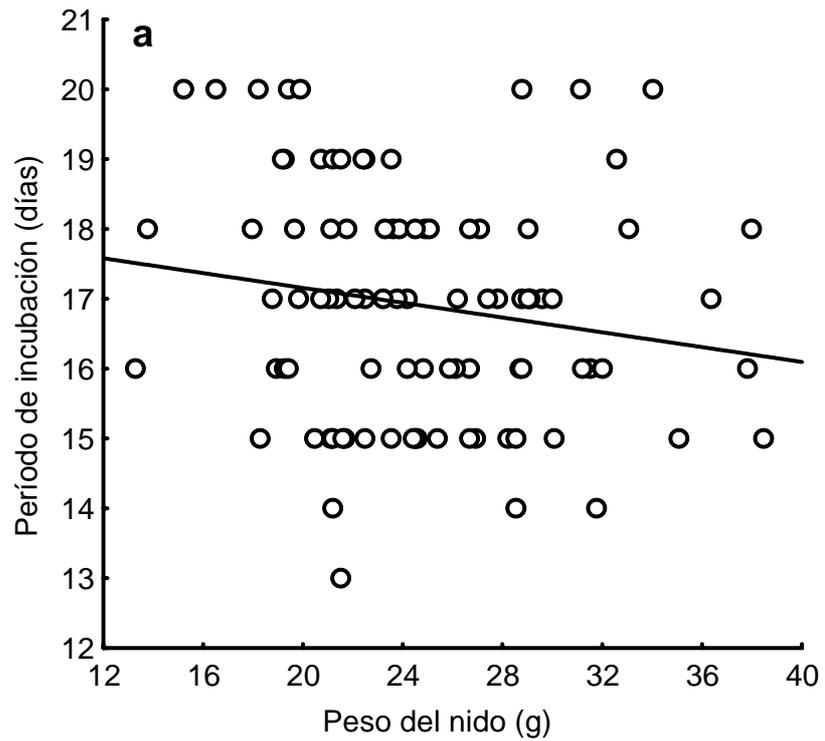


Fig. 1. (a) Relación entre el peso del nido de los herrerillos comunes y el período de incubación. (b) Relación entre la fecha de puesta (1 de abril = 1) y el período de incubación para los nidos de herrerillo común.

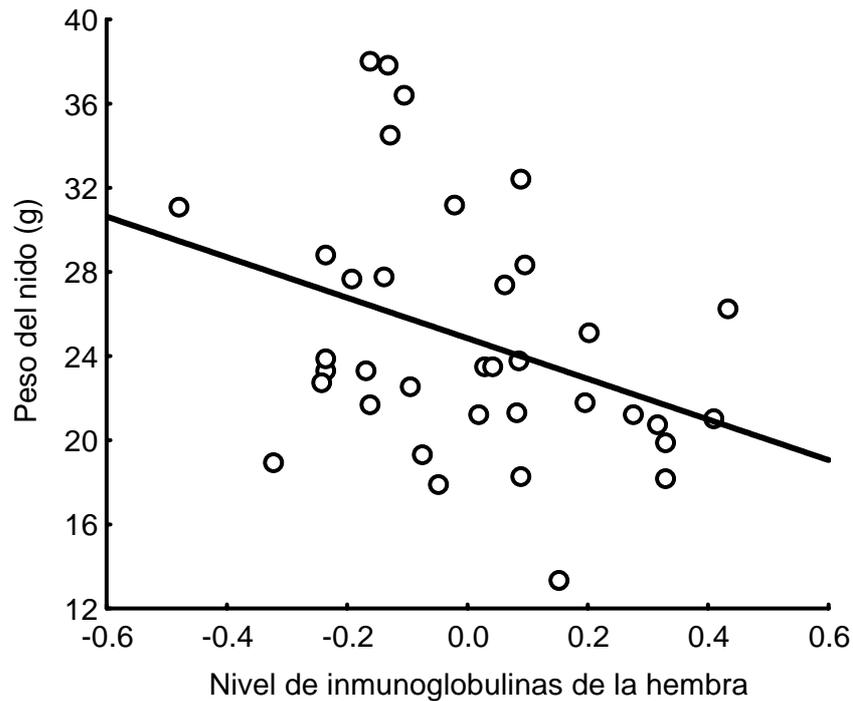


Fig. 3. Relación entre el peso del nido de los herrerillos comunes y el nivel de inmunoglobulinas de la hembra a los tres días de edad de los polluelos en 2001. Los valores de inmunoglobulinas son residuos tras controlar por la variabilidad entre placas.

El análisis GRM mostró que, al controlar por otras variables (véase Material y métodos), la fecha de puesta ($F_{1,87} = 4.79$; $p = 0.031$) y el período de incubación ($F_{1,87} = 6.18$; $p = 0.015$; Fig. 1a) estuvieron relacionados significativamente de forma negativa con el peso del nido. Asimismo, se encontró una interacción significativa

entre el año y la prevalencia de *Trypanosoma* de la hembra ($F_{1,87} = 5.03$; $p = 0.028$). Las hembras infectadas por *Trypanosoma* construyeron nidos más pequeños que las no infectadas en 2001 (test LSD de Fisher: $p = 0.025$; Fig. 4), pero no en 2002 (test LSD de Fisher: $p = 0.865$).

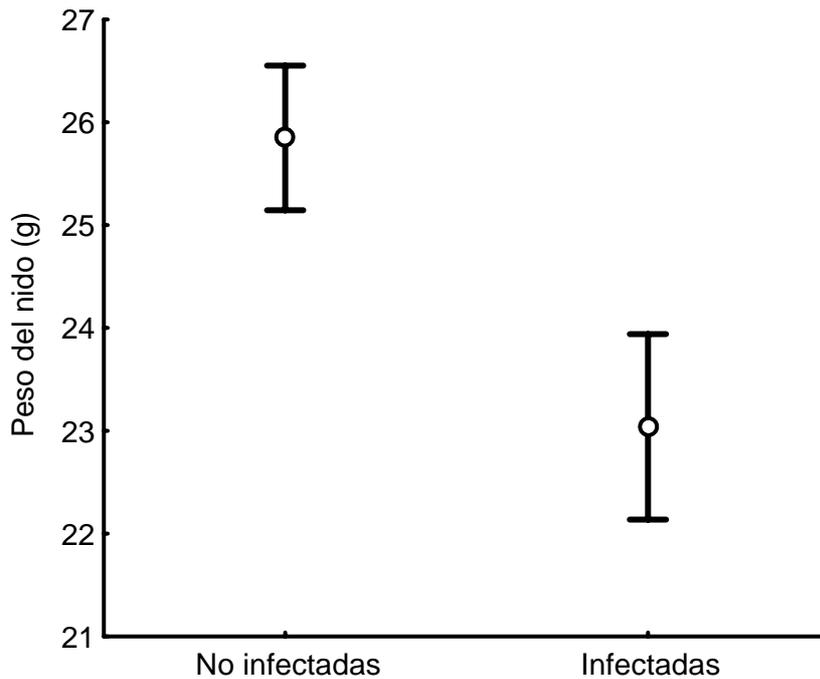


Fig. 4. Medias \pm error estándar del peso del nido construido por las hembras de herrerillo común infectadas o no por *Trypanosoma avium* en 2001.

DISCUSIÓN

El nido y los comportamientos asociados a su construcción son rasgos mostrados por los individuos de la mayoría de las especies de aves, pues el nido tiene la importante función de proporcionar protección para los huevos y los polluelos. La construcción del nido implica complejos comportamientos, desde la selección de un lugar adecuado para nidificar hasta la decoración del nido que exhiben algunas especies. Las investigaciones sobre la reproducción de las aves se han centrado fundamentalmente en el

intervalo que va desde la cópula (p.ej. estudios sobre paternidad) hasta la emancipación de los polluelos, mientras que el proceso de construcción del nido ha recibido menos atención en la literatura sobre las estrategias vitales de las aves (Hansell 2000). Esta falta de atención ha estado originada por la suposición de que los costes de construcción del nido son despreciables en comparación a los costes de la incubación y la crianza de los polluelos.

En nuestro estudio, el peso de los nidos construidos por las hembras de herrerillo fue significativamente

repetible entre años. Hasta donde sabemos, ningún otro estudio ha documentado estimaciones de repetibilidad para un carácter directamente relacionado con el tamaño del nido.

Para especies que construyen nidos abiertos, se han documentado relaciones entre el tamaño del nido y el tamaño de la puesta en estudios descriptivos (p.ej. Møller 1982) y experimentales (p.ej. Soler et al. 2001). Hasta donde sabemos, el único estudio que ha explorado esta relación en una especie que nidifica en cavidades ha sido llevado a cabo en una población de carbonero común (*Parus major*) que cría en cajas-nido (Alabrudzińska et al. 2003), donde se encontró que el peso del nido estaba negativamente correlacionado con el tamaño de la puesta. En nuestro estudio no se encontró ninguna relación entre el tamaño del nido y el tamaño de la puesta. El tamaño de puesta puede estar positivamente asociado con otras características del nido como el diámetro interno o el volumen del cuenco (Slagsvold 1989b), lo que supone la base de otra hipótesis propuesta para explicar la variación en el tamaño del nido, pero cuya exploración no es el objetivo de este estudio.

Encontramos una relación entre el peso del nido y la fecha de eclosión, de tal modo que las puestas eclosionaron antes en los nidos más grandes. Esta diferencia se debió a que los nidos más grandes tuvieron períodos de incubación más cortos que los nidos más pequeños. Este resultado apoya la hipótesis de la termorregulación, puesto que indicaría que los nidos más grandes son más capaces de mantener la temperatura de los huevos y minimizar las fluctuaciones de temperatura (White y Kinney 1974; Whittow y Berger 1977; Kern 1984; Hoi et al. 1994). En este sentido, Lombardo et al. (1995) mostraron que el aislamiento del nido afecta al rendimiento reproductor de la golondrina canadiense (*Tachycineta bicolor*), ya que los nidos donde se eliminó experimentalmente el forro de plumas tuvieron períodos de incubación más largos que los nidos control. Asimismo, se ha demostrado que la densidad del nido o el grosor de su pared afectan al flujo de calor y la conductancia térmica (Whittow y Berger 1977; Skowron y Kern 1980). De la misma manera, Hoi et al. (1994) mostraron que los nidos más grandes del pájaro moscón (*Remiz pendulinus*) podrían mantener la temperatura de los huevos durante aproximadamente cinco

minutos más que los nidos más pequeños, cuando las hembras abandonaran el nido para alimentarse. Además, encontramos que las puestas más tempranas tuvieron períodos de incubación más largos que las puestas más tardías. Esto podría explicarse en base a que los herrerillos que se reproducen antes en la estación se tienen que enfrentar a unas temperaturas ambientales más frías que los más tardíos, lo que probablemente complica el proceso de incubación. El aislamiento térmico del nido debería ser más importante cuando sea más probable que el estrés térmico afecte al éxito reproductor (Wiebe 2001). Así, construir un nido más grande puede ser más importante para las hembras más tempranas, y nosotros encontramos que las fechas de puesta más tempranas se asociaron con los nidos más grandes, como cabría esperar.

Por otra parte, la relación entre el peso del nido y el éxito de eclosión apoyaría también la hipótesis de la termorregulación. Un nido mejor aislado permite un mejor desarrollo embrionario de los polluelos, evitando la muerte causada por hipotermia (White y Kinney 1974; Drent 1975). Møller (1982) encontró un menor éxito de eclosión en los nidos pequeños de golondrina común *Hirundo rustica* que

en los nidos grandes. Alabrudzińska et al. (2003) encontraron que el éxito de eclosión de los huevos de carbonero común estaba asociado positivamente con el peso del musgo y con su proporción sobre el peso total del nido, pero no con el peso del nido. La relación que nosotros documentamos fue observada solamente en uno de los dos años de estudio, y fue marginalmente significativa tras controlar por año y por fecha de puesta. Quizá la variación interanual en las condiciones ambientales podría explicar este resultado, ya que hemos mostrado que en el segundo año de estudio el éxito de eclosión fue mayor y los períodos de incubación más cortos que en el primero.

Hemos mostrado que la prevalencia de infección por tripanosomas está relacionada con la variabilidad observada en el peso del nido de los herrerillos en uno de los años de estudio. Este resultado apoya la idea de que la construcción del nido puede ser una actividad costosa en algunas especies, ya que sólo aquellas hembras en mejor estado de salud podrían ser capaces de construir un nido grande. Quizá una estación reproductora más favorable en 2002 en relación a 2001 podría explicar por qué el efecto de la infección por *Trypanosoma* sobre el

peso del nido fue detectado sólo en 2001. Así, existiría un compromiso entre el estado de salud y la inversión en la reproducción que podría ser detectado tan pronto como en el proceso de construcción del nido. Hasta donde sabemos, sólo dos estudios (Lens et al. 1994; Broggi y Senar 2000) han documentado una relación entre la construcción del nido y algún parámetro relacionado con el estado de salud, una presunción necesaria para considerar la construcción del nido como un carácter sujeto a selección sexual. En este sentido, se observó una relación negativa entre el nivel de inmunoglobulinas de la hembra y el peso del nido, sólo en el primer año de estudio. Por otra parte, se ha mostrado en un estudio interespecífico que el tamaño del nido está correlacionado con la respuesta inmune celular (Soler et al. 2004). Este hecho apoya la idea de que la construcción del nido es una actividad costosa, no sólo en términos de consumo de energía y tiempo, sino también porque la inmunosupresión mediada por hormonas durante la reproducción incrementa la susceptibilidad a los parásitos y otras enfermedades, y por tanto las especies que invierten más en la construcción del nido deberían poseer un sistema inmune más fuerte (Soler et al. 2004).

Se ha demostrado que el tamaño del nido en el carbonero común se relaciona con la coloración del plumaje de la hembra (Broggi y Senar 2000). Asumiendo que los nidos de herrerillo son construidos por la hembra (Cramp y Perrins 1998), si el nido o su actividad de construcción son evaluados por los machos para obtener información sobre el estado de salud de la hembra o su disposición a invertir en la reproducción, como predice la teoría de la señalización sexual (Moreno et al. 1994; Soler et al. 1998a), los machos deberían modificar su esfuerzo parental en consecuencia (Burley 1986; Sheldon 2000). Por ello, sería interesante registrar medidas de la inversión reproductora del macho y estudiar su posible asociación con las características del nido en especies donde es la hembra quien construye.

En resumen, hemos mostrado que el peso del nido en esta especie está principalmente ajustado a los requerimientos de termorregulación de la puesta, y que algunas medidas de la salud de la hembra influyen en el esfuerzo de construcción del nido en algunos años, dependiendo probablemente de las condiciones ambientales. Nuestros resultados dejan abierta una puerta prometedora para toda una serie de manipulaciones del

tamaño del nido en especies que nidifican en cavidades. En la bibliografía sobre estrategias vitales en aves, es bastante común encontrar estudios donde la puesta o la nidada se han manipulado experimentalmente con el fin de detectar compromisos reproductivos. Por el contrario, las características del nido han sido consideradas menos frecuentemente, incluso en lo que se refiere a aproximaciones no experimentales. Por ello, la importancia que el nido y su proceso de construcción tienen para el período reproductor es todavía poco conocida, aunque parece cierto que un mayor esfuerzo de investigación sobre las propiedades del nido, como su tamaño, su forma o su composición material, puede desvelar relaciones

subyacentes importantes sobre aspectos clave de la biología reproductora de las aves (Hansell 2000).

AGRADECIMIENTOS

Javier Donés (Montes de Valsaín) concedió los permisos necesarios para trabajar en el área de estudio, mientras que la Junta de Castilla y León autorizó el anillamiento y la manipulación de las aves. Este estudio se financió con los proyectos BOS2000-1125 y BOS2003-05724 del Ministerio de Ciencia y Tecnología (SM) y BOS2001-0587 (J. Moreno). Agradecemos a Tonantzin Calvo, Inma Nogueras y José Llama por su ayuda. J. Morales disfrutó de una beca FPI del Ministerio de Ciencia y Tecnología. GT disfrutó parcialmente de una beca FPI de la Comunidad de Madrid y de una beca de alojamiento en la Residencia de Estudiantes del Ayuntamiento de Madrid. Este estudio es una contribución a la investigación desarrollada en la estación de campo “El Ventorrillo”.

REFERENCIAS

- ALABRUDZIŃSKA J, KALIŃSKI A, SŁOMCZYŃSKI R, WAWRZYŃIAK J, ZIELIŃSKI P, BAŃBURA J. 2003. Effects of nest characteristics on breeding success of Great Tits *Parus major*. *Acta Ornithologica* **38**: 151–154.
- BROGGI J, SENAR JC. 2000. Color del plumaje y tamaño del nido en el carbonero común. En: *Acta VIII Congreso Nacional y V Iberoamericano de Etología*, Granada, p. 57.
- BURLEY N. 1986. Sexual Selection for Aesthetic Traits in Species with Biparental Care. *American Naturalist* **127**: 415–445.
- CARRASCAL LM, MORENO J, AMAT JA. 1995. Nest maintenance and stone theft in the chinstrap penguin (*Pygoscelis antarctica*). 2. Effects of breeding group size. *Polar Biology* **15**: 541–545.
- COLLIAS NE, COLLIAS EC. 1984. *Nest Building and Bird Behaviour*. Princeton University Press, Princeton.
- CRAMP S, PERRINS CM. 1998. *The Complete Birds of the Western Palearctic on CD-ROM*. Version 1.0 for PC. Oxford University Press, Oxford.

- DE NEVE L, SOLER JJ. 2002. Nest-building activity and laying date influence female reproductive investment in magpies: an experimental study. *Animal Behaviour* **63**: 975–980.
- DRENT RH. 1975. Incubation. En: Farner DS, King JR (eds.) *Avian Biology*. Academic Press, New York, pp. 333–420.
- HANSELL M. 2000. *Bird Nests and Construction Behaviour*. Cambridge University Press, Cambridge.
- HOI H, SCHLEICHER B, VALERA F. 1994. Female mate choice and nest desertion in Penduline Tits, *Remiz pendulinus*: the importance of nest quality. *Animal Behaviour* **48**: 743–746.
- HOI H, SCHLEICHER B, VALERA F. 1996. Nest size variation and its importance for mate choice in penduline tits, *Remiz pendulinus*. *Animal Behaviour* **51**: 464–466.
- KARLSSON J, NILSSON SG. 1977. The influence of nest-box area on clutch size in some hole nesting passerines. *Ibis* **119**: 207–211.
- KERN MD. 1984. Racial differences in nests of White-crowned Sparrows. *Condor* **86**: 455–466.
- LAMBRECHTS MM, DOS SANTOS A. 2000. Aromatic herbs in Corsican blue tit nests: The “Potpourri” hypothesis. *Acta Oecologica* **21**: 175–178.
- LENS L, WAUTERS LA, DHONDT AA. 1994. Nest-building by crested tit *Parus cristatus* males: an analysis of costs and benefits. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **35**: 431–436.
- LESSELLS CM, BOAG PT. 1987. Unrepeatable repeatabilities: a common mistake. *Auk* **104**: 116–121.
- LINDELL C. 1996. Patterns of nest usurpation: when should species converge on nest niches? *Condor* **98**: 464–473.
- LOMBARDO MP, BOSMAN RM, FARO CA, HOUTTEMAN SG, KLUSZA TS. 1995. Effect of feathers as nest insulation on incubation behaviour and reproductive performance of tree swallows (*Tachycineta bicolor*). *Auk* **112**: 973–981.
- MARTÍNEZ J, TOMÁS G, MERINO S, ARRIERO E, MORENO J. 2003. Detection of serum immunoglobulins in wild birds by direct ELISA: a methodological study to validate the technique in different species using anti-chicken antibodies. *Functional Ecology* **17**: 700–706.
- MERINO S, POTTI J. 1995. High prevalence of hematozoa in nestlings of a passerine species, the pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*). *Auk* **112**: 1041–1043.
- MERINO S, POTTI J, FARGALLO JA. 1997. Blood parasites of some passerine birds from central Spain. *Journal of Wildlife Diseases* **33**: 638–641.
- MØLLER AP. 1982. Clutch size in relation to nest size in the Swallow *Hirundo rustica*. *Ibis* **124**: 339–343.
- MORENO J, BUSTAMANTE J, VIÑUELA J. 1995. Nest maintenance and stone theft in the chinstrap penguin (*Pygoscelis antarctica*). 1. Sex roles and effects on fitness. *Polar Biology* **15**: 533–540.
- MORENO J, SOLER M, MØLLER AP, LINDÉN M. 1994. The function of stone carrying in the black wheatear, *Oenanthe leucura*. *Animal Behaviour* **47**: 1297–1309.
- PALOMINO JJ, MARTÍN-VIVALDI M, SOLER M, SOLER JJ. 1998. Functional significance of nest size variation in the Rufous Bush Robin *Cercotrichas galactotes*. *Ardea* **86**: 177–185.

- SANZ JJ. 2002. Climate change and breeding parameters of great and blue tits throughout the Western Palearctic. *Global Change Biology* **8**: 409–422.
- SHELDON BC. 2000. Differential allocation: tests, mechanisms and implications. *Trends in Ecology and Evolution* **15**: 397–402.
- SKOWRON C, KERN M. 1980. The insulation in nests of selected North American songbirds. *Auk* **97**: 816–824.
- SLAGSVOLD T. 1989a. On the evolution of clutch size and nest size in passerine birds. *Oecologia* **79**: 300–305.
- SLAGSVOLD T. 1989b. Experiments on clutch size and nest size in passerine birds. *Oecologia* **80**: 297–302.
- SNOW DW. 1978. The nest as a factor determining clutch-size in tropical birds. *Journal für Ornithologie* **119**: 227–230.
- SOKAL RR, ROHLF FJ. 1995. *Biometry*. W.H. Freeman and Company, New York.
- SOLER JJ, MØLLER AP, SOLER M. 1998a. Nest building, sexual selection and parental investment. *Evolutionary Ecology* **12**: 427–441.
- SOLER JJ, CUERVO JJ, MØLLER AP, DE LOPE F. 1998b. Nest building is a sexually selected behaviour in the barn swallow. *Animal Behaviour* **56**: 1435–1442.
- SOLER JJ, DE NEVE L, MARTÍNEZ JG, SOLER M. 2001. Nest size affects clutch size and the start of incubation in magpies: an experimental study. *Behavioral Ecology* **12**: 301–307.
- SOLER JJ, MØLLER AP, MARTÍN-VIVALDI M. 2004. El tamaño de los nidos covaría con el grado de respuesta inmune en paseriformes. En: *Acta X Congreso Nacional y VII Iberoamericano de Etología*, Aguadulce (Almería), p. 104.
- STATSOFT, INC. 2001. *STATISTICA (data analysis software system)*, version 6. www.statsoft.com.
- SVENSSON L. 1992. *Identification Guide to European Passerines*. Lars Svensson, Stockholm.
- WESOŁOWSKI T, CZESZCZEWIK D, ROWIŃSKI P, WALANKIEWICZ W. 2002. Nest soaking in natural holes – a serious cause of breeding failure? *Ornis Fennica* **79**: 132–138.
- WHITE FN, KINNEY JL. 1974. Avian incubation. *Science* **186**: 107–115.
- WHITTOW GC, BERGER AJ. 1977. Heat loss from the nest of the Hawaiian Honeycreeper, “Amakihi”. *Wilson Bulletin* **89**: 480–483.
- WIEBE KL. 2001. Microclimate of tree cavity nests: is it important for reproductive success in Northern Flickers? *Auk* **118**: 412–421.

Conclusiones

1. La evaluación de la respuesta al estrés mediada por HSPs es una herramienta nueva y eficaz para la evaluación del estrés fisiológico y ambiental de los organismos y sus poblaciones. Nuestros resultados pretenden facilitar futuras investigaciones en estudios de campo, al indicar que no es necesario centrifugar y congelar las muestras de sangre inmediatamente tras su obtención, sino que es suficiente con mantenerlas en una nevera portátil. La centrifugación y la congelación pueden realizarse hasta 8 horas después de la extracción, ya que en este tiempo no se producen variaciones en los niveles de HSP70 o HSP60.

2. Presentamos un sencillo protocolo útil para determinar la cantidad de inmunoglobulinas presentes en el plasma sanguíneo de diferentes especies de aves silvestres, mediante un

ELISA directo y empleando un anticuerpo anti-gallina fácil de obtener a través de varias compañías comerciales.

3. Encontramos evidencia experimental de que la infección por parásitos sanguíneos induce una respuesta de estrés en aves en condiciones naturales, y detectamos la existencia de costes del parasitismo o de las defensas fisiológicas frente a él sobre la eficacia biológica. Nuestros resultados sugieren que la condición inicial de las aves juega un papel importante en la respuesta de estrés frente a los parásitos, e indican que el parasitismo, la respuesta de estrés y la función inmunitaria pueden estar estrechamente interconectados.

4. Una disminución experimental de las parasitosis sanguíneas y la reducción asociada de los niveles de inmunoglobulinas permiten a las hembras destinar más recursos hacia el cuidado parental, resultando en beneficios para los polluelos. Así, apoyamos la existencia del compromiso entre esfuerzo reproductor y defensa inmune en un sistema hospedador-parásito natural, ayudando a entender el significado evolutivo de la conexión entre el parasitismo, la respuesta inmune, las decisiones de estrategias vitales y la eficacia biológica.

5. Un experimento de manipulación del tamaño de la nidada permitió detectar disminuciones de los niveles de HSP60 en las hembras que atendieron nidadas reducidas, y de los niveles de inmunoglobulinas en las que atendieron nidadas aumentadas. Nuestros resultados sugieren que el estrés fisiológico podría ser un factor limitante del esfuerzo parental durante la reproducción de los herrerillos.

6. Los herrerillos que reutilizan cavidades que contienen nidos viejos de la estación anterior pagan un coste causado por la presencia de ectoparásitos. Este coste surgió en términos de un menor éxito reproductor y un menor peso corporal de las hembras tras la reproducción. Detectamos un coste adicional en forma de mayor infección por parásitos sanguíneos en las hembras cuanto mayor fue la abundancia de ectoparásitos. Los costes de reutilización de los nidos podrían verse reducidos en aquellas áreas y/o años con baja incidencia del ectoparasitismo.

7. La variabilidad observada en el tamaño del nido del herrerillo parece estar adaptada principalmente a las necesidades de termorregulación de la puesta. Algunas medidas de la salud de la hembra pueden estar involucradas en el esfuerzo destinado a la construcción del nido en algunos años, lo que apoyaría la hipótesis de que el tamaño del nido y su proceso de construcción puede ser rasgos sujetos a selección sexual.

Esta Tesis está basada en los siguientes trabajos:

TOMÁS G, MARTÍNEZ J, MERINO S. 2004. Collection and analysis of blood samples to detect stress proteins in wild birds. *Journal of Field Ornithology* **75**: 281-287.

MARTÍNEZ J, TOMÁS G, MERINO S, ARRIERO E, MORENO J. 2003. Detection of serum immunoglobulins in wild birds by direct ELISA: a methodological study to validate the technique in different species using antichickens antibodies. *Functional Ecology* **17**: 700-706.

TOMÁS G, MERINO S, MARTÍNEZ J, MORENO J, SANZ JJ. 2005. Stress protein levels and blood parasite infection in blue tits (*Parus caeruleus*): a medication field experiment. *Annales Zoologici Fennici* **42**: 45-56.

TOMÁS G, MERINO S, MORENO J, MORALES J, MARTÍNEZ-DE LA PUENTE J. Immunoglobulin level and parental effort adjustment in relation to blood parasite infection: a medication field experiment on a wild passerine. *Journal of Animal Ecology*. En revisión.

MERINO S, MORENO J, TOMÁS G, MARTÍNEZ J, MORALES J, MARTÍNEZ-DE LA PUENTE J, OSORNO JL. Effects of parental effort on variation in blood stress protein HSP60 and immunoglobulins in female blue tits: a brood size manipulation experiment. *Oikos*. En revisión.

TOMÁS G, MERINO S, MORENO J, MORALES J. Consequences of parasitism and nest reuse for female blue tits (*Parus caeruleus*). *Oecologia*. En revisión.

TOMÁS G, MERINO S, MORENO J, SANZ JJ, MORALES J, GARCÍA-FRAILE S. Nest weight, incubation efficiency and female health in the blue tit (*Parus caeruleus*). *Auk*. En revisión.

