



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**RESPUESTA INMUNE CELULAR SEGÚN EL ORDEN
DE ECLOSIÓN DE HEMBRAS DE BOBO DE PATAS
AZULES Y SUS CRÍAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G A
P R E S E N T A:

MA. CRISTINA CARMONA ISUNZA

DIRECTOR DE TESIS:
DR. HUGH MICHAEL DRUMMOND DUREY



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno

Carmona

Isunza

María Cristina

55 49 16 01

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

403054372

2. Datos del tutor

Dr.

Hugh Michael

Drummond

Durey

3. Datos del sinodal 1

M. en C.

Nieves María Cristina

Rodríguez

Juárez

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Gary

García

Espinosa

5. Datos del sinodal 3

Dra.

Alejandra

Núñez

de la Mora

6. Datos del sinodal 4

M. en C.

Fabrice

Dentressangle

7. Datos del trabajo escrito

Respuesta inmune celular según el orden de eclosión de hembras de bobo de patas azules y sus crías

60 p

2009

Para todos aquellos que hacen ciencia
sólo por el placer de conocer
y saber más de la naturaleza...

“Science is the poetry of reality.”
Richard Dawkins

“No experience is a cause of success or failure.
We do not suffer from the shock of our experiences so-called trauma-
but we make out of them just what suits our purposes.”
Alfred Adler

AGRADECIMIENTOS

A todos los que sembraron mi inquietud por la biología. Aquellos excelentes profesores tanto de la secundaria como de la preparatoria: Mireya Casamityana, Eduardo Acosta y Carlos Ramos. Aquéllos quienes al aire supieron transmitir la emoción y asombro que representan la biología, la evolución y la conducta. A todos los profesores extraordinarios de la facultad que me enseñaron la biología, la evolución y su importancia.

A mi tutor Hugh Drummond, porque siendo un mago de la ciencia supo guiarme hacia el final, pero sobretodo hacia un comienzo... cultivando no sólo mi interés por la conducta sino por la investigación.

A mis padres por apoyar mi decisión de ser bióloga y compartir mi entusiasmo. Siempre dispuestos a ayudarme y a presionarme para cumplir mis objetivos. A mi hermana por su apoyo implícito.

A la familia que siempre ha estado: Mari, Ceci, Emma Rosa. Siempre pendientes y apoyando, demostrando interés hacia mi y lo que hago.

A mi abuelito, fuente de inspiración y motivación. Siempre quise compartir este momento con él, porque sé que más que nadie, compartía conmigo un interés nato por conocer y saber de la naturaleza.

A mis tíos y primos que siempre celebran los logros junto conmigo.

A todos mis amigos que apoyaron y vivieron, desde cerca, el tortuoso y largo proceso de mi titulación, entre muchas cosas más: Penélope Martínez, María Chávez, Brenda Flores, Karla Aranzábal, Víctor Ramírez, Gerardo Suárez. Y a los que además me acompañaron durante toda la carrera, en las buenas, en las malas, siempre...consejos, aliento, risas y sobretodo porque sé que siempre estarán ahí: María Chávez, Penélope Martínez, Brenda Flores, Karla Aranzábal.

A todos esos grandes amigos que conocí gracias a la Isla y con los que compartí una o dos increíbles e inolvidables temporadas: Oscar Sánchez Macouzet, Christian Montes, Natalia Lifshitz, Alejandra Ramos, Fabrice Dentressangle, René Beamonte, Tulio González, Judith Morales, Emma Villaseñor, Mirna Hernández, Jaime Villareal, Beatríz Peña, Aressia García, Sin-Yeon Kim. Así como a aquellos que conocí en el laboratorio de conducta y que presionaron, hecharon porras y celebraron: Irene Barbosa, Eira Bermúdez, Omar Arellano, Ruth Tejeda, Alejandro Chelén, Constantino Macías.

Especialmente a aquéllos con los que inicié este camino y con los que compartí las mismas dudas, temores, logros y emociones. Muchas veces ayudaron a aclarar dudas, poner en orden mis ideas y mis escritos o me permitieron ver ideas nuevas: Oscar Sánchez Macouzet, Natalia Lifshitz y Christian Montes.

Un especial agradecimiento a Alejandra Núñez de la Mora, quien comenzó con este proyecto y lo impulsó. Siempre al pendiente de cualquier duda y siempre con la mejor disposición de ayudarme con sus comentarios y sugerencias.

A quienes ayudaron en el desarrollo de este proyecto cuando apenas era una idea: Roxana Torres, Fabrice Dentressangle, Alejandro Córdoba, Gary García y Julio Carrero.

A todos aquéllos que en algún momento me ayudaron con las interminables capturas y las interminables fitos: Natalia Lifshitz, Ileri Brumón, Cristina Rodríguez Juárez, Christian Montes, Karina Lagunes, Víctor Flores, René Beamonte, Judith Morales, Alejandra Ramos. Y una mención especial, que no puede pasar desapercibida, a Ileri Brumón por mi ahora desaparecida cicatriz.

Especialmente a Fabrice Dentressangle y René Beamonte por enseñarme en campo las técnicas necesarias. A Cristina Rodríguez Juárez por su ayuda en campo, creatividad, apoyo y enseñarme a usar la base de datos. A María Chávez por enseñarme todo lo que tenía que saber de técnicas moleculares. A Penélope Martínez, Nuria Flores, Christian Montes, Alejandra Ramos por su ayuda en los interminables sexados. A Sin-Yeon Kim por enseñarme la poca estadística complicada que creo conocer.

Agradezco a mis sinodales, por leer mi tesis y por sus útiles comentarios: Cristina Rodríguez Juárez, Alejandra Núñez de la Mora, Fabrice Dentressangle y Gary García.

A todos los pescadores de la Isla Isabel que hacen posible una estancia llena de risas y comida, por apoyar siempre al campamento, además de una bonita amistad: Yamaha, Poli, Ángel, Caín, Nando, Ito, Chero, Víctor, Chapo, el abuelo, Fabiola.

Agradezco a la SEMARNAT y a la Armada de México por su apoyo logístico, a CONACyT y al Instituto de Ecología de la UNAM por su apoyo económico para la realización de este trabajo.

A la única máxima casa de estudios: la Universidad Autónoma de México.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
El bobo de patas azules como modelo de estudio.....	10
MÉTODO.....	15
Monitoreo de la colonia.....	15
Elección de la muestra.....	15
Reto Inmune.....	16
Pilotaje.....	17
Aplicación del reto inmune.....	17
Medición de la respuesta inmune celular a PHA (RIC).....	18
Sexado.....	20
Análisis Estadístico.....	21
Condición corporal.....	21
Relación RIC/orden de eclosión y condición corporal/orden de eclosión.....	22
RESULTADOS.....	24
Efecto del orden de eclosión en la condición corporal.....	24
Respuesta inmune celular en crías de 5 días de edad.....	29
Respuesta inmune celular en crías de 20 días de edad.....	31
Respuesta inmune celular en hembras de 3-8 años de edad.....	34
Condición corporal en crías de 5 días de edad según la edad de la madre.....	35
Inversión materna según el orden de eclosión.....	36
DISCUSIÓN.....	37
Respuesta inmune celular y condición corporal a los 5 días de edad.....	37
Respuesta inmune celular y condición corporal a los 20 días de edad.....	39
Respuesta inmune celular, condición corporal e inversión materna de hembras de 3-8 años de edad.....	43
BIBLIOGRAFÍA.....	46
APÉNDICE I.....	56
APÉNDICE II.....	58
Extracción de ADN.....	58
Amplificación y Electroforesis.....	58
APÉNDICE III.....	69

Resumen

Las condiciones adversas durante el desarrollo temprano podrían perjudicar el crecimiento, metabolismo, inmunocompetencia, fecundidad y atractivo sexual de los organismos, influyendo en su adecuación. En nidadas de dos crías de bobo de patas azules se desarrolla una relación de dominancia-subordinación donde las segundas crías en eclosionar son agredidas por el hermano mayor y sufren deficiencias en nutrición y crecimiento, acompañadas por niveles elevados de corticosterona circulante. Para saber si estas circunstancias adversas influyen en la condición corporal y en la respuesta inmune celular (RIC) durante la infancia o la vida adulta, se pesó, se midió el pico, la ulna y la RIC de crías de diferente orden de eclosión (primeras, segundas y únicas) de ambos sexos a las edades de 5 ó 20 días y en hembras reproductivas adultas de 3 a 8 años de edad. Las crías de 5 días de edad con diferente orden de eclosión tuvieron condición corporal y RIC similares. Cuando la relación de dominancia-subordinación estaba establecida, a los 20 días de edad, hembras segundas crías fueron inferiores a hembras únicas y primeras en condición corporal e inferiores a hembras primeras crías en RIC. Sin embargo, en hembras reproductivas de entre 3 y 8 años de edad dichas diferencias estuvieron ausentes, aunque se observó una tendencia no significativa de hembras segundas crías a tener menor condición corporal que hembras primeras y únicas. Además, el orden de eclosión de las hembras no estuvo relacionado con la condición corporal o la RIC de sus crías. Sin embargo, la edad de la madre se relacionó negativamente con la RIC de sus crías a los 5 días de edad. Hembras únicas, primeras y segundas de 3-8 años de edad no parecieron diferir en cuanto a su inversión materna, pero la edad de una madre afectó negativamente la capacidad de inversión. Aparentemente ejercer la dominancia o sufrir las desventajas de la subordinación no tuvo un costo entre los 3 y 8 años de vida sobre la condición corporal, la RIC o la inversión materna.

INTRODUCCIÓN

El fenotipo es el producto de la influencia de factores ambientales en el genotipo (información genética) de un individuo. Los factores ambientales abarcan las influencias no-genéticas que actúen antes, durante y después del desarrollo de un individuo (Futuyma, 1998). Los factores ambientales que afectan el fenotipo pueden ser abióticos y bióticos. Los abióticos son aquellos componentes físico-químicos del ambiente tales como el tipo de suelo, la humedad, la cantidad de luz o la temperatura. Los bióticos los constituyen los seres vivos y las relaciones que se establecen entre ellos, por ejemplo el alimento (otros organismos o sus productos), la densidad de la población, depredadores, parásitos, competidores incluyendo conespecíficos y otras especies (Futuyma, 1998).

La variación del fenotipo como respuesta a los cambios en el ambiente se denomina plasticidad fenotípica (Callahan et al., 1997). La plasticidad fenotípica se encuentra regulada por las “normas de reacción” (juego de fenotipos que un mismo genotipo expresa en ambientes diferentes) lo que permite a los organismos adaptar su fisiología, comportamiento o incluso su morfología en respuesta a un ambiente variable (Piersma & Lindstrom, 1997). Las variaciones generadas por las distintas condiciones ambientales pueden repercutir en el éxito reproductivo de los individuos (Lindström, 1999) y por lo tanto en su adecuación (número de descendientes). Las variaciones del fenotipo que disminuyan el éxito reproductivo no serán adaptativas, pero otras pueden ser respuestas adaptativas a algún estímulo del medio. Los genotipos con normas de reacción que más se acerquen al fenotipo óptimo en un ambiente dado (aquel fenotipo que resulte en un aumento en el éxito reproductivo) han evolucionado por selección natural (Futuyma, 1998).

Los factores ambientales tienen un impacto mayor en etapas tempranas del desarrollo (Desai & Hales, 1997; Lindström, 1999). En esta etapa los individuos son más sensibles a cambios en el medio debido a que estos cambios funcionan como señales ambientales que predicen cómo será el ambiente en el que se desarrollarán. Con base en estas señales se lleva a cabo una programación metabólica irreversible que desarrollará el mejor fenotipo para el ambiente esperado en etapas postnatales y adultas (Desai & Hales, 1997; Gluckman et al., 2005). Uno de los factores del ambiente que más ha sido estudiado durante el desarrollo temprano (que abarca desde la concepción hasta la madurez sexual) es la desnutrición (Lindström, 1999). Un déficit nutricional durante el desarrollo temprano puede deberse a una baja disponibilidad de alimento o a una inversión parental pobre (calidad de huevo o provisión deficiente de alimento; Metcalfe & Monaghan, 2001). Hay evidencia de que un déficit nutricional repercute negativamente sobre el crecimiento (Kogel, 1997), el metabolismo (Verhulst et al., 2006), la inmunocompetencia (Saino et al., 1997), la fecundidad (Gorman & Nager, 2004), y en la adultez, tanto en el estatus de dominancia (Royle et al., 2005) como en el atractivo sexual (Gustafsson et al., 1995). Dado que estas características afectan directa o indirectamente el éxito reproductivo y la calidad de la descendencia, un déficit nutricional puede eventualmente afectar la adecuación del individuo (Metcalfe & Monaghan, 2001).

Se ha demostrado de forma experimental que existen efectos inter-generacionales negativos a causa de un déficit nutricional durante el desarrollo temprano (Naguib & Gil, 2005; Alonso-Alvarez et al., 2007). Por ejemplo, Naguib, et al. (2006) criaron hembras de pinzón cebrado (*Taeniopygia guttata*) cuyas madres habían crecido en nidadas de tamaños diferentes (2-6 crías), bajo el supuesto de que las crías de nidadas grandes tienen un acceso

al alimento más restringido que las crías de nidadas pequeñas. Las hijas de madres crecidas en nidadas grandes fueron de menor tamaño y su éxito reproductivo (número de crías eclosionadas, número de crías emplumadas) fue menor que el de las hijas de madres crecidas en nidadas pequeñas. Esto demuestra que los efectos negativos de la experiencia temprana pueden percibirse incluso en la siguiente generación y la condición de los padres puede influenciar directa o indirectamente la adecuación de sus hijos.

Durante la etapa prenatal, los organismos están sujetos al ambiente experimentado por la madre (Mousseau & Fox, 1998): en especies ovíparas desde la formación de los huevos, la incubación, hasta la eclosión; en especies vivíparas, desde la fecundación hasta el nacimiento. En las especies en las que existe cuidado parental (incluyendo insectos, peces, aves, reptiles, anfibios y mamíferos) además de influencias durante etapas prenatales, los individuos están sujetos a influencias postnatales relacionadas con la inversión de los padres. Una inversión deficiente en la calidad de los huevos, el tiempo de incubación y la cantidad de alimento proporcionado podría afectar la tasa de crecimiento y otras variables como la inmunocompetencia, masa corporal, caracteres sexuales secundarios y sobrevivencia de las crías (Price, 1998) que directa o indirectamente tienen un impacto en la adecuación. Cualquier cambio en el fenotipo que sea provocado por la condición de los padres desde el momento de la concepción y durante el cuidado parental postnatal, que no tenga relación directa con el genotipo del individuo, se considera un efecto parental (Futuyma, 1998). Dada la relativa mayor inversión por parte de las hembras en la reproducción, los efectos maternos suelen tomarse más en cuenta que los paternos. Un factor relacionado con los efectos maternos que puede afectar la sobrevivencia y condición de las crías en aves es la edad de la madre. Las diferencias entre individuos de distinta edad

radican en la producción de huevos, tiempo de incubación y habilidad para cuidar a sus crías/huevos (Daunt et al., 1999; Bogdanova et al., 2006; Bogdanova et al., 2007). En general, los individuos jóvenes tienen fechas de puesta tardías, nidadas y crías más pequeñas y un desempeño reproductivo menor que individuos maduros (Daunt et al., 1999; Hegyi et al., 2006; Bogdanova et al., 2007).

Dado que algunos factores del medio ambiente pueden repercutir negativamente sobre la adecuación de un individuo, se espera que la selección natural favorezca mecanismos que disminuyan dicho impacto. Se ha comprobado que existen estrategias de compensación que permiten a los organismos responder a mejoras en las condiciones ambientales de manera que los efectos negativos de las condiciones adversas sean amortiguadas (Metcalf & Monaghan, 2001). Por ejemplo, el crecimiento compensatorio que es la forma de compensación más documentada, en la que los individuos que han experimentado un periodo de crecimiento lento posteriormente entran a una fase de crecimiento acelerado cuando las condiciones mejoran (Metcalf & Monaghan, 2001).

La condición de un individuo se relaciona con su capacidad de alimentarse, habilidad para defenderse tanto de sus conespecíficos como de parásitos y en general de acoplarse a las presiones ambientales (Jakob et al., 1996). Por lo tanto, la condición es reflejo del potencial reproductivo (adecuación) de un individuo. Debido a que el sistema inmune juega un papel crucial en la defensa contra agentes patógenos y en aumentar la sobrevivencia del organismo (Lochmiller & Deerenberg, 2000), una reducción en la inmunocompetencia (i.e., la habilidad de montar una defensa inmune efectiva) puede afectar negativamente su adecuación (Norris & Evans, 2000). El sistema inmune demanda niveles notables de energía y nutrientes, por lo que si es mantenido aun en condiciones desfavorables, significa

que es importante evolutivamente al asegurar la sobrevivencia del individuo (Lochmiller & Deerenberg, 2000). La alta demanda de nutrientes que implica mantener un sistema inmune competente así como montar una respuesta inmune a antígenos/patógenos provoca que estos procesos puedan estar sometidos a una disyuntiva o “trade-off”. Debido a que la energía es limitada, los nutrientes se dividen entre los procesos vitales que compiten entre sí, de manera que aquellos nutrientes que se destinan al sistema inmune serán desviados de la inversión en otros procesos como el crecimiento, termorregulación y reproducción y vice versa (Sheldon & Verhulst, 1996). Siguiendo esta lógica, la inmunocompetencia se considera un buen indicador del estado fisiológico de los individuos, ya que sólo aquellos individuos en buena condición son capaces de sostener los compromisos energéticos que implica el mantener un sistema inmune competente (Norris & Evans, 2000; Lochmiller & Deerenberg, 2000).

El sistema inmune tiene dos componentes: el celular y el humoral. Ambos están involucrados en la respuesta inmune adaptativa y en la respuesta inmune innata, la primera hace referencia a la capacidad del sistema para reconocer y responder a antígenos con los que el individuo ya haya estado en contacto anteriormente (memoria inmunológica). La respuesta inmune innata, por el contrario, es la primera línea de protección del organismo y no requiere una exposición previa a un patógeno. Ésta actúa mediante la activación de fagocitos que reclutan a otros fagocitos, reconocen al patógeno y lo ingieren (fagocitosis) para eliminarlo (Roitt et al., 2000).

Cuando la respuesta innata no es suficiente para eliminar al patógeno, los linfocitos T o células T (llamadas así debido a que maduran en el Timo) son activados y se inicia la respuesta inmune celular. Las células T pueden matar mediante apoptosis (muerte celular

programada) a las células infectadas por el patógeno, producir señales para que los macrófagos destruyan al organismo patógeno mediante fagocitosis o enviar señales a las células B (o linfocitos B) para activarlas y que éstas secreten anticuerpos contra los antígenos. Esta última fase en la que las células B (llamadas así por su maduración, en el caso de las aves, en la Bursa de Fabricio) son activadas para la secreción de anticuerpos se conoce como la fase humoral de la respuesta inmune (Roitt et al., 2000; Alberts et al., 2002).

En la práctica, existen dos formas de evaluar la inmunocompetencia de un organismo: técnicas de monitoreo y retos inmunes. Los monitoreos son realizados mediante conteos celulares de leucocitos presentes en una muestra de sangre, ya sea contando células macrófagas o linfocitos. El número de células está relacionado con el estado de salud y la condición del sistema inmune al momento del muestreo (Norris & Evans, 2000). Por otro lado, los retos inmunes consisten en exponer al sistema inmune a un antígeno y cuantificar la respuesta celular o humoral (según el tipo de antígeno administrado). La intensidad de la respuesta a dicho reto se considera como una medida de inmunocompetencia (Norris & Evans, 2000). Una intensidad mayor de respuesta indica un buen estado de salud y una buena condición general. En este estudio se utilizó como reto inmune la inoculación de un mitógeno: fitohemaglutinina (PHA por sus siglas en inglés) que ocasiona la proliferación de linfocitos T (Roitt et al., 2000), provocando una hinchazón medida 24 hrs. después de la inoculación (ver Método “Reto Inmune”). Representa un índice de la capacidad proliferativa de las células T y por lo tanto de la respuesta inmune celular (RIC).

Investigaciones en aves han demostrado que la inmunocompetencia de los individuos es afectada por varios factores: (1) las hormonas depositadas en huevo, concentraciones altas

de testosterona y/o corticosterona en huevo se relaciona con una inmunocompetencia deprimida (Rubolini et al., 2005; Cucco et al., 2008), concentraciones altas de androstenediona en yema se relacionan con una mejor inmunocompetencia (Dentressangle & Torres, en preparación); (2) el sexo: en general los machos, por ser de mayor tamaño, presentan inmunocompetencias deprimidas y una mayor susceptibilidad a parásitos, como consecuencia de diferencias entre sexos en cuanto a las hormonas circulantes, en particular la testosterona, o a la distribución de los recursos (Möller et al., 1998; Fargallo et al., 2002; Tschirren et al., 2003; Wilk et al., 2007); (3) el tamaño de la nidada: en pinzones cebrá (*Taeniopygia guttata*) y golondrinas comunes (*Hirundo rustica*) se relaciona inversamente con la RIC de las crías (Saino et al., 1997; Verhulst et al., 2005), presumiblemente porque la cantidad de alimento provisto por los padres a cada cría es menor en nidadas grandes que en nidadas pequeñas; (4) el orden de eclosión (Saino et al., 2001; Müller et al., 2003; Roulin et al., 2003; Martin-Vivaldi et al., 2006; Parejo et al., 2007; Eraud et al., 2008); (5) el esfuerzo parental, la inmunocompetencia de los padres también se ve afectada negativamente por el esfuerzo que implica mantener una nidada grande (Saino et al., 1997; Moreno et al., 1999). El balance entre alimento ingerido y esfuerzo afecta la masa corporal de un individuo, la que a su vez se relaciona positivamente con su RIC (Saino et al., 1997; Christe et al., 1998; Tella et al., 2001; Moreno et al., 2005; Verhulst et al., 2005; Martin-Vivaldi et al., 2006).

La relación entre la RIC y el orden de eclosión varía. La RIC de segundas crías de la gaviota reidora (*Larus ridibundus*) tendió a ser menor que la respuesta de crías únicas y primeras crías, en donde además los machos eclosionados de un segundo huevo tuvieron una respuesta menor que las hembras eclosionadas de un segundo huevo (Müller et al.,

2003). Contrario a este patrón, en la golondrina común (*Hirundo rustica*) las crías últimas en eclosionar tuvieron una RIC mayor que las primeras quienes están expuestas a un riesgo mayor de parasitismo (Saino et al., 2001). De igual forma, en la carraca (*Coracias garrulus*) las crías más pequeñas de cada nidada tuvieron el sistema inmune innato (evaluado mediante conteos de leucocitos) más desarrollado que las crías eclosionadas primero, posiblemente como consecuencia de una mayor distribución de inmunoglobulinas a segundos huevos por parte de la madre (Parejo et al., 2007).

En el ave abubilla (*Upupa epops*) los factores que afectan la RIC dependen del orden de eclosión de la cría: en primeras y segundas crías, la RIC aumenta con la fecha de eclosión. El riesgo de parasitismo aumenta conforme avanza la temporada reproductiva, y por lo tanto la RIC aumenta al avanzar la temporada. La RIC de segundas crías aumenta con la masa corporal. Las segundas crías tienen un acceso más limitado a los recursos por la competencia con su hermano mayor y posiblemente sólo las segundas crías mejor alimentadas y con una mejor condición corporal son capaces de mantener en buen estado el sistema inmune (Martin-Vivaldi et al., 2006).

Los estudios de adopción recíproca de huevos permiten separar la calidad genética de la ambiental, y algunos han demostrado que la variación en la RIC se debe más al ambiente en el que se desarrollan las crías que a los genes (Tella et al., 2000; Soler et al., 2003). A su vez, el estado de muda de la madre está relacionada con la RIC de sus crías. En el papamoscas cerrojillo (*Ficedula hypoleuca*) la RIC de las crías fue menor si la madre estaba mudando. Las hembras en estado de muda tienen una menor condición debido a los costos combinados del cuidado de sus crías y de la generación de un nuevo plumaje (Moreno et al., 2005).

En resumen, la RIC de crías está relacionada directamente con su propia calidad corporal e indirectamente con la calidad de sus padres, ya que esta última se relaciona a su vez con la calidad y cantidad de inversión parental proporcionada a sus crías. Además, una mejor RIC en crías se relaciona con una mayor probabilidad de sobrevivencia (Christe et al., 1998; Müller et al., 2003) y con una mayor probabilidad de regresar a la colonia a reproducirse (Moreno et al., 2005).

El bobo de patas azules como modelo de estudio

La mayoría de los estudios de efectos de condiciones adversas experimentadas durante el desarrollo sobre algún carácter fenotípico han utilizado el tamaño de nidada como medida indirecta de la cantidad de alimento, asumiendo que los individuos en nidadas más grandes comen menos (Gustafsson et al., 1995; Kogel, 1997; Saino et al., 1997; Verhulst et al., 2005; Verhulst et al., 2006). Otros estudios manipulan de manera directa la cantidad de alimento disponible (Gorman & Nager, 2004; Royle et al., 2005). El bobo de patas azules (*Sula nebouxii*) ofrece un modelo para estudiar el efecto de condiciones adversas en el desarrollo temprano sobre la condición corporal y la RIC sin necesidad de manipulación experimental. Las crías hermanas de estas aves marinas pelecaniformes experimentan una relación de dominancia-subordinación, lo que provoca que crías de jerarquía menor reciban mayor cantidad de agresión (Drummond et al., 1998) y tengan niveles de estrés elevados (Nuñez de la Mora et al., 1996), así como un acceso restringido al alimento (Osorno & Drummond, 1995). Por otro lado, la colonia de bobos de patas azules en la Isla Isabel se ha estudiado desde 1981 hasta la fecha y se tiene registró de la historia reproductiva y la experiencia social de la mayoría de los individuos adultos que llegan a anidar a la colonia.

Dicha información permite estudiar los efectos de la experiencia temprana en la condición corporal y la RIC de adultos durante su vida reproductiva temprana.

El establecimiento de la jerarquía de dominancia-subordinación en el bobo de patas azules es facilitado por el intervalo de eclosión de cuatro días entre las crías. La diferencia de edades otorga a la primera cría una clara ventaja competitiva en términos de peso, tamaño y madurez. Tal ventaja de las primeras crías, aunada al hecho de que los padres regurgitan el alimento directamente en el pico de las crías (Nelson, 2005), permite a la cría más grande acaparar la mayor cantidad de alimentaciones (Osorno & Drummond, 1995). En nidadas de dos crías, generalmente, la primera cría asume el papel de dominante atacando y amenazando diariamente a la segunda cría, quien presenta una agresión mínima y respuestas de sumisión (Drummond et al., 1986; Nelson, 2005). El nivel de agresión que recibe la segunda cría desde que eclosiona hasta los 11 días de edad es bajo, los niveles de agresión aumentan a un pico máximo entre los días 16-21 de edad de la segunda cría y disminuyen entre los días 21-26 días de edad, cuando los papeles de dominancia-subordinación se han aprendido (Valderrábano-Ibarra et al., 2007). Bajo condiciones de escasez de alimento, el incremento en la agresión por parte de la cría dominante ocasiona la muerte de la segunda cría (fratricidio facultativo), ya sea directamente mediante picotazos o indirectamente al expulsarla fuera del nido en donde muere de inanición o es atacada por otros bobos de nidos vecinos (Drummond et al., 1986; Nelson, 2005).

La asimetría entre las primeras y segundas crías comienza desde el huevo. Al menos en un año de “El Niño” (cuando las condiciones alimenticias son adversas), las madres invierten de manera diferencial en los huevos de su nidada, a pesar de que el tamaño los huevos no difiere, los segundos huevos tienen un 10% menos de yema que los primeros

(Drummond et al., 2008). A diferencia de otras especies, la cantidad de andrógenos depositados no difiere significativamente entre primeros y segundos huevos (Drummond et al., 2008). Durante las primeras tres semanas posteriores a la eclosión, la tasa de crecimiento es mayor en primeras crías, las cuales pesan en promedio 11% más que sus hermanos (segundas crías) a la misma edad (Drummond et al., 1986). Además, las primeras crías reciben mayor cantidad de alimentaciones durante la primera semana de vida en comparación con segundas crías (Guerra & Drummond, 1995). La diferencia en peso entre primeras y segundas crías desaparece, en los machos, a las 7 semanas de edad y en las hembras, hasta aproximadamente las 10 semanas de edad (Drummond et al., 1991). Alrededor de la semana 3 y 10 de vida, las segundas crías presentan una tasa de crecimiento mayor que la de primeras crías (Drummond et al., 1991), la cual les permite llegar al emplumado con tamaño y peso similares a los de sus hermanos (Drummond et al., 1991; Drummond et al., 2003). Este crecimiento acelerado podría considerarse compensatorio, lo cual puede ocurrir si las condiciones mejoran después de un déficit nutricional (Metcalf & Monaghan, 2001). Las hembras segundas crías tardan más tiempo en alcanzar el peso de primeras crías ya que en la edad adulta son de mayor tamaño que los machos (Drummond et al., 1986). Las primeras crías sobreviven significativamente más que segundas crías hasta los 70d (53.5% versus 41.8%; García & Saavedra 1997). Sin embargo, aunque puede variar por cohorte, en general, la probabilidad de segundas crías de reclutar (regresar a la colonia como adulto reproductivo) no difiere respecto a la de primeras crías (Drummond et al., 2003).

La existencia de una jerarquía de dominancia-subordinación no sólo se relaciona con niveles nutricionales y de crecimiento bajos, además de mortalidades altas para segundas crías, sino también con niveles hormonales diferentes. En crías de 15-20 días de edad, los

niveles de corticosterona (hormona relacionada con la sumisión y el estrés) son 109% más altos en segundas crías (subordinadas) que en primeras crías (dominantes) y que en crías únicas (Nuñez de la Mora et al., 1996). Se considera que los niveles elevados de corticosterona en segundas crías son el reflejo del estrés e inanición (Vallarino et al., 2006). Cuando los niveles de esta hormona se mantienen elevados durante días o semanas, pueden producir efectos negativos a largo plazo (Sapolsky 1992 en: Drummond et al., 2003), por ejemplo, pérdida de masa muscular, inhibición del sistema inmune o reducción en la capacidad reproductiva (Creel, 2001).

El conocimiento de los costos de ejercer la dominancia para las primeras crías es limitado, pues no se han hecho estudios de las diferencias en el desempeño de crías primeras y únicas (quienes nunca han experimentado la presencia de un hermano).

En individuos observados hasta los 5 y 10 años de edad no se encontraron diferencias entre primeras y segundas crías en cuanto a la edad, la fecha de puesta, el tamaño de nidada o en el éxito de la nidada de su primera reproducción. Posiblemente la muestra de adultos estuvo sesgada hacia aquellas crías segundas “fuertes” que lograron emplumar y reclutar, dado que aquéllas crías segundas que sucumbieron al estrés de la subordinación e inanición fueron eliminadas naturalmente de la muestra (Drummond et al., 2003).

Las diferencias asociadas a la relación de dominancia entre primeros y segundos huevos, y entre primeras y segundas crías en estrés agonístico y nutricional, crecimiento, concentración de corticosterona circulante, podría tener efectos negativos sobre la RIC y la condición corporal de primeras y segundas crías. Para evaluar los posibles efectos negativos, se midieron la RIC y la condición corporal de crías primeras, segundas y únicas de ambos sexos a las edades de 5 ó 20 días y, en hembras exclusivamente, cuando se reproducían a la edad de 3 a 8 años.

Dado que la agresión entre crías hermanas empieza cuando la primera tiene aproximadamente 9 días de edad y la segunda 5 días de edad, se espera que cualquier diferencia en la RIC o condición corporal de crías únicas, primeras y segundas a los 5 días de edad sea resultado de una inversión materna diferencial en los huevos y no de diferencias en experiencia agonística o en la alimentación temprana. Sin embargo, si el estrés agonístico y nutricional asociado a la subordinación o a la dominancia afectan el sistema inmune y crecimiento durante la infancia y a largo plazo, se espera que segundas crías tengan RIC y condición corporal menor que las primeras y éstas a su vez menor que crías únicas a la edad de 20 días y a los 3-8 años de edad.

Adicionalmente, si el estrés agonístico y nutricional involucrado en la dominancia-subordinación infantil repercute negativamente en la inversión que realiza una hembra años más tarde en sus huevos o crías, se espera que la condición corporal y RIC de crías de madres segundas crías sea menor que la de crías de madres primeras crías y éstas a su vez menor que crías de madres únicas. Para lo cuál se midió la RIC y condición corporal de crías de 5 y 20 días de edad pertenecientes a madres de entre 3 y 8 años de edad que crecieron como cría única, primera o segunda.

MÉTODO

Monitoreo de la colonia

Desde 1981 a la fecha el laboratorio de Conducta Animal del Instituto de Ecología ha generado una extensa base de datos con información sobre la reproducción e historia de vida de los bobos de patas azules (*Sula nebouxii*) de la Isla Isabel, Nayarit, México (21°52'N, 105°54'W). Esta información proviene del monitoreo que se realiza cada temporada reproductiva en dos áreas de la colonia.

Al inicio de cada temporada reproductiva, durante el pico de eclosión (4 febrero \pm 26 días al 13 abril \pm 17 días, Peña en preparación), se marcan todos los nidos con huevos o crías. A lo largo de aproximadamente 5 meses, hasta el final del período de emplumado (aproximadamente mediados de julio), se lleva a cabo un monitoreo de los nidos estacados así como de todos los nidos nuevos que aparecen durante el transcurso de la temporada. Los nidos se visitan cada 3 días y se registran las puestas, eclosiones y la sobrevivencia de crías; además, se marca cada pollo según el orden de eclosión. A la edad de 70 días, (cuando alcanzado su tamaño de pico y ulna máximos y ha transcurrido el 76% del tiempo requerido para emplumar; Drummond et al., 2003) cada individuo es pesado, se miden el pico y la ulna y es marcado con un anillo de metal numerado.

Elección de la muestra

En 2007 se estudiaron hembras de 3 a 8 años de edad presentes en la colonia con nido, provenientes de nidadas de una sola cría o de nidadas de dos crías en donde *ambas* crías sobrevivieron hasta la edad de 70 días. Las hembras cuyos nidos en el primer día de

revisión tuvieron huevos se registraron cada tercer día hasta eclosionar las crías, momento en el que la nidada se asignó al azar a uno de los dos grupos para la aplicación del reto inmune a 5 días o 20 días de edad. En 27 de 113 nidos las crías estaban presentes en la primera revisión, en lugar de asignar el grupo al azar, se asignaron al grupo más cercano a su edad que fue estimada con base en curvas de crecimiento de crías de 1981.

Reto Inmune

Un tipo de reto inmune es la inoculación subcutánea de la fitohemaglutinina (PHA por sus siglas en inglés; Stadecker et al., 1977; Smits et al., 1999; Tella et al., 2002; Martin et al., 2006), método utilizado en este estudio. La PHA es una proteína generada por el frijol (*Phaseolus vulgaris*) que se une a moléculas presentes en la superficie de las células T y las activa (Roitt et al., 2000). Al activarse, las células T mandan señales a otras células T circulantes para que se dirijan al sitio donde se encuentra el antígeno, lo que ocasiona una proliferación de linfocitos T que se manifiesta en una hinchazón o roncha en el sitio en el que se inoculó la PHA. El tamaño de la roncha se considera un indicador indirecto de la capacidad proliferativa de las células T. Dicha respuesta inmune celular a PHA (RIC) es un indicador confiable de la inmunidad celular *in vivo*, y ha sido utilizada comúnmente para evaluar la respuesta inmune celular en aves (Stadecker et al., 1977; Smits et al., 1999). En este estudio se aplicó el método simplificado de Smits et al. (1999).

Pilotaje

Se realizó un pilotaje para estimar la edad mínima a la cual es factible obtener una respuesta inmune a la PHA, así como calcular las dosis y concentraciones óptimas de PHA que generan un cambio medible en el grosor de la membrana alar (ver “Aplicación del reto”) a las 24 horas de inocular el mitógeno. En crías de 2 días de edad no se logró medir el grosor de la membrana alar con el micrómetro, mientras que en crías de 5 días de edad la medición fue exitosa. Se dividieron aleatoriamente 6 crías, de 5 días de edad, en 3 grupos y cada grupo recibió una concentración distinta de PHA disuelta en amortiguador de fosfatos (PBS, con pH de 7.4): 2:1, 1:1, 1:2. Cada concentración se inoculó en dos crías en dos volúmenes, 0.1 ml en una cría y 0.05 ml en la otra. Cada concentración utilizada provocó una roncha medible, pero se eligió el volumen de 0.05 ml porque era más sencillo de inocular en crías pequeñas. Dado que no hubo diferencias apreciables en el tamaño de la roncha provocada por las tres concentraciones probadas, se optó por la concentración intermedia de 1:1 (PHA: PBS).

Aplicación del reto inmune

Se midieron el pico y la ulna utilizando una cinta métrica con resolución de 1 mm. Posteriormente se pesó utilizando un dinamómetro (± 5 g para crías de 5 días, ± 10 g para crías de 20 días y ± 50 g para las hembras adultas). Se limpió con agua y se marcó con plumón indeleble el área de la membrana alar o patagio del ala izquierda (Figura 1) donde se inocularía la PHA (L8902, Sigma-Aldrich) y se midió por triplicado el grosor del área marcada utilizando un micrómetro (Mitutoyo, 293-330 para hembras adultas y crías de 20

días; el modelo Mitutoyo, 331-111 con una superficie de medición más angosta para crías de 5 días, ambos con resolución de 0.001mm) (Figura 2). El micrómetro se ajustó hasta que se observó que la piel se plegó un poco. Se inocularon 0.1 ml (con 0.2 mg de PHA en 0.1 ml de PBS) a hembras de 3-8 años cuando su cría mayor tuvo entre 15 y 20 días de edad y a crías del grupo de 20 días a los 20.39 ± 0.13 días de edad (Velandó et al. 2006). A las crías del grupo de 5 días se les inocularon 0.05 ml (con 0.05 mg de PHA en 0.05 ml de PBS) a los 4.98 ± 0.04 días de edad.

Transcurridas 24 h de haber inoculado la PHA, se capturó al individuo nuevamente, se midió por triplicado el grosor de la roncha en el área marcada con el plumón y se pesó antes de liberar. La recaptura de 45 de 113 hembras no ocurrió sino hasta unas horas después de cumplidas las 24 h (26.14 ± 0.29), por lo que el intervalo entre mediciones se incluyó en los análisis estadísticos. La segunda medición de las crías ocurrió 24.18 ± 0.03 h después del inóculo. Las manipulaciones se realizaron entre las 07:00 h y las 12:00 h y duraron aproximadamente 20 min por cada individuo.

Medición de la respuesta inmune celular a PHA (RIC)

La RIC se considera como el cambio en grosor (en mm) de la membrana alar después de 24 h de iniciado el reto antigénico (Smits et al., 1999). Pruebas de confiabilidad intra-mediciones (utilizando el coeficiente de correlación intraclase) demostraron que hubo una alta repetibilidad entre las mediciones iniciales ($r = 0.98$, $P < 0.001$, $n = 256$) y entre las finales ($r = 0.98$, $P < 0.001$, $n = 256$). Se calculó el índice de la respuesta inmune celular a PHA como la diferencia entre los promedios de la primera y segunda medición.

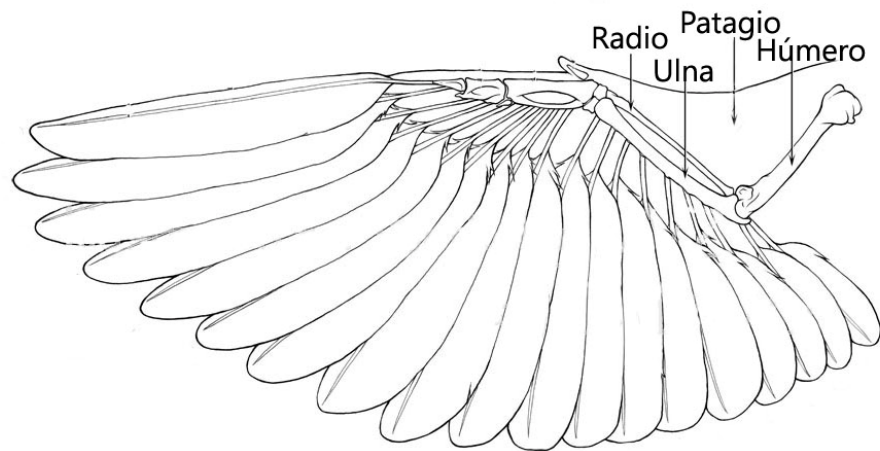


Figura 1. Anatomía de un ala. Se señala el patagio o membrana alar donde se inoculó la PHA, así como la unión del húmero y ulna donde se encuentra la vena braquial de donde se extrajo la sangre (ver subsección sexado).

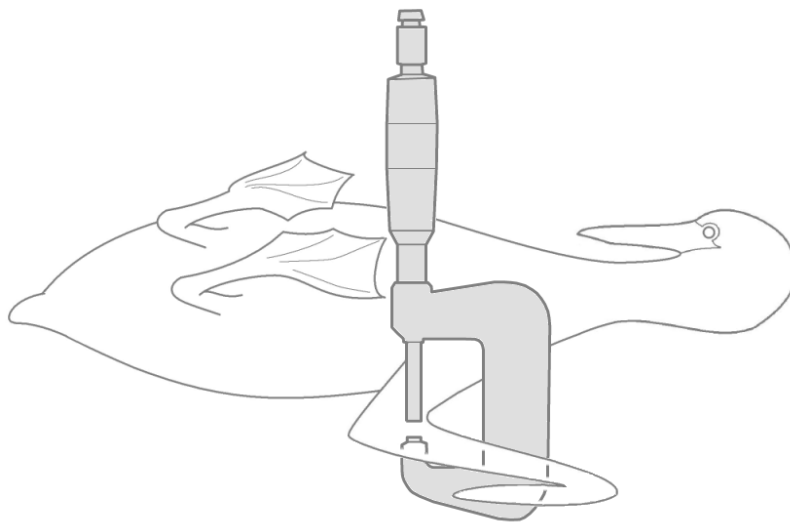


Figura 2. Uso del micrómetro para medir el grosor del patagio del ala izquierda (ilustrado por Oscar Sánchez Macouzet).

Sexado

Se tomaron 0.05 ml de sangre a partir de la vena braquial del ala derecha (unión de ulna y húmero, Figura 2) de las crías de los grupos de 5 y 20 días cuando cumplieron 15 o 21-22 días de edad respectivamente, utilizando para ello agujas estériles y tubos capilares heparinizados. Las muestras de sangre se conservaron en 1 ml de amortiguador de Queen's (0.01M Tris, 0.01 M NaCl, 0.01 M EDTA y 1% n-lauroylsarcosina pH 7.5) a temperatura ambiente hasta ser procesadas en el laboratorio (Seutin et al. 1991).

La extracción del ADN a partir de la sangre se realizó con los reactivos y material contenidos en los paquetes Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin Kit de la compañía GE Healthcare (código 28-9042-65), siguiendo el protocolo ahí descrito (ver “Extracción de ADN” Apéndice II). Los genes CHD-W y CHD-Z, que corresponden al gen chromobox-helicase-DNA-binding, se amplifican a partir del ADN purificado. El peso molecular de dichos genes varía según el cromosoma en el que estén, por lo tanto al correr un gel de electroforesis con los productos de la amplificación se pueden distinguir los individuos de distinto sexo: en hembras (ZW) se observan dos bandas mientras que en machos (WW), se observa sólo una (Griffiths et al., 1998; ver “Amplificación y Electroforesis” Apéndice II).

No pudo conocerse el sexo de 10 crías: 8 crías del grupo de 5 días de edad murieron antes de cumplir los 15 días y el sexado de dos crías de 20 días de edad no pudo completarse por dificultades técnicas. Los datos de estas 10 crías fueron excluidos del análisis.

Análisis Estadístico

Condición corporal

Debido a que variables como el tamaño de pico, ulna y peso están altamente correlacionados en crías de 5 y 20 días de edad (pico/ulna: $r = 0.99$, $P < 0.00$; pico/peso: $r = 0.98$, $P < 0.00$; ulna/peso: $r = 0.98$, $P < 0.00$, crías 5 días $n = 54$; crías 20 días $n = 84$), se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para obtener un índice de condición corporal. Para crías de 5 y 20 días se utilizaron los tamaños de pico y ulna registrados el día del inóculo y el promedio del peso (registrados el día del inóculo y 24 hrs. después). Para las hembras de 3-8 años se utilizaron solamente las medidas de pico y el promedio del peso porque las medidas de ulna tuvieron una distribución diferente a la normal y aun transformando los datos no se lograron normalizar. Además no existió una correlación significativa entre ulna y pico ni entre ulna y peso (ulna/pico: $r = 0.07$, $P = 0.45$; ulna/peso: $r = 0.16$, $P = 0.100$, $n = 118$ hembras), pero sí entre las medidas de pico y peso ($r = 0.25$, $P = 0.007$, $n = 118$ hembras). El primer factor tuvo un valor eigen > 1 y los valores del primer factor son los que se utilizaron para los análisis posteriores (**5 días**: valor eigen = 2.51, explicó el 83.75% de la varianza, correlación: factor/pico = 0.92, factor/ulna = 0.91, factor/peso de 0.92; **20 días**: valor eigen = 2.76, explicó el 92.03% de la varianza, correlación factor/pico = 0.97, factor/ulna = 0.97, factor/peso = 0.95; **hembras 3-8 años**: valor eigen = 1.14, explicó el 57.05% de la varianza, correlación: factor/pico = 0.76, factor/peso = 0.76).

Relación entre RIC/orden de eclosión y condición corporal/orden de eclosión

Para explorar el efecto del orden de eclosión en la RIC o en la condición corporal, se utilizaron modelos multivariados. Para las crías de 5 y 20 días de edad se usaron modelos lineales mixtos (LMM) independientes para cada grupo de edad, en los que se incluyó como factor aleatorio la identidad del nido. Para las hembras de 3-8 años se usaron modelos lineales generales (GLM) con una distribución normal y como función de enlace se utilizó la función identidad. La Tabla 1 muestra las variables independientes integradas en los modelos de los grupos: (a) de crías de 5 y 20 días de edad y (b) de las hembras de 3-8 años de edad.

Los modelos iniciales integraron todas las variables explicativas y las interacciones listadas en la Tabla 1. Se eliminaron secuencialmente las interacciones, las variables cuadráticas y los factores principales no significativos ($P > 0.05$) hasta obtener el modelo mínimo adecuado, llamado modelo final. Para elegir el modelo final más adecuado se utilizaron pruebas de eliminación. Las pruebas de eliminación evaluaron la significancia del aumento en devianza (en GLMs) o en el cociente de verosimilitud (Coc. V. en LMMs) resultantes de ir eliminando las variables del modelo inicial (Crawley, 2003). La P obtenida en las pruebas de eliminación es la que se reporta para cada variable. Cuando alguna interacción resultó significativa, se realizaron modelos diferentes separando por alguna de las variables de la interacción. Para determinar diferencias entre categorías se realizaron comparaciones entre el modelo final y submodelos con dos de las tres categorías combinadas (Crawley, 2003). Los modelos fueron realizados con el programa *R* v2.6.2 (R Development Core Team 2008). El criterio de significancia fue $P \leq 0.05$. Se reportan los valores de media \pm error estándar.

Tabla 1. Variables independientes integradas a los modelos de crías de 5 o 20 días de edad y hembras de 3-8 años.

	Modelos	
	(a) Crías 5 ó 20 días (LMM)	(b) Hembras 3-8 años (GLM)
Indicador de Estatus Social	Orden de eclosión	Orden de eclosión
Indicador de Condición General	Condición corporal ^{RIC} Fecha de eclosión Edad Sexo	Condición corporal ^{RIC} Fecha de eclosión* Fecha de puesta 2007** Edad Edad ² # crías eclosionadas en 2007 ^{RIC}
Interacciones	Orden de eclosión: Sexo Sexo: Condición corporal ^{RIC}	Orden de eclosión: Condición corporal ^{RIC} Orden de eclosión: Fecha de puesta 2007 Orden de eclosión: Edad
Indicador de Estatus Social de la Madre	Orden de eclosión madre	-
Calidad de la Madre	Condición corporal madre ^{RIC} Edad madre Edad madre ²	-
Control de tiempo transcurrido entre inóculo y medición de PHA	-	Horas transcurridas entre 1 ^a y 2 ^a medición ^{RIC}

^{RIC} indica variables integradas sólo al modelo de RIC. *La fecha de eclosión de la hembra proporcional al año en que nació. **La fecha de puesta de las hembras, indicador de calidad ya que las aves que se reproducen temprano en la temporada, tienden a tener un mayor número de crías emplumadas (Perrins, 1970; Verhulst et al., 1995).

RESULTADOS

Efecto del orden de eclosión en la condición corporal

A los 5 días de edad, las crías de distinto orden de eclosión no difirieron significativamente en su condición corporal ($P = 0.09$, Tabla 2(a); únicas: 0.10 ± 0.23 , $n = 18$ crías; primeras: 0.26 ± 0.19 , $n = 19$ crías; segundas: -0.40 ± 0.27 , $n = 17$ crías; Figura 3(a)), sin embargo, hubo una tendencia de segundas crías hembras a tener una menor condición corporal que hembras únicas y primeras crías. La condición corporal de las crías macho y hembra no difirió significativamente ($P = 0.14$, Tabla 2(a); machos: 0.21 ± 0.21 , $n = 24$ crías; hembras: -0.16 ± 0.18 , $n = 30$ crías). La fecha de eclosión de las crías a los 5 días de edad disminuyó a través de la fecha de eclosión, las crías que nacieron temprano en la temporada tuvieron una mejor condición corporal que las crías tardías ($P < 0.01$, Tabla 2(a) y Figura 3(b)).

Tabla 2. LMM de la condición corporal en (a) crías de 5 y (b) 20 días de edad utilizando nido como factor aleatorio.

Variables	(a) Crías 5 días (n=54)			(b) Crías 20 días (n=83)		
	gl	Coc. V.	P	gl	Coc. V.	P
Modelo Inicial:						
Orden Eclosión	2	4.85	0.09	2	15.77	0.00***
Fecha de Eclosión	1	7.95	0.00**	1	0.37	0.54
Edad	1	0.00	0.96	1	22.23	0.00***
Sexo	1	2.21	0.14	1	0.22	0.64
Orden Eclosión Madre	2	1.12	0.56	2	0.55	0.76
Edad Madre	1	2.51	0.11	1	0.15	0.70
Edad Madre ²	1	0.08	0.77	1	1.44	0.23
Orden Eclosión: Sexo	2	3.62	0.16	2	12.67	0.00**
Modelo Final:						
Orden Eclosión				2	15.45	0.00***
Fecha de Eclosión	1	7.95	0.00**			
Edad				1	30.64	0.00***
Sexo				1	0.25	0.61
Orden Eclosión: Sexo				2	10.91	0.00**

* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, gl (grados de libertad). Para consultar los valores de los coeficientes de cada variable explicativa del modelo final ver el Apéndice III.

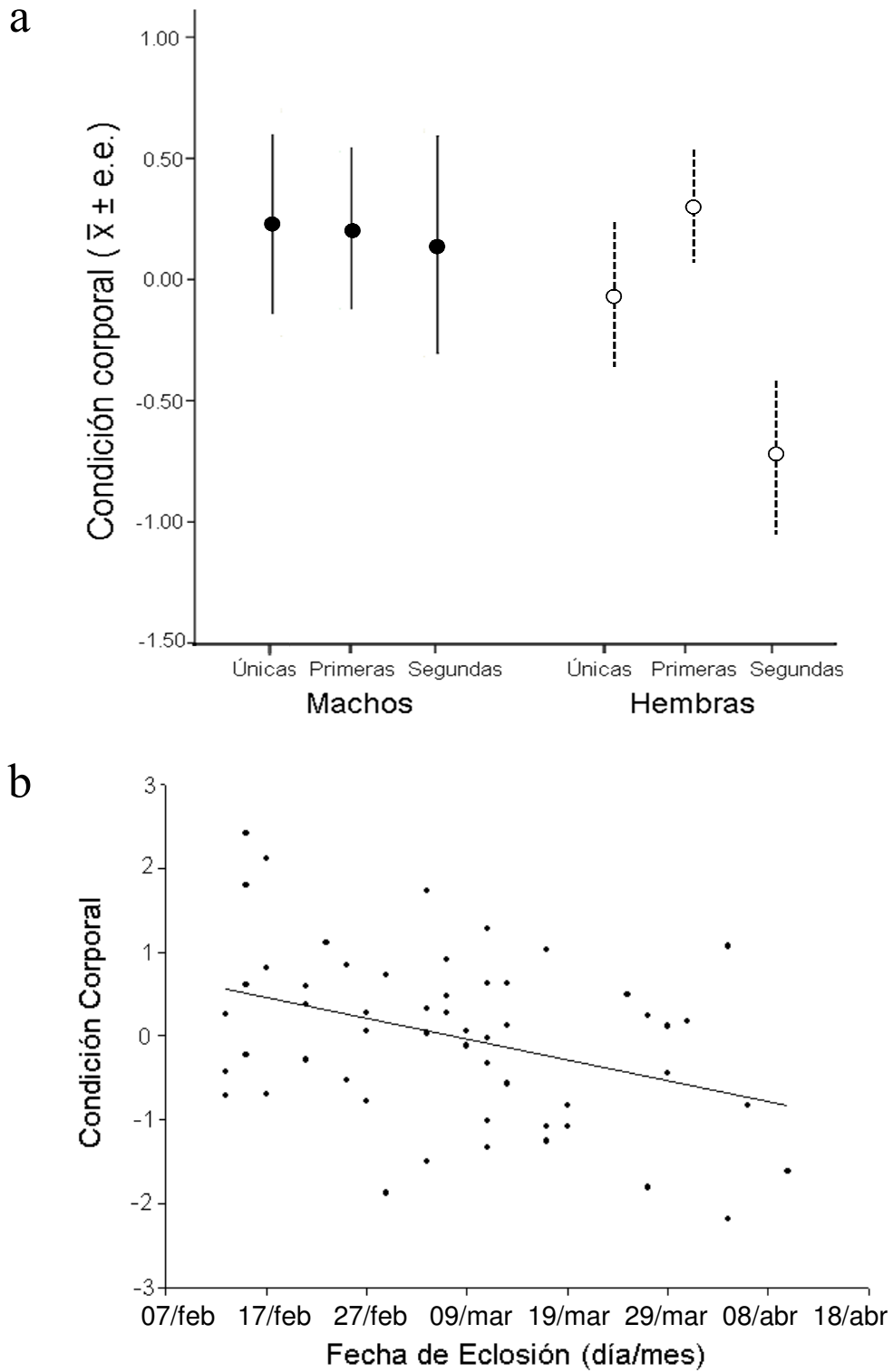


Figura 3. En crías de 5 días de edad: (a) La condición corporal según el orden de eclosión de crías macho (●) y hembra (○), (b) Relación entre condición corporal y la fecha de eclosión de la cría (ambos sexos).

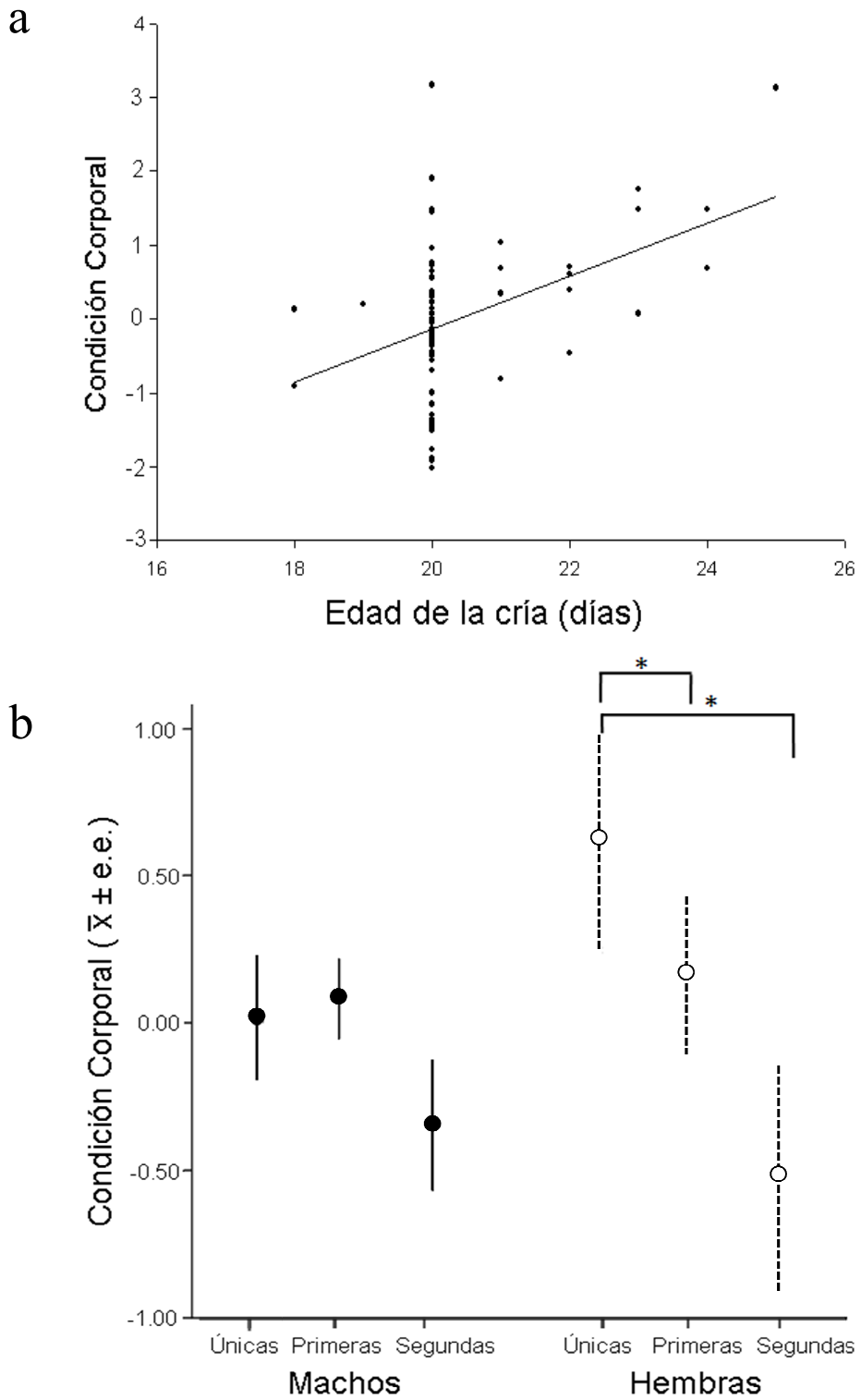


Figura 4. En crías de 20 días de edad: (a) La condición corporal según el orden de eclosión de crías macho (●) y hembra (○), (b) Relación entre condición corporal y la edad de la cría (ambos sexos).

En crías del grupo de 20 días de edad la condición corporal presentó una relación positiva con la edad exacta de cada cría ($P < 0.001$, Tabla 2(b), Figura 4(a)). Controlando por la edad de cada cría, la relación entre orden de eclosión y condición corporal en este rango de edad resultó significativa, así como la interacción entre orden de eclosión y sexo de las crías ($P < 0.01$, Tabla 2(b); MACHOS: únicas: 0.03 ± 0.21 , $n = 17$ crías; primeras: 0.09 ± 0.13 , $n = 17$ crías; segundas: -0.35 ± 0.22 , $n = 11$ crías; HEMBRAS: únicas: 0.60 ± 0.37 , $n = 11$ crías; primeras: 0.15 ± 0.27 , $n = 14$ crías; segundas: -0.53 ± 0.38 , $n = 13$ crías; Figura 4(b)). Cuando se realizó por separado un modelo para machos y otro para hembras, en el modelo realizado para los machos el orden de eclosión (LMM: Coc. $V_2 = 2.88$, $P = 0.24$, Figura 4(b)) y la edad de las crías (LMM: Coc. $V_1 = 1.32$, $P = 0.25$) no resultaron significativos. En el modelo de las hembras se encontró una relación negativa entre condición corporal y orden de eclosión (LMM: Coc. $V_2 = 6.90$, $P = 0.03$, Figura 4(b)) y una relación positiva entre condición corporal y edad de las crías (LMM: Coc. $V_1 = 9.29$, $P < 0.01$, Figura 4(a)). La comparación entre el modelo final de las hembras y submodelos con dos de las categorías del orden de eclosión combinadas reveló que las segundas y primeras crías hembras tienen una condición corporal menor que hembras únicas, pero hembras segundas y primeras crías no difieren en condición corporal (LMM (únicas, primeras, segundas) Coc. $V_1 = 6.90$, $P = 0.03$; submodelo (únicas-primeras, segundas) Coc. $V_1 = 5.29$, $P = 0.02$; submodelo (únicas-segundas, primeras) Coc. $V_1 = 5.73$, $P = 0.02$; submodelo (únicas, primeras-segundas) Coc. $V_1 = 0.02$, $P = 0.87$).

En las hembras de 3-8 años de edad, la condición corporal no se vio afectada por el orden de eclosión ($P = 0.13$, Tabla 3; únicas: 0.16 ± 0.15 , $n = 41$ hembras; primeras: 0.01 ± 0.15 , $n = 41$ hembras; segundas: -0.20 ± 0.18 , $n = 36$ hembras; Figura 5), sin embargo se observó una tendencia de segundas crías a tener una menor condición corporal que las crías

únicas y primeras, mientras que la condición corporal de las primeras crías fue menor que la de crías únicas. No se encontró una relación significativa entre la condición corporal y edad, la fecha de puesta en 2007 o la fecha de eclosión ($P > 0.05$, Tabla 3).

Tabla 3. GLM con la función identidad examinando la condición corporal en hembras de 3-8 años de edad ($n = 113$).

Variables	gl	Devianza	P
Modelo Inicial			
Orden Eclosión	2, 112	3.99	0.13
Fecha de Eclosión	1, 116	2.65	0.10
Edad	1, 114	0.65	0.42
Edad ²	1, 111	2.65	0.10
Fecha de puesta 2007	1, 115	1.56	0.21
Orden de Eclosión: Fecha de puesta 2007	2, 107	0.32	0.84
Orden de Eclosión: Edad	2, 109	3.11	0.19

* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, gl (grados de libertad). Para consultar los valores de los coeficientes de cada variable explicativa del modelo final ver el Apéndice III.

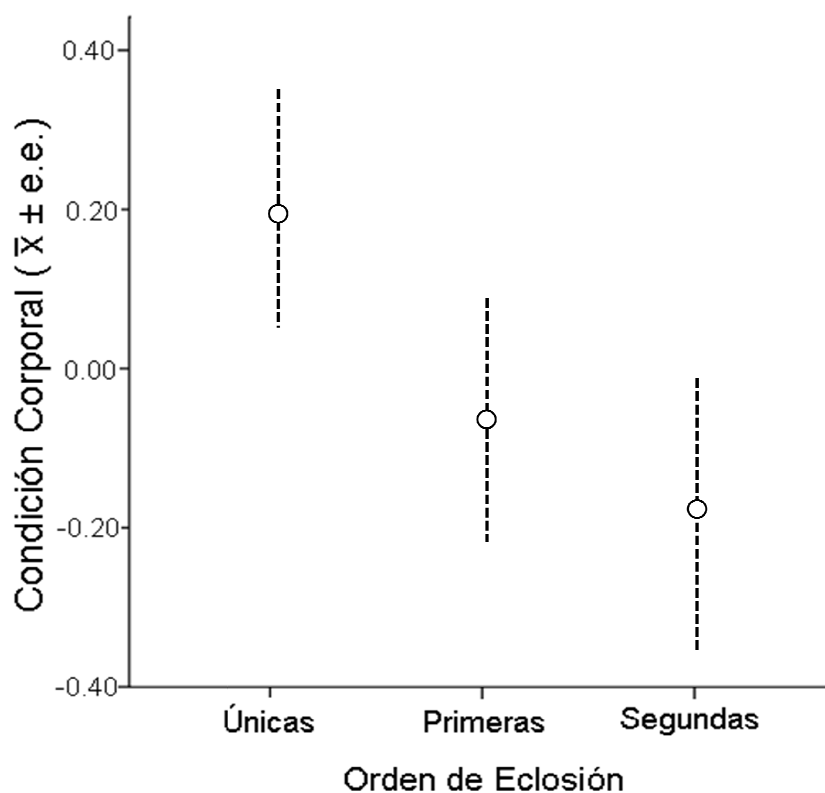


Figura 5. Condición corporal según el orden de eclosión de hembras de 3-8 años de edad.

Respuesta inmune celular en crías de 5 días de edad

A los 5 días de edad la RIC no estuvo relacionada con el orden de eclosión ($P = 0.91$, Tabla 4(a); únicas: 0.99 ± 0.11 mm, $n = 18$ crías; primeras: 1.08 ± 0.12 mm, $n = 19$ crías; segundas: 0.93 ± 0.11 mm, $n = 17$ crías; Figura 6), pero aumentó significativamente con la condición corporal de la cría ($P < 0.01$, Tabla 4(a), Figura 7(a)) y disminuyó con la edad de la madre ($P = 0.02$, Tabla 4(a), Figura 7(b)).

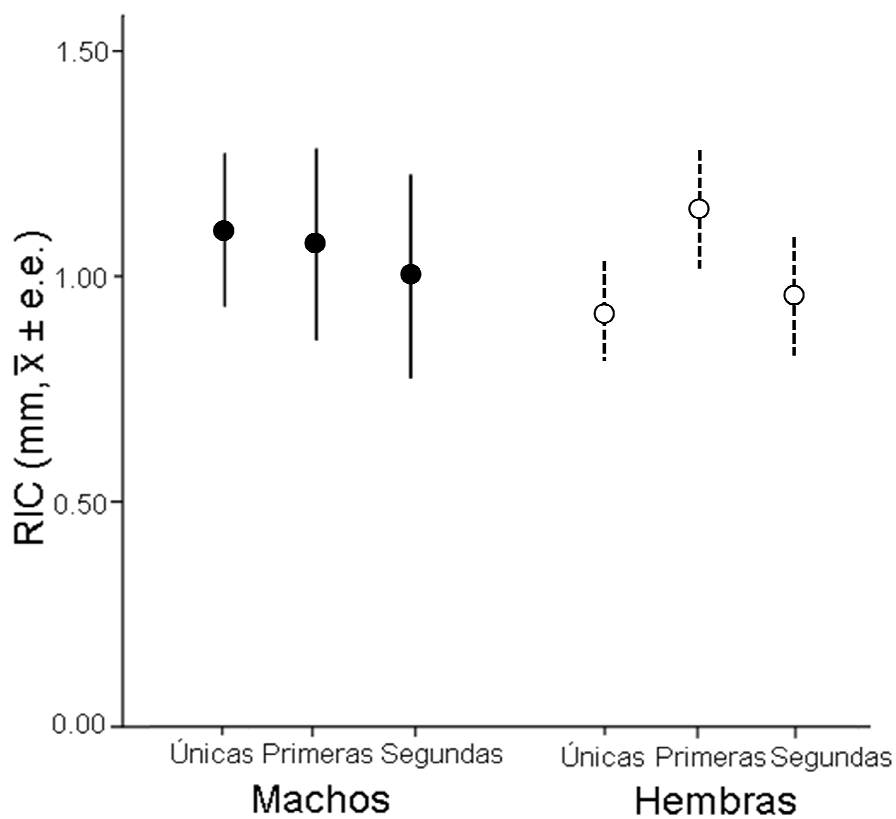


Figura 6. RIC según el orden de eclosión de crías macho(●) y hembra (○) a los 5 días de edad.

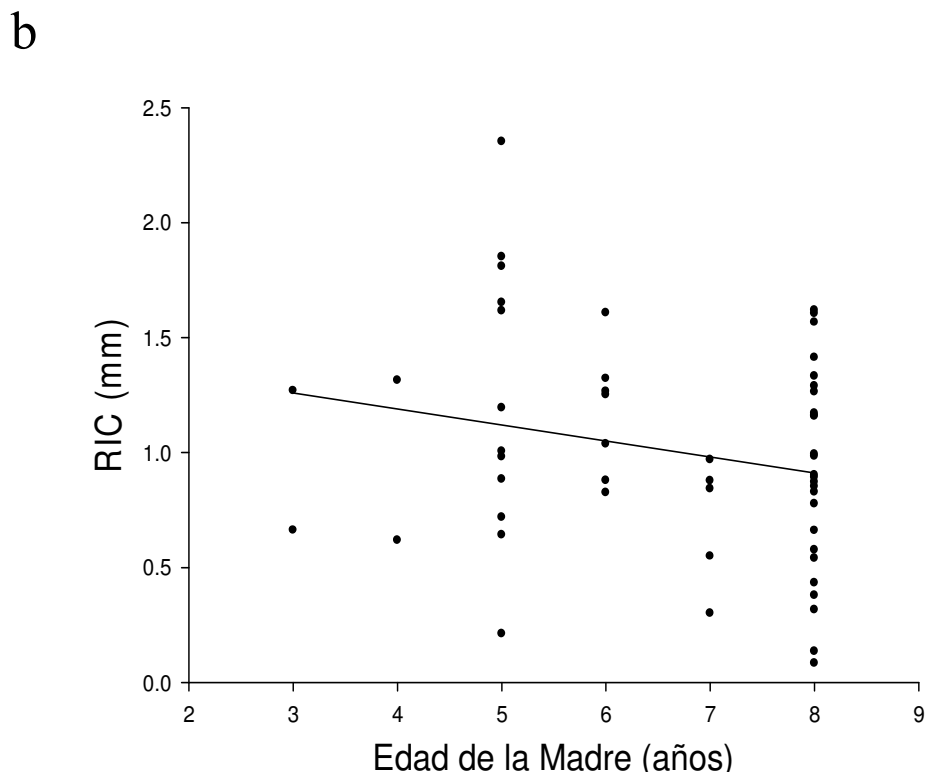
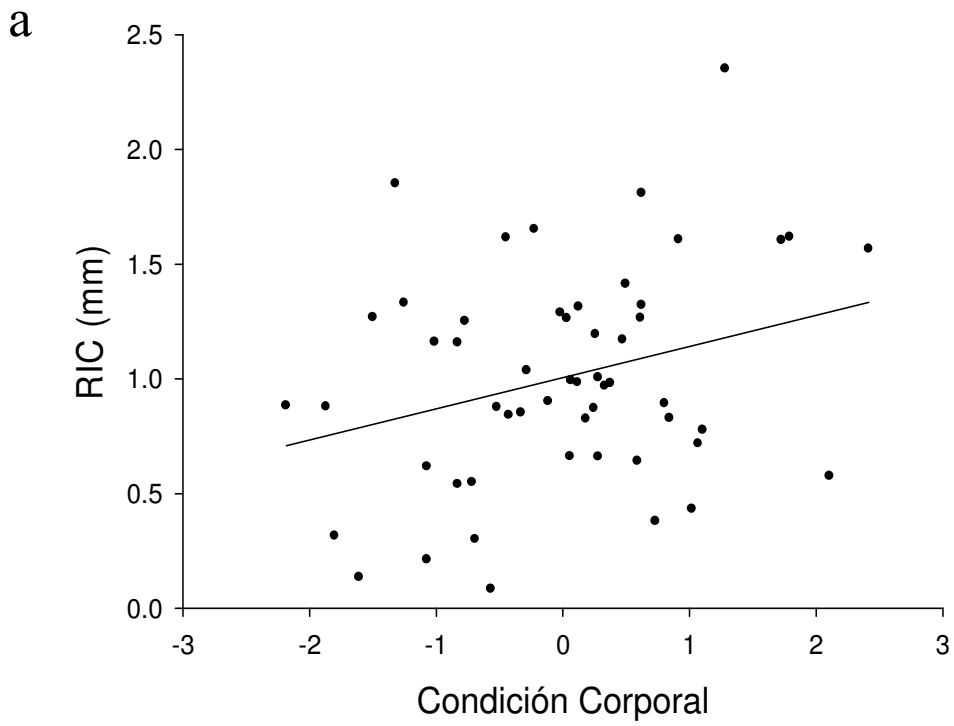


Figura 7. En crías de 5 días de edad, ambos sexos: relación entre RIC y (a) Condición corporal de la cría, (b) Edad de la madre.

Respuesta inmune celular en crías de 20 días de edad

En la RIC de crías de 20 días de edad la interacción entre orden de eclosión y sexo de las crías resultó marginalmente significativa ($P = 0.05$, Tabla 4(b); MACHOS: únicas: 1.45 ± 0.16 mm, $n = 17$ crías; primeras: 1.36 ± 0.13 mm, $n = 17$ crías; segundas: 1.68 ± 0.17 mm, $n = 11$ crías; HEMBRAS: únicas: 1.23 ± 0.11 mm, $n = 11$ crías; primeras: 1.62 ± 0.16 mm, $n = 14$ crías; segundas: 1.16 ± 0.18 mm, $n = 13$ crías; Figura 8). Se realizó por separado un modelo para machos y otro para hembras, en el modelo de los machos el orden de eclosión no resultó significativo (LMM: Coc. $V_2 = 2.46$, $P = 0.30$, Figura 8). En el modelo realizado para las hembras hubo una relación significativa entre RIC y orden de eclosión (LMM: Coc. $V_2 = 20.32$, $P < 0.001$, Figura 8). La comparación entre el modelo final de las hembras y submodelos con dos de las categorías del orden de eclosión combinadas mostró que las primeras crías hembras tienen una RIC mayor que hembras únicas y segundas crías hembras, pero segundas crías hembras y únicas no difieren en RIC (LMM (únicas, primeras, segundas) Coc. $V_1 = 20.32$, $P < 0.001$; submodelo (únicas-primeras, segundas) Coc. $V_1 = 8.36$, $P < 0.01$; submodelo (únicas-segundas, primeras) Coc. $V_1 = 2.37$, $P = 0.12$; submodelo (únicas, primeras-segundas) Coc. $V_1 = 19.64$, $P < 0.001$).

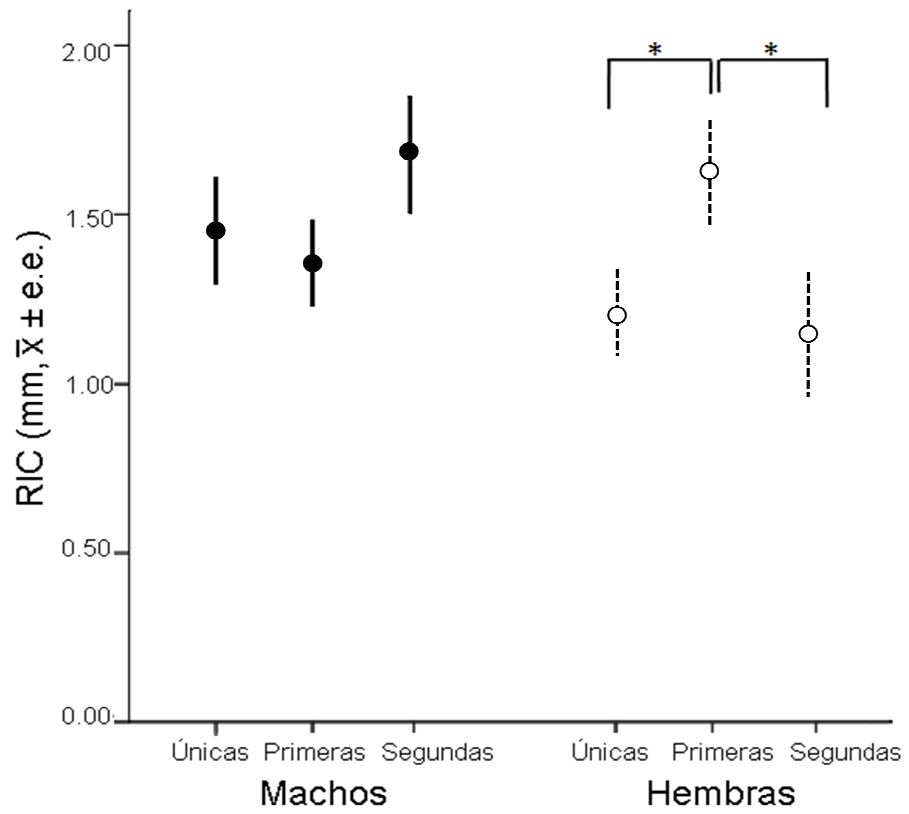


Figura 8. RIC según el orden de eclosión de crías macho (●) y hembra (○) a los 20 días de edad.

Tabla 4. LMM de la RIC en: (a) crías de 5 y (b) 20 días de edad utilizando nido como factor aleatorio.

Variables	(a) Crías 5 días (n=54)			(b) Crías 20 días (n=83)		
	gl	Coc. V.	P	gl	Coc. V.	P
Modelo Inicial						
Orden Eclosión	2	0.19	0.91	2	0.35	0.84
Condición Corporal	1	7.00	0.00 **	1	0.20	0.66
Fecha de Eclosión	1	0.04	0.85	1	0.19	0.66
Edad	1	1.04	0.31	1	2.07	0.15
Sexo	1	0.10	0.75	1	0.87	0.35
Orden Eclosión Madre	2	2.46	0.29	2	1.37	0.50
Edad Madre	1	5.14	0.02 *	1	0.03	0.87
Edad Madre ²	1	2.10	0.15	1	0.91	0.34
Condición Corporal Madre	1	2.46	0.29	1	0.73	0.39
Orden de Eclosión: Sexo	2	1.94	0.38	1	6.62	0.04*
Orden Eclosión: Condición Corporal	2	1.85	0.40	2	0.30	0.86
Modelo Final						
Orden de Eclosión				2	0.66	0.72
Condición Corporal	1	7.00	0.00**			
Sexo				1	0.96	0.33
Edad Madre	1	5.14	0.02 *			
Orden de Eclosión: Sexo				2	5.95	0.05

* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, gl (grados de libertad). Para consultar los valores de los coeficientes de cada variable explicativa del modelo final ver el Apéndice III.

Respuesta inmune celular en hembras de 3-8 años de edad

La RIC de hembras de 3-8 años de edad no tuvo una relación significativa con el orden de eclosión ($P = 0.13$, Tabla 5; únicas: 1.31 ± 0.13 mm, $n = 41$ hembras; primeras: 1.34 ± 0.11 mm, $n = 41$ hembras; segundas: 1.02 ± 0.16 mm, $n = 36$ hembras; Figura 9), pero si con la fecha de puesta en la temporada del presente estudio ($P < 0.01$, Tabla 5). La interacción entre fecha de puesta y el orden de eclosión de la hembra resultó significativa ($P = 0.02$, Tabla 5), por lo tanto se realizaron dos modelos separados para hembras cuyas puestas fueron tempranas o tardías respecto a la media. No se encontró una relación significativa entre la RIC de hembras tempranas o tardías y su orden de eclosión (GLM: hembras tempranas: devianza = $3.31_{2, 52}$, $P = 0.07$, $n = 55$ hembras; hembras tardías: devianza = $1.52_{2, 60}$, $P = 0.32$, $n = 63$ hembras).

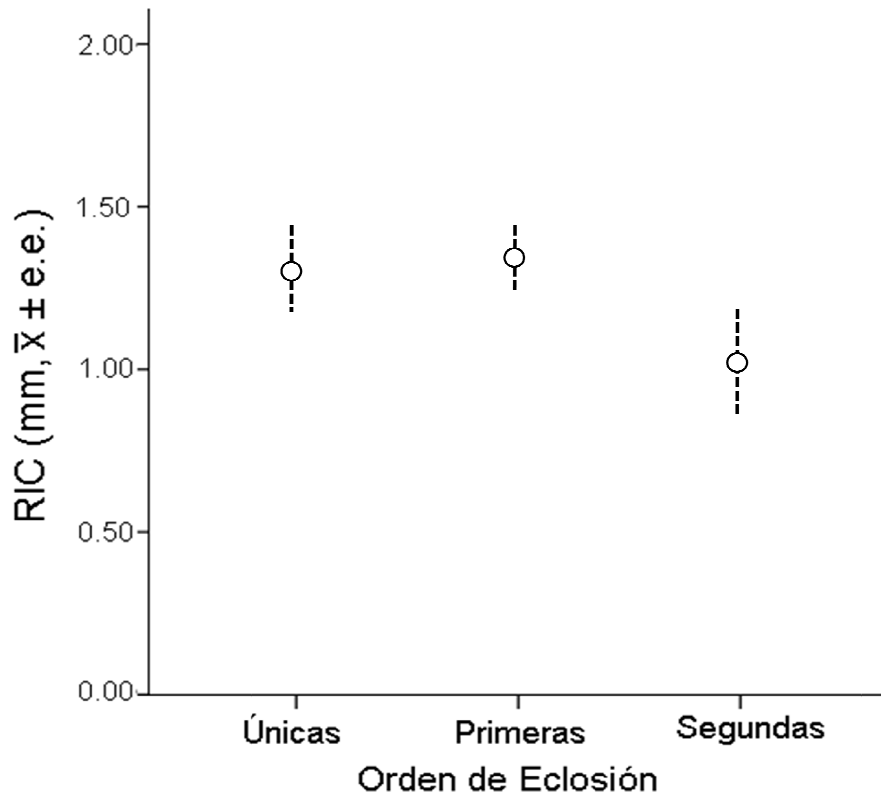


Figura 9. RIC según el orden de eclosión en hembras de 3-8 años de edad.

Tabla 5. GLM con la función identidad examinando la RIC en hembras de 3-8 años de edad (n = 118).

Variables	gl	Devianza	P
Modelo Inicial			
Orden Eclosión	2, 111	2.64	0.12
Condición Corporal	1, 114	0.67	0.30
Fecha de Eclosión	1, 113	0.51	0.38
Edad	1, 115	1.09	0.20
Edad ²	1, 108	0.21	0.60
Horas transcurridas hasta medir PHA	1, 109	0.01	0.95
# crías eclosionadas en 2007	1, 110	0.04	0.79
Fecha de puesta 2007	1, 115	5.52	0.00**
Orden Eclosión: Edad	2, 105	3.81	0.07
Orden Eclosión: Fecha de puesta 2007	2, 107	4.72	0.02*
Orden Eclosión: Condición Corporal	2, 106	3.19	0.08
Modelo Final			
Orden Eclosión	2, 112	2.00	0.21
Fecha de puesta 2007	1, 116	4.93	0.01**
Orden Eclosión: Fecha de puesta 2007	2, 114	4.36	0.03*

* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, gl (grados de libertad). Para consultar los valores de los coeficientes de cada variable explicativa del modelo final ver el Apéndice III.

Condición corporal en crías de 5 días de edad según la edad de la madre

Existe la posibilidad de que las hembras jóvenes hayan tenido crías con condiciones corporales mayores que crías de hembras maduras y por lo tanto hayan tenido crías con RIC mayor, debido a la relación positiva que se encontró entre condición corporal y RIC a los 5 días de edad. Con una ANOVA se comprobó que las crías de hembras jóvenes no presentaron la misma condición corporal que las crías de hembras maduras ($F_{5,53} = 0.71$, $P = 0.62$) y por lo tanto las hembras más jóvenes dentro de la muestra tuvieron crías con una RIC mayor independientemente de la condición corporal de las crías.

Inversión materna según el orden de eclosión

Entre crías pertenecientes a madres con distinto orden de eclosión no hubo diferencia en la condición corporal a los 5 días de edad ($P = 0.60$, Tabla 2(a); de madre única: -0.08 ± 0.19 , $n = 18$ crías; de madre primera cría: 0.12 ± 0.22 , $n = 20$ crías; de madre segunda cría: -0.06 ± 0.32 , $n = 16$ crías), ni a los 20 días de edad ($P = 0.80$, Tabla 2(b); de madre única: 0.02 ± 0.21 , $n = 29$ crías; de madre primera cría: -0.22 ± 0.19 , $n = 27$ crías; de madre segunda cría: 0.21 ± 0.16 , $n = 27$ crías). Tampoco se encontró diferencia en la RIC de crías según el orden de eclosión de su madre a los 5 días de edad ($P = 0.30$, Tabla 4(a); de madre única: 1.04 ± 0.10 , $n = 18$ crías; de madre primera cría: 1.05 ± 0.10 , $n = 20$ crías; de madre segunda cría 0.90 ± 0.14 , $n = 16$ crías), ni a los 20 días de edad ($P = 0.50$, Tabla 4(b); de madre única: 1.47 ± 0.10 , $n = 29$ crías; de madre primera cría: 1.35 ± 0.12 , $n = 27$ crías; de madre segunda cría: 1.43 ± 0.12 , $n = 27$ crías).

DISCUSIÓN

Respuesta inmune celular y condición corporal a los 5 días de edad

No se encontró diferencia en la RIC según el orden de eclosión en crías de 5 días de edad. Ya que durante los primeros días post-eclosión las crías parecen recibir poco alimento (Guerra & Drummond, 1995) y además presentan poco agonismo (Valderrábano-Ibarra et al., 2007), cualquier diferencia en la RIC o la calidad corporal entre primeras y segundas crías de 5 días de edad probablemente se debe a diferencias en los huevos. Se ha observado que concentraciones altas de testosterona y/o corticosterona en huevos de aves pueden reducir la RIC entre los 8 y 10 días después de eclosionar (Rubolini et al., 2005; Cucco et al., 2008). Por otro lado, concentraciones altas de androstenediona en yema se relacionan con una mayor RIC en bobos de 15 días de edad (Dentressangle & Torres, en preparación). La ausencia de diferencias en andrógenos (testosterona y androstenediona) entre primeros y segundos huevos en el bobo de patas azules (Drummond et al., 2008; Dentressangle et al., 2008) es congruente con la falta de diferencias en la RIC de primeras y segundas crías de 5 días de edad.

A los 5 días de edad las crías de madres jóvenes tuvieron RIC mayores que crías de madres maduras, dentro del rango de edades muestreado (3-8 años). Beamonte-Barrientos et al. (en revisión) encontraron que el volumen de primeros y segundos huevos de hembras de 3-19 años disminuye al avanzar la edad. Es probable que las hembras jóvenes provean a sus huevos con una mayor cantidad de nutrientes e incluso inmunoglobulinas que fortalezcan el sistema inmune de sus crías y les confieran ventajas durante los primeros días post-eclosión.

De acuerdo con lo observado en otras especies de aves (Saino et al., 1997; Christe et al., 1998; Tella et al., 2001; Moreno et al., 2005; Verhulst et al., 2005; Martin-Vivaldi et al., 2006), se encontró una relación positiva y significativa entre la RIC y la condición corporal de las crías a los 5 días de edad. Ambas variables reflejan el estado nutricional de la cría (Hörak et al., 1999; Alonso-Alvarez & Tella, 2001); por lo tanto, individuos en buen estado nutricional pueden asignar mayor cantidad de recursos al sistema inmune y presentan respuestas inmunes más robustas.

A los 5 días de edad segundas crías hembras de la muestra tuvieron una menor condición corporal que hembras únicas y primeras, aunque ésta diferencia no alcanzó a ser significativa ($P = 0.09$). Drummond et al. (1986) encontraron que segundas crías (no sexadas) entre los 0 y los 4 días de edad fueron significativamente más ligeras que crías primeras a la misma edad. Segundos huevos tienen menor cantidad de yema que primeros huevos, pero no pesan menos ni difieren en concentración de testosterona y androstenediona (Drummond et al., 2008). Puede ser que, debido a la menor cantidad de yema contenida en segundos huevos, la condición corporal de las segundas crías haya sido menor que las primeras al eclosionar y durante los siguientes 5 días. Así mismo, es posible que durante los primeros 5 días de vida las segundas crías reciban menos alimento que las primeras. El contenido hormonal del huevo también podría estar relacionado con el crecimiento de las crías. En la codorniz japonesa (*Coturnix japonica*) se ha observado que concentraciones altas de corticosterona en huevo disminuyen la tasa de crecimiento postnatal de las crías (Hayward & Wingfield, 2004), por lo que es posible que, en el bobo de patas azules, la concentración de corticosterona sea mayor en segundos huevos que en

primeros. Sin embargo, no hay a la fecha, información acerca de las diferencias en la concentración de corticosterona en huevos de este bobo.

Las crías que eclosionaron temprano (febrero, marzo) tuvieron una mejor condición corporal a los 5 días de edad que aquellas eclosionadas hacia abril. Observaciones previas en Isla Isabel documentan un mayor reclutamiento de crías que empluman con fechas tempranas (Drummond et al., 2003). La relación negativa entre la fecha de eclosión y la condición corporal de las crías pudo deberse a que: (1) la disponibilidad de alimento se deteriora al avanzar la temporada, (2) los adultos que anidan temprano son de mayor calidad o (3) los padres que anidan al inicio de la temporada invierten más en sus crías porque las crías que empluman más temprano son más valiosas.

Respuesta inmune celular y condición corporal a los 20 días de edad

En hembras de 20 días de edad tanto las segundas crías como las únicas tuvieron una RIC inferior a las primeras. Puede ser que a los 20 días segundas crías tengan una RIC menor a primeras crías debido a la agresión intensa (Valderrábano-Ibarra et al., 2007), la inanición (Guerra & Drummond, 1995) y la elevada corticosterona circulante (Nuñez de la Mora et al., 1996) presentes en las segundas crías durante las primeras tres semanas de vida.

La inferioridad de crías únicas respecto a la RIC de primeras crías es más difícil de explicar dado que el crecimiento de las crías únicas parece ser similar al de primeras crías (Drummond, datos no publicados) y las crías únicas no sufren agresión alguna. Podría deberse a la posible menor calidad de sus padres. Si los padres de mejor calidad tienen

puestas más grandes (Coulson & Porter, 1985), los bobos con dos crías podrían ser padres superiores que invierten más en sus huevos que padres con una cría. Las hembras del papamoscas collarino de mayor calidad (aquéllas con menores niveles de estrés) depositan mayores concentraciones de inmunoglobulinas en sus huevos que las de menor calidad (Hargitai et al., 2006). Puede ser que las madres provean ambos huevos de puestas de dos con una mayor cantidad de inmunoglobulinas y/o andrógenos que las madres de puestas de uno y que los efectos en la RIC se presenten, no en los primeros días después de la eclosión, sino semanas más tarde. Concentraciones altas de androstenediona en yema se relacionan con una mayor RIC en bobos de 15 días de edad (Dentressangle & Torres, en preparación). Alternativamente, el patrón observado también podría reflejar una mayor inversión post-eclosión por parte de padres de mejor calidad. Sin embargo, los indicadores de calidad de las madres (edad, condición corporal) no se relacionaron con la RIC de sus crías a los 20 días de edad. Por otro lado, podría ser que en nidadas de dos crías haya más parásitos que en nidadas de una cría debido a que las infestaciones de los parásitos dependen de la densidad (Krause & Ruxton, 2002) y que en consecuencia crías de nidadas de dos destinen una mayor proporción de recursos al sistema inmune. No obstante, Ramos et al. (en preparación) no han encontrado evidencia de una mayor cantidad de parásitos en nidadas de dos crías de bobo de patas azules que en nidadas de una cría. Otra posible explicación de que las crías únicas tuvieran una RIC inferior a la de las crías primeras es que las crías únicas no pueden “acurrucarse” con un hermano para conservar la temperatura corporal, lo cual podría implicar una termorregulación menos eficaz o más costosa en las primeras semanas que podría limitar los recursos destinados al sistema inmune (Visser, 1998).

Son pocos los estudios de aves que relacionan la RIC con el orden de eclosión y no hay un patrón consistente entre ellos. La hipótesis del “Tasty Chick” considera que crías eclosionadas al último dentro de una nidada deberían tener un sistema inmune debilitado debido a una condición nutricional menor y una consecuente carga parasitaria mayor, conduciendo a una mayor mortalidad (Christe et al., 1998). Acorde con ésta hipótesis, en la gaviota reidora (*Larus ridibundus*) y en la tórtola turca (*Streptopelia decaocto*) crías eclosionadas al último tienen RIC menores que primeras crías en eclosionar (Müller et al., 2003; Eraud et al., 2008). Sin embargo, las últimas crías de la golondrina común (*Hirundo rustica*) exhiben una mayor RIC que las primeras crías (Saino et al., 2001). Finalmente, en el carbonero común (*Parus major*) no hay diferencia en la RIC según el orden de eclosión (Roulin et al., 2003). Las diferencias inter-específicas pueden deberse a diferencias en la historia de vida de cada especie y de sus parásitos, como lo destaca el trabajo de Saino et al. (2001).

La relación negativa que se encontró entre la edad de la madre (3-8 años) y la RIC de crías de 5 días de edad no se observó en crías de 20 días. Puede ser que hembras maduras eclosionen crías con una RIC baja, pero que cuiden mejor a las crías aumentando su condición. Pero ¿por qué cuidarían a sus crías mejor que madres jóvenes? Existen tres hipótesis que podrían explicar una mejora en el cuidado maternal a medida que aumenta la edad de la madre. La hipótesis de “selección” dice que la proporción de individuos de alta calidad en la población aumenta con la edad porque los de menor calidad mueren con más frecuencia y desaparecen de la muestra. La hipótesis de “mejoras en la competitividad relacionadas con la edad” postula que la habilidad aumenta con la experiencia en forrajear, reproducirse, incubar y cuidar crías. La hipótesis de la “optimización del éxito

reproductivo” sostiene que el esfuerzo reproductivo aumenta con la edad, ya sea porque el valor reproductivo residual (esperanza de vida o potencial reproductivo) disminuye o porque incrementa la competitividad (hipótesis revisadas en: Clutton-Brock, 1984; Forslund & Pärt, 1995). Ciertamente, el éxito reproductivo en hembras de bobo de patas azules aumenta con la edad hasta alcanzar un pico a los 10 años, seguido de un decremento progresivo (Beamonte-Barrientos et al., en revisión). Es decir, conforme se acercan a la edad madura (8-11 años) las hembras parecen tener un mejor desempeño parental. Cuando se intercambiaron puestas de madres entre 4 y 17 años, la RIC de segundas crías a los 20 días de edad fue mayor bajo el cuidado de madres maduras (8-11 años) y viejas (11-17 años) que bajo el cuidado de madres jóvenes (4-7 años), independientemente de la edad de la madre que puso el huevo (Beamonte-Barrientos et al., en revisión).

A los 20 días de edad, las hembras primeras y segundas tuvieron una menor condición corporal que las hembras únicas, pero hembras primeras crías tuvieron una RIC mayor que hembras únicas, y hembras segundas crías tuvieron una RIC similar a la de hembras únicas. Suponiendo que las crías únicas y primeras recibieran la misma cantidad de alimento, el hecho de que las primeras crías tengan mayor RIC pero menor condición corporal que las únicas podría deberse a un “trade-off” entre destinar recursos al sistema inmune o al crecimiento combinado con mayor necesidad de defensa inmune de las primeras crías. Mantener el sistema inmune en buen estado resulta costoso a nivel energético (Sheldon & Verhulst, 1996), por lo que sólo sería redituable fortalecerlo cuando el riesgo de contraer parásitos o enfermedades fuera alto. Puede ser que las primeras crías padezcan un elevado riesgo de parasitismo o enfermedad en consecuencia del estrés de dominar y controlar a sus hermanos y entonces presenten una RIC elevada y por consiguiente una menor condición

corporal respecto a crías únicas. Se ha observado que elevar experimentalmente la RIC compromete el crecimiento de las crías. Crías de urraca (*Pica pica*) y del herrerillo común (*Parus caeruleus*) a las que se les elevó la receptividad de células T y la RIC (mediante la administración de metionina), crecieron menos en comparación a las crías control quienes tuvieron más parásitos sanguíneos (Soler et al., 2003; Brommer, 2004).

A los 20 días de edad, las relaciones entre RIC-orden de eclosión y entre condición corporal-orden de eclosión sólo se observaron en las crías hembras. Las hembras de esta especie son más grandes y crecen más rápido que los machos (Drummond et al., 1991; Torres & Drummond, 1999), lo que las podría volver más vulnerables a una baja inversión parental, el parasitismo, la inanición, las agresiones de un hermano dominante y niveles elevados de corticosterona en sangre, aunado a la posible presencia de más corticosterona en segundos huevos (discutido en la sección de crías de 5 días), así como el esfuerzo agresivo requerido para dominar a un hermano. Efectivamente en los bobos de patas azules, las hembras son más vulnerables a un esfuerzo materno reducido: las hijas de madres cuyas plumas de vuelo se acortaron (lo cual disminuye su capacidad de forrajeo) tuvieron un menor peso y un menor tamaño alar respecto a las hijas de madres control, mientras que en los hijos no se observó ningún efecto (Velandó & Alonso-Alvarez, 2002). El crecimiento rápido de las hembras podría estar limitando la cantidad de recursos destinados al sistema inmune y en los machos, quienes crecen más lentamente, no se observen diferencias en la RIC debido a que no hay un “trade-off” entre crecimiento acelerado y sistema inmune.

Respuesta inmune celular, condición corporal e inversión materna de hembras de 3-8 años de edad

Contrario a las predicciones, el orden de eclosión (y estatus en la nidada natal) de hembras de 3-8 años no se relacionó con su RIC o su condición corporal años más tarde, ni con la condición corporal o RIC de sus crías a los 5 y 20 días de edad. Similarmente, Drummond et al. (2003) no encontraron diferencias entre primeras y segundas crías en aspectos de la historia de vida como el éxito reproductivo durante los primeros 5 o 10 años de vida. Los resultados negativos del presente estudio implican que ni el agonismo, la inanición, el pobre crecimiento de las segundas crías o el crecimiento compensatorio que ocurre entre la semana 3 y 10 perjudican la RIC, la condición corporal o la inversión materna durante los primeros 8 años de la vida adulta.

A la fecha, no hay reportes en la literatura de ningún trabajo en el que se haya relacionado la experiencia social en el nido u orden de eclosión con la RIC cuando adulto o con efectos inter-generacionales en la RIC. Sin embargo, en el pinzón cebra (*Taeniopygia guttata*) hay evidencia experimental de efectos inter-generacionales de la experiencia natal de la madre: crecer en una nidada grande (presumiblemente recibiendo menos alimento en consecuencia) tiene un impacto negativo en el tamaño en la adultez y en el éxito reproductivo de la progenie (Naguib et al., 2006).

Una posible explicación a la falta de diferencias en RIC y condición corporal entre primeras y segundas crías del bobo de patas azules durante la vida adulta, encontradas en este estudio, es que la mortalidad diferencial de segundas crías durante la infancia haya eliminado de la muestra a los individuos menos viables y vigorosos. Otra explicación es

que la selección natural favorezca a las crías capaces de superar las condiciones adversas experimentadas en la infancia cuando ocupan segundo lugar en la nidada; es decir, que las crías de este bobo no son perjudicadas a largo plazo por la adversidad asociada a la subordinación temprana porque su ontogénesis amortigua contra dicha adversidad.

Cabe notar que la mayoría de los estudios que observan efectos a largo plazo de condiciones adversas experimentadas durante el desarrollo temprano (revisados en: Metcalfe & Monaghan, 2001) han sido realizados en condiciones controladas de laboratorio o experimentales de campo en las que someten a los individuos a situaciones extremas que probablemente no experimentan en su vida silvestre. En contraste, el presente estudio es descriptivo y fue realizado en condiciones naturales, por lo que analizó los efectos a largo plazo sobre los cuales la selección natural ha tenido oportunidad de actuar.

En general, los resultados de este estudio apuntan a que no hay diferencias a largo plazo en la condición corporal o RIC como resultado del estrés agonístico y nutricional asociado a la subordinación o la dominancia en el bobo de patas azules. Sin embargo, existe la posibilidad de que dichos resultados se deban a limitantes metodológicas. La prueba de fitohemaglutinina que se utilizó es una técnica que mide sólo el aspecto celular del sistema inmune de un individuo y es posible que los efectos de la experiencia temprana de la competencia entre hermanos se vean reflejados en otros aspectos del sistema inmune que no fueron evaluados en el presente estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. 2002. *Molecular Biology of the Cell*, 4th edn. Garland Science, New York.
- Alonso-Alvarez, C. & Tella, J. L. 2001. Effects of experimental food restriction and body-mass changes on the avian T-cell-mediated immune response. *Canadian Journal of Zoology* **79**: 101.
- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S. & Sorci, G. 2007. Sex-specific transgenerational effects of early developmental conditions in a passerine. *Biological Journal of the Linnean Society* **91**: 469-474.
- Bogdanova, M. I., Nager, R. G. & Monaghan, P. 2006. Does parental age affect offspring performance through differences in egg quality? *Functional Ecology* **20**: 132-141.
- Bogdanova, M. I., Nager, R. G. & Monaghan, P. 2007. Age of the incubating parents affects nestling survival: an experimental study of the herring gull *Larus argentatus*. *Journal of Avian Biology* **38**: 83-93.
- Brommer, J. E. 2004. Immunocompetence and its costs during development: an experimental study in blue tit nestlings. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **271**: S110-S113.
- Callahan, H. S., Pigliucci, M. & Schlichting, C. D. 1997. Developmental phenotypic plasticity: Where ecology and evolution meet molecular biology. *Bioessays* **19**: 519-525.
- Clutton-Brock, T. H. 1984. Reproductive Effort and Terminal Investment in Iteroparous Animals. *The American Naturalist* **123**: 212-229.

- Coulson, J. C. & Porter, J. M. 1985. Reproductive success of the Kittiwake *Rissa tridactyla*: the roles of clutch size, chick growth rates and parental quality. *Ibis* **127**: 450-466.
- Crawley, M. J. 2003. *Statistical Computing: an Introduction to Data Analysis Using S-Plus*. J. Wiley, Chichester.
- Creel, S. 2001. Social dominance and stress hormones. *Trends in Ecology & Evolution* **16**: 491-497.
- Cucco, M., Guasco, B., Malacarne, G., Ottonelli, R. & Tanvez, A. 2008. Yolk testosterone levels and dietary carotenoids influence growth and immunity of grey partridge chicks. *General and Comparative Endocrinology* **156**: 418-425.
- Christe, P., Moller, A. P. & Lope, F. D. 1998. Immunocompetence and nestling survival in the house martin: the tasty chick hypothesis. *Oikos* **83**: 175-179.
- D'Alba, L. & Torres, R. 2007. Seasonal egg-mass variation and laying sequence in a bird with facultative brood reduction. *Auk* **124**: 643-652.
- Daunt, F., Wanless, S., Harris, M. P. & Monaghan, P. 1999. Experimental Evidence That Age-Specific Reproductive Success is Independent of Environmental Effects. *Proceedings: Biological Sciences* **266**: 1489-1493.
- Dentressangle, F., Boeck, L. & Torres, R. 2008. Maternal investment in eggs is affected by male feet colour and breeding conditions in the blue-footed booby, *Sula nebouxii*. *Behavioral Ecology & Sociobiology* **62**: 1899-1908.
- Desai, M. & Hales, C. N. 1997. Role of Fetal and Infant Growth in Programming Metabolism in Later Life. *Biological Reviews* **72**: 329-348.

- Drummond, H., González, E. & Osorno, J. L. 1986. Parent-offspring cooperation in the blue-footed booby (*Sula nebouxii*): Social roles in infanticidal brood reduction. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **19**: 365-372.
- Drummond, H., Osorno, J. L., Torres, R., Chavelas, C. G. & Larios, H. M. 1991. Sexual Size Dimorphism and Sibling Competition: Implications for Avian Sex Ratios. *The American Naturalist* **138**: 623-641.
- Drummond, H., Rodriguez, C. & Schwabl, H. 2008. Do mothers regulate facultative and obligate siblicide by differentially provisioning eggs with hormones? *Journal of Avian Biology* **39**: 139-143.
- Drummond, H., Torres, R. & Krishnan, V. V. 2003. Buffered development: resilience after aggressive subordination in infancy. *The American Naturalist* **161**: 794-807.
- Eraud, C., Trouvé, C., Dano, S., Chastel, O. & Faivre, B. 2008. Competition for resources modulates cell-mediated immunity and stress hormone level in nestling collared doves (*Streptopelia decaocto*). *General and Comparative Endocrinology* **155**: 542-551.
- Fargallo, J. A., Laaksonen, T., Pöyri, V. & Korpimäki, E. 2002. Inter-sexual differences in the immune response of Eurasian kestrel nestlings under food shortage. *Ecology Letters* **5**: 95-101.
- Forslund, P. & Pärt, T. 1995. Age and reproduction in birds - hypotheses and tests. *Trends in Ecology & Evolution* **10**: 374-378.
- Futuyma, D. J. 1998. *Evolutionary Biology*, 3^o edn. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- García Cerecedo, M.A. & Saavedra Sordo, M.T. 1997. Variación interanual en el éxito reproductivo del bobo de patas azules (*Sula nebouxii*) y sus implicaciones en la

reducción facultativa de la nidada. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.

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

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

Griffiths, R., Double, M. C., Orr, K. & Dawson, R. J. G. 1998. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* **7**: 1071-1076.

Guerra, M. & Drummond, H. 1995. Reversed Sexual Size Dimorphism and Parental Care: Minimal Division of Labour in the Blue-Footed Booby. *Behaviour* **132**: 479-496.

Gustafsson, L., Qvarnstrom, A. & Sheldon, B. C. 1995. Trade-offs between life-history traits and a secondary sexual character in male collared flycatchers. *Nature* **375**: 311-313.

Hargitai, R., Prechl, J. & Torok, J. 2006. Maternal immunoglobulin concentration in Collared Flycatcher (*Ficedula albicollis*) eggs in relation to parental quality and laying order. *Functional Ecology* **20**: 829-838.

Hayward, L. S. & Wingfield, J. C. 2004. Maternal corticosterone is transferred to avian yolk and may alter offspring growth and adult phenotype. *General and Comparative Endocrinology* **135**: 365-371.

- Hegyí, G., Rosivall, B. & Török, J. 2006. Paternal age and offspring growth: separating the intrinsic quality of young from rearing effects. *Behavioral Ecology & Sociobiology* **60**: 672-682.
- Hörak, P., Tegelmann, L., Ots, I. & Møller, A. P. 1999. Immune function and survival of great tit nestlings in relation to growth conditions. *Oecologia* **121**: 316-322.
- Jakob, E. M., Marshall, S. D. & Uetz, G. W. 1996. Estimating fitness: A comparison of body condition indices. *Oikos* **77**: 61-67.
- Kogel, C. H. D. 1997. Long-Term Effects of Brood Size Manipulation on Morphological Development and Sex-Specific Mortality of Offspring. *The Journal of Animal Ecology* **66**: 167-178.
- Krause, J. & Ruxton, G. 2002. *Living in Groups* Oxford University Press, Oxford.
- Lindström, J. 1999. Early development and fitness in birds and mammals. *Trends in Ecology & Evolution* **14**: 343-348.
- Lochmiller, R. L. & Deerenberg, C. 2000. Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos* **88**: 87-98.
- Martin-Vivaldi, M., Ruiz-Rodriguez, M., Mendez, M. & J. Soler, J. 2006. Relative importance of factors affecting nestling immune response differs between junior and senior nestlings within broods of hoopoes *Upupa epops*. *Journal of Avian Biology* **37**: 467-476.
- Martin, L. B., Han, P., Lewittes, J., Kuhlman, J. R., Klasing, K. C. & Wikelski, M. 2006. Phytohemagglutinin-induced skin swelling in birds: histological support for a classic immunoecological technique. *Functional Ecology* **20**: 290-299.
- Metcalfé, N. B. & Monaghan, P. 2001. Compensation for a bad start: grow now, pay later? *Trends in Ecology & Evolution* **16**: 254-260.

- Möller, A. P., Sorci, G. & Erritzoe, J. 1998. Sexual Dimorphism in Immune Defense. *The American Naturalist* **152**: 605-619.
- Moreno, J., Merino, S., J. Sanz, J., Arriero, E., Morales, J. & Tomas, G. 2005. Nestling cell-mediated immune response, body mass and hatching date as predictors of local recruitment in the pied flycatcher *Ficedula hypoleuca*. *Journal of Avian Biology* **36**: 251-260.
- Moreno, J., Sanz, J. J. & Arriero, E. 1999. Reproductive effort and T-lymphocyte cell-mediated immunocompetence in female pied flycatchers *Ficedula hypoleuca*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **266**: 1105-1109.
- Mousseau, T. A. & Fox, C. W. 1998. The adaptive significance of maternal effects. *Trends in Ecology & Evolution* **13**: 403-407.
- Müller, W., Dijkstra, C. & Groothuis, T. G. G. 2003. Inter-sexual differences in T-cell-mediated immunity of black-headed gull chicks (*Larus ridibundus*) depend on the hatching order. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **55**: 80-86.
- Naguib, M. & Gil, D. 2005. Transgenerational effects on body size caused by early developmental stress in zebra finches. *Biology Letters* **1**: 95-97.
- Naguib, M., Nemitz, A. & Gil, D. 2006. Maternal developmental stress reduces reproductive success of female offspring in zebra finches. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **273**: 1901-1905.
- Nelson, J. B. 2005. *Pelicans, Cormorants, and their Relatives The Pelecaniformes* Oxford University Press Inc., New York.
- Norris, K. & Evans, M. R. 2000. Ecological immunology: life history trade-offs and immune defense in birds. *Behavioral Ecology* **11**: 19-26.

- Núñez de la Mora, A., Drummond, H. & Wingfield, J. 1996. Hormonal correlates of dominance and starvation-induced aggression in chicks of the blue-footed booby. *Ethology* **102**: 748-761.
- Osorno, J. L. & Drummond, H. 1995. The function of hatching asynchrony in the blue-footed booby. *Behavioral Ecology Sociobiology* **37**: 265-273.
- Parejo, D., Silva, N. & Avilés, J. M. 2007. Within-brood size differences affect innate and acquired immunity in roller *Coracias garrulus* nestlings. *Journal of Avian Biology* **38**: 717-725.
- Perrins, C. M. 1970. The Timing of Birds' Breeding Seasons. *Ibis* **112**: 242-255.
- Piersma, T. & Lindstrom, A. 1997. Rapid reversible changes in organ size as a component of adaptive behaviour. *Trends in Ecology & Evolution* **12**: 134-138.
- Pihlaja, M., Siitari, H. & Alatalo, R.V. 2006. Maternal antibodies in a wild altricial bird: effects on offspring immunity, growth and survival. *Journal of Animal Ecology* **75**: 1154-1164.
- Price, T. 1998. Maternal and Parental Effects in Birds. In: *Maternal Effects as Adaptations* (eds Mousseau, T. A. & Fox, C. W.), pp. 375. Oxford University Press U.S.
- Roitt, I. M., Brustuff, J. & Male, D. K. 2000. *Inmunología*, 5a edn. Hartcourt Brace, Madrid.
- Roulin, A., Brinkhof, M. W. G., Bize, P., Richner, H., W., T., Bavoux, J. C., Boileau, N. & Burneleau, G. 2003. Which chick is tasty to parasites? The importance of host immunology vs. parasite life history. *Journal of Animal Ecology* **72**: 75-81.
- Royle, N. J., Lindström, J. & Metcalfe, N. B. 2005. A poor start in life negatively affects dominance status in adulthood independent of body size in green swordtails

- Xiphophorus helleri*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **272**: 1917-1922.
- Rubolini, D., Romano, M., Boncoraglio, G., Ferrari, R. P., Martinelli, R., Galeotti, P., Fasola, M. & Saino, N. 2005. Effects of elevated egg corticosterone levels on behavior, growth, and immunity of yellow-legged gull (*Larus michahellis*) chicks. *Hormones and Behavior* **47**: 592-605.
- Saino, N., Calza, S. & Möller, A. P. 1997. Immunocompetence of Nestling Barn Swallows in Relation to Brood Size and Parental Effort. *The Journal of Animal Ecology* **66**: 827-836.
- Saino, N., Incagli, M., Martinelli, R., Ambrosini, R. & Möller, A. P. 2001. Immunity, growth and begging behaviour of nestling Barn Swallows *Hirundo rustica* in relation to hatching order. *Journal of Avian Biology* **32**: 263-270.
- Sheldon, B. C. & Verhulst, S. 1996. Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends in Ecology & Evolution* **11**: 317-321.
- Smits, J. E., Bortolotti, G. R. & Tella, J. L. 1999. Simplifying the phytohaemagglutinin skin-testing technique in studies of avian immunocompetence. *Functional Ecology* **13**: 567-572.
- Soler, J. J., Moreno, J. & Potti, J. 2003. Environmental, genetic and maternal components of immunocompetence of nestling pied flycatchers from a cross-fostering study. *Evolutionary Ecology Research* **5**: 259-272.
- Soler, J. J., Neve, L. d., Pérez-Contreras, T., Soler, M. & Sorci, G. 2003. Trade-off between immunocompetence and growth in magpies: an experimental study. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **270**: 241-248.

- Stadecker, M. J., Lukic, M., Dvorak, A. & Leskowitz, S. 1977. The cutaneous basophil response to phytohemagglutinin in chickens. *Journal of Immunology* **118**: 1564-1568.
- Tella, J. L., Bortolotti, G. R., Forero, M. G. & Dawson, R. D. 2000. Environmental and genetic variation in T-cell-mediated immune response of fledgling American kestrels. *Oecologia* **123**: 453-459.
- Tella, J. L., Forero, M. G., Bertelotti, M., Donázar, J. A., Blanco, G. & Ceballos, O. 2001. Offspring body condition and immunocompetence are negatively affected by high breeding densities in a colonial seabird: a multiscale approach. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **268**: 1455-1461.
- Tella, J. L., Scheuerlein, A. & Ricklefs, R. E. 2002. Is cell-mediated immunity related to the evolution of life-history strategies in birds? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **269**: 1059-1066.
- Torres, R. & Drummond, H. 1999. Variably male-biased sex ratio in a marine bird with females larger than males. *Oecologia* **118**: 16-22.
- Tschirren, B., Fitze, P. S. & Richner, H. 2003. Sexual dimorphism in susceptibility to parasites and cell-mediated immunity in great tit nestlings. *Journal of Animal Ecology* **72**: 839-845.
- Valderrábano-Ibarra, C., Brumon, I. & Drummond, H. 2007. Development of a linear dominance hierarchy in nestling birds. *Animal Behaviour* **74**: 1705-1714.
- Vallarino, A., Wingfield, J. C. & Drummond, H. 2006. Does extra corticosterone elicit increased begging and submissiveness in subordinate booby (*Sula nebouxii*) chicks? *General and Comparative Endocrinology* **147**: 297-303.

- Velando, A. 2002. Experimental manipulation of maternal effort produces differential effects in sons and daughters: implications for adaptive sex ratios in the blue-footed booby. *Behavioral Ecology* **13**: 443-449.
- Velando, A., Beamonte-Barrientos, R. & Torres, R. 2006. Pigment-based skin colour in the blue-footed booby: an honest signal of current condition used by females to adjust reproductive investment. *Oecologia* **149**: 535-542.
- Verhulst, S., Holveck, M.-J. & Riebel, K. 2006. Long-term effects of manipulated natal brood size on metabolic rate in zebra finches. *Biology Letters* **2**: 478-481.
- Verhulst, S., Riedstra, B. & Wiersma, P. 2005. Brood size and immunity costs in zebra finches *Taeniopygia guttata*. *Journal of Avian Biology* **36**: 22-30.
- Verhulst, S., van Balen, J. H. & Tinbergen, J. M. 1995. Seasonal decline in reproductive success of the great tit: Variation in time or quality? *Ecology* **76**: 2392.
- Visser, H. G. 1998. Development of temperature regulation. In: *Avian Growth and Development. Evolution within the altricial-precocial spectrum* (eds Starck, J. M. & Ricklefs, R. E.), pp. 117-156. Oxford University Press, New York.
- Wilk, T., Dubiec, A. & Cichon, M. 2007. Seasonal decline in cell-mediated immunity of collared flycatcher *Ficedula albicollis* nestlings: does the sex of offspring matter? *Journal of Ornithology* **148**: 199-205.

APÉNDICE I

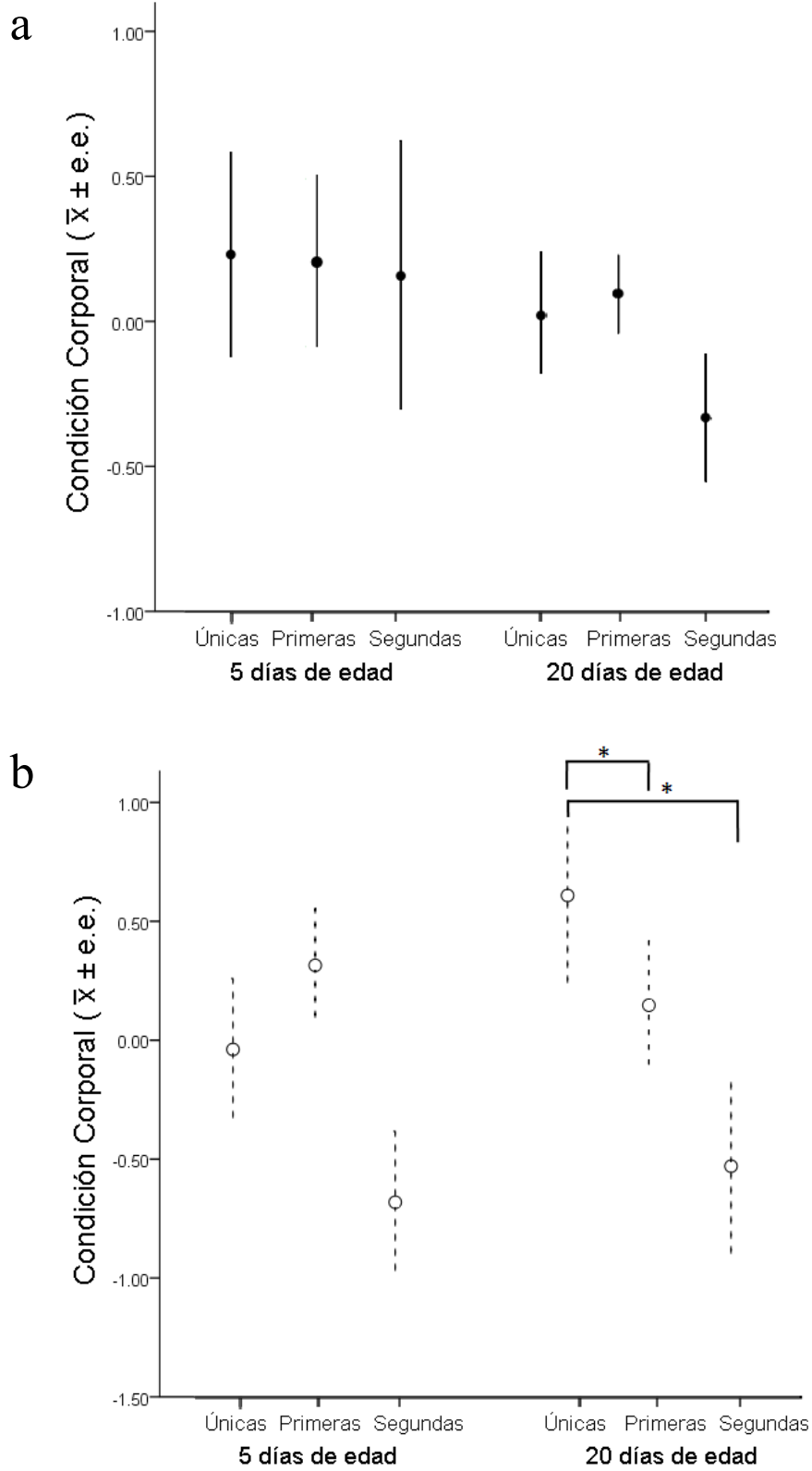


Figura 11. Condición corporal según el orden de eclosión de crías a los 5 y 20 días de edad: (a) macho (●) y (b) hembra (○).

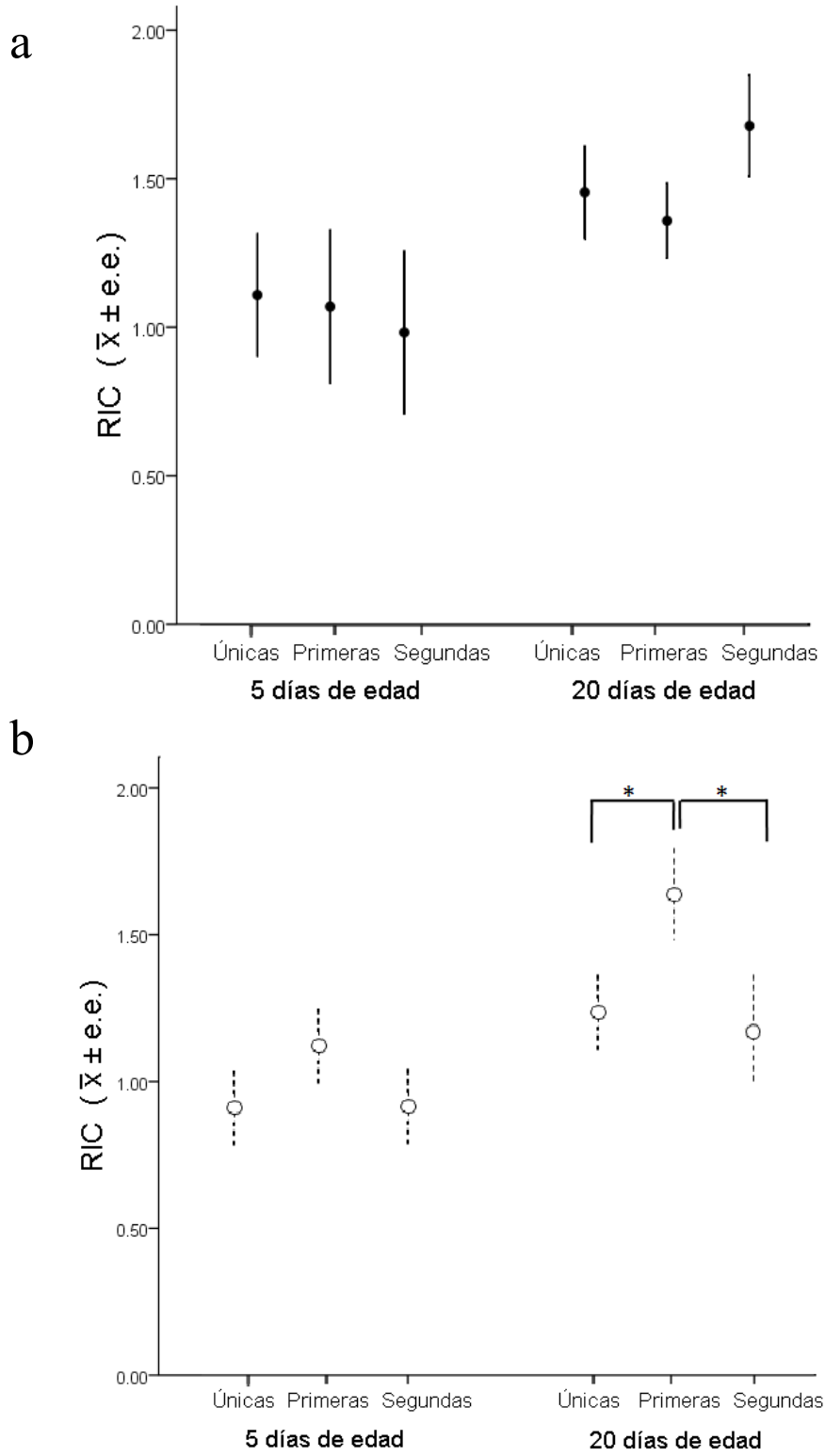


Figura 12. RIC según el orden de eclosión de crías a los 5 y 20 días de edad: (a) macho (●) y (b) hembra (○).

APÉNDICE II

Extracción de ADN

Para cada muestra de 200 μl de sangre se agregan 20 μl de la solución de proteinasa K y 400 μl de solución de lisis, se mezcla bien por medio de un vórtex y se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se coloca la columna selectiva de ADN genómico dentro del tubo colector y se transfiere la muestra a la columna. Se centrifuga por 1 min a 11,000 g, se deshecha lo que queda en el tubo colector, se añaden 500 μl de la solución de lisis a la columna y se centrifuga de nuevo por 1 min a 11,000 g. Se deshecha lo que queda en el tubo colector, se añaden 500 μl de buffer de lavado a la columna, se centrifuga por 3 min a 11,000 g y se deshecha nuevamente lo que queda en el tubo colector. Por último se transfiere la columna a un tubo nuevo, se agregan 200 μl o 100 μl de buffer de elusión precalentado a 70°C (para aumentar concentración final de ADN), se incuba la columna por un minuto a temperatura ambiente y se centrifuga a 11,000 g por 1 min para recuperar el ADN genómico.

Amplificación y Electroforesis

Se toman 2 μl de la dilución obtenida en la extracción de ADN y se añaden a cada muestra: 1 μl de buffer (10X), 0.8 μl de MgCl_2 (50mM), 0.2 μl de dNTPs (10mM), 1 μl de primer 2550F (10 pmol, GTT ACT GAT TCG TCT ACG AGA), 1 μl del primer 2718 R (10pmol, ATT GAA ATG ATC CAG TGC TTG), 0.1 μl de taq (100U/ μl) y 13.9 μl de agua destilada. Para amplificar los genes CHD-W y CHD-Z (Griffiths et al., 1998), se realiza un PCR (por sus siglas en inglés, Polimerase Chain Reaction). Cada reacción inicia a 94°C durante 1 min 30s, seguida de 30 ciclos de 30s a 94°C, 45 s a 42°C, y termina con un ciclo de 5 min a 72°C.

El ADN amplificado se tiñe con 2 μl de azul de bromo-fenol y para separar las bandas de ADN se realiza una electroforesis con un gel de agarosa al 2% a temperatura ambiente durante 30 min a 120V utilizando como buffer de corrida TBE 0.5x. (0.5x: 0.045 mol/L Tris/borate, 0.002 mL EDTA). El gel se tiñe en Br-Et (0.01%) durante 5 min y las bandas se identifican bajo luz UV. El sexo de los individuos se determina en base al patrón de bandas de ADN en el gel: una banda única indica que se trata de un macho y dos bandas indican que se trata de una hembra (Griffiths et al., 1998).

APÉNDICE III

En ésta sección se reporta el resumen de los modelos finales de cada análisis realizado. No se reportan los modelos en el que el modelo mínimo adecuado fue el nulo.

Modelo final: Condición Corporal en Crías de 5 días de edad

Condición Corporal ~ Fecha de Eclosión

	Valor	Error Std.	GL	valor-t	valor-p
(Intercepto)	1945.24	687.55	39	2.84	0.01
Fecha de Eclosión	-0.05	0.018	13	-2.84	0.01

Modelo final: Condición Corporal en Crías de 20 días de edad

Condición Corporal ~ Orden de Eclosión + Edad exacta + Sexo + Orden de Eclosión:Sexo

	Valor	Error Std.	GL	valor-t	valor-p
(Intercepto)	-9.72	1.49	60	-6.52	0.00
Orden Eclosión[Primera]	0.44	0.29	16	1.52	0.15
Orden Eclosión[Segunda]	-0.28	0.31	16	-0.91	0.37
Edad Exacta	0.47	0.07	16	6.61	0.00
Sexo[Hembra]	0.87	0.34	16	2.54	0.02
Orden Eclosión[Primera]:Sexo[Hembra]	-1.28	0.42	16	-3.01	0.01
Orden Eclosión[Segunda]:Sexo[Hembra]	-1.29	0.44	16	-2.92	0.01

Modelo final: Condición Corporal en Crías de 20 días de edad HEMBRAS

Condición Corporal ~ Orden de Eclosión + Edad exacta

	Valor	Error Std.	GL	valor-t	valor-p
(Intercepto)	-7.92	2.79	31	-2.83	0.01
Orden Eclosión[Primera]	-1.03	0.46	3	-2.25	0.11
Orden Eclosión[Segunda]	-1.09	0.46	3	-2.35	0.10
Edad Exacta	0.42	0.14	3	3.07	0.05

Modelo final: RIC en Crías de 5 días de edad

RIC ~ Edad Madre + Condición Corporal Cría

	Valor	Error Std.	GL	valor-t	valor-p
(Intercepto)	1.61	0.27	38	5.89	0.00
Edad Madre	-0.09	0.04	38	-2.26	0.03
Condición Corporal	0.16	0.06	13	2.66	0.02

Modelo final: RIC en Crías de 20 días de edad

RIC ~ Orden de Eclosión + Sexo + Orden de Eclosión:Sexo

	Valor	Error Std.	GL	valor-t	valor-p
(Intercepto)	1.45	0.14	60	10.50	0.00
Orden de Eclosión[Primera]	-0.09	0.20	17	-0.47	0.64
Orden de Eclosión[Segunda]	0.21	0.22	17	0.96	0.35
Sexo[Hembra]	-0.23	0.22	17	-1.02	0.32
Orden Eclosión[Primera]:Sexo[Hembra]	0.48	0.30	17	1.59	0.13
Orden Eclosión[Segunda]:Sexo[Hembra]	-0.28	0.32	17	-0.87	0.40

Modelo final: RIC en Crías de 20 días de edad HEMBRAS

RIC ~ Orden de Eclosión

	Valor	Error Std.	GL	valor-t	valor-p
(Intercepto)	1.23	0.15	31	8.26	0.00
Orden de Eclosión[Primera]	0.56	0.19	4	2.94	0.04
Orden de Eclosión[Segunda]	-0.29	0.19	4	-1.50	0.21

Modelo final: RIC en hembras de 3-8 años

RIC ~ Fecha de puesta

	Valor	Error Std.	valor-t	p
(Intercepto)	-527.5	192.6	-2.74	0.01
Fecha de puesta	0.01	0.004	2.75	0.01