



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

Biología evolutiva

**EFFECTO DE LA EDAD DE LOS PADRES SOBRE LA
RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA A
GARRAPATAS (ACARI: IXODIDA: ARGASIDAE) DE
CRÍAS DE BOBO DE PATAS AZULES (*SULA
NEBOUXII*)**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ALDO VELA GUTIÉRREZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:
DR. HUGH DRUMMOND DUREY
INSTITUTO DE ECOLOGÍA

COMITÉ TUTOR:
DR. ISAAC GONZÁLEZ SANTOYO
FACULTAD DE PSICOLOGÍA
DRA. MARÍA DEL CARMEN GUZMÁN CORNEJO
FACULTAD DE CIENCIAS

CD. MX.

FEBRERO, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

Biología evolutiva

**EFFECTO DE LA EDAD DE LOS PADRES SOBRE LA
RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA A
GARRAPATAS (ACARI: IXODIDA: ARGASIDAE) DE
CRÍAS DE BOBO DE PATAS AZULES (*SULA
NEBOUXII*)**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ALDO VELA GUTIÉRREZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:
DR. HUGH DRUMMOND DUREY
INSTITUTO DE ECOLOGÍA

COMITÉ TUTOR:
DR. ISAAC GONZÁLEZ SANTOYO
FACULTAD DE PSICOLOGÍA
DRA. MARÍA DEL CARMEN GUZMÁN CORNEJO
FACULTAD DE CIENCIAS

MÉXICO, CD. MX.

FEBRERO, 2020

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD INSTITUTO DE ECOLOGÍA

OFICIO CPCB/094/2020

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

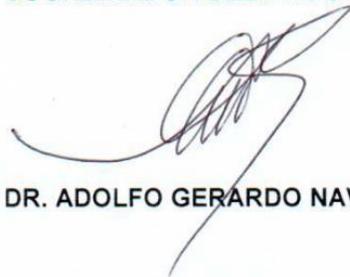
Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **11 de noviembre de 2019** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **(Biología Evolutiva.)** del estudiante **VELA GUTIÉRREZ ALDO** con número de cuenta **517007727** con la tesis titulada **"EFECTO DE LA EDAD DE LO PADRES SOBRE LA RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA A GARRAPATAS (Acari:Ixodida:Argasidae) DE CRÍAS DE BOBO DE PATAS AZULES (*Sula neboxii*)"**, realizada bajo la dirección del DR. HUGH DRUMMOND DUREY, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. CARLOS RAFAEL CORDERO MACEDO
Vocal: DR. RAÚL CUEVA DEL CASTILLO MENDOZA
Secretario: DR. ISAAC GONZÁLEZ SANTOYO
Suplente: DR. GARY GARCÍA ESPINOSA
Suplente: M EN C. ALEJANDRA GUTIÉRREZ ESTRADA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 27 de enero de 2020

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



c. c. p. Expediente del alumno

Agradecimientos institucionales

Agradezco al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por proporcionar los fundamentos de mi desarrollo como profesional y mi formación científica.

A Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), agradezco el apoyo financiero otorgado en forma de beca de maestría del 1 de agosto de 2016 al 31 de julio de 2018 (No. De becario 607883).

A NATGEO por el apoyo económico (número de apoyo 9974-16) que permitió llevar a cabo este proyecto.

Al Dr. Hugh Drummond Durey agradezco su infinita paciencia y apoyo en mi formación académica.

A mi comité tutor, Dra. María del Carmen Guzmán y Dr. Isaac Santoyo, por las aportaciones hechas durante las juntas de trabajo y tutoriales.

Agradecimientos personales

Agradezco a mis padres Alberto y Marcela, por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de tantos años, sobre todo a mi madre, por ser el pilar que ha sostenido a esta familia desde que tengo memoria.

A mi hermana Aida y mi cuñado Edgar, agradezco el siempre estar a mi lado y ayudarme a entender que la vida es mejor en compañía de quien te quiere.

A Nena y Tere, mis tías adoradas, por siempre creer en mí y apoyarme a lo largo del camino.

A mi tutor Hugh Drummond, agradezco la paciencia que ha tenido para conmigo, gracias por haber entendido y respetado el tiempo que he dedicado a situaciones familiares en estos años.

A los veterinarios de la UAM Xochimilco; Osvaldo, Emilio, Claudia y Nora, por apoyar con todo su conocimiento a mi formación y ser piezas claves de este proyecto. Gracias por ser seres humanos de una calidad extraordinaria.

Quisiera dedicarle un agradecimiento especial a Santiago, por su amistad y gran apoyo a nivel académico, sin el cual este trabajo no hubiera sido posible. Es un verdadero honor aprender de alguien tan joven y talentoso.

A la Facultad de Psicología y al Instituto de Investigaciones de la UNAM, por permitirme el uso de sus instalaciones para llevar a cabo las pruebas moleculares.

Alejandra y José Alberto, por ayudarme en la transición de biólogo de campo a biólogo de laboratorio, además de haber diseñado la estandarización de la técnica de ELISA.

Al Dr. Carlos Rafael Cordero Macedo, el Dr. Raúl Cueva del Castillo Mendoza, el Dr. Isaac Gonzáles Santoyo, al Dr. Gary García Espinosa y a la M. en C. Alejandra Gutiérrez Estrada como miembros de mi jurado de examen.

A los compañeros y excompañeros del laboratorio de conducta animal; Oscar, Lynna, Cristina, Laura, Santiago, Verónica, Ilse, Dante, Pablo, Yoli y Víctor por todos sus consejos tanto en lo académico como en lo personal.

Por último, pero no menos importante, quisiera agradecer a Jessica por centrarme en la vida y enseñarme que sin importar las dificultades la vida es bella si estas con la persona indicada.

Índice

Resumen	1
Introducción	3
I. Anticuerpos	6
Hipótesis	8
Predicción	8
Métodos	8
I. Intercambios	8
II. Muestreo de sangre	9
III. Cuantificación de IgY	10
IV. Análisis estadísticos	10
Resultados	12
Discusión	15
Bibliografía	17
Apéndices 1.....	25
Apéndices 2.....	26
Apéndices 3.....	27
Apéndices 4.....	28

Resumen

En animales de vida larga, es de esperarse que el costo de la reproducción y el éxito reproductivo varíen con la edad, generando compromisos en la distribución de recursos finitos entre funciones somáticas y funciones reproductivas. Como resultado de estas disyuntivas se han reportado dos tipos de efectos de la edad de los padres sobre la descendencia; a) negativos, debido al deterioro celular y del ADN germinal; y b) positivos, debido a que solo los mejores fenotipos llegan a la vejez dentro de una población. Sin embargo, el estudio de estos efectos se ha visto sesgado por la dificultad de muestrear a través de un rango completo de edades en animales de vida libre. Además, aunque es muy poco explorado, es posible que las crías no estén afectadas solamente por la edad de cada progenitor por separado, sino a la interacción entre las edades de ambos. Por ejemplo, dos estudios previos en el bobo de patas azules han reportado que en las crías aumenta la viabilidad y disminuye la abundancia de garrapatas entre más difiere la edad entre los padres. Elementos de la respuesta inmune adaptativa como las inmunoglobulinas tipo Y (IgY) podrían ser un indicador para los efectos de la edad parental sobre las crías. Los IgY se transfieren por la madre a través de la yema y se ha visto que protegen a la cría durante sus primeros días de vida. Además, algunos estudios sugieren que la transferencia materna de anticuerpos se regula por la edad y condición biológica de la hembra, así como la de su pareja. En esta tesis, hice un estudio para detectar si en las crías de bobo de patas azules existen efectos de la diferencia de edad de los padres sobre el título de IgY en las crías. Para responder a esto se usó como población de estudio la colonia de bobos de la Isla Isabel, Nayarit. Se establecieron nidos experimentales mediante el intercambio recíproco de puestas con padres de diferentes combinaciones de edades con la finalidad de distinguir los efectos del contenido del huevo de los efectos del cuidado parental, lo cual también difiere dependiendo de la edad de los progenitores. Se tomó sangre de las crías experimentales a los 20, 35 y 50 días de edad, y se calculó el título de IgY a través del método de ELISA. Se analizó si existían efectos de la diferencia de edad de los padres sobre el nivel de anticuerpos mediante modelos lineales mixtos (LMM, por sus siglas en inglés). No se encontró efectos de la diferencia de edades ni de padres biológicos ni de los adoptivos sobre el título de IgY. No obstante, se vio un efecto de la edad de la cría sobre los IgY; a medida que la cría crece, el nivel de anticuerpos desciende. También, se detectó un efecto de la interacción de la edad de la madre biológica con la edad de la cría sobre el título de anticuerpos; en las crías de madres jóvenes la concentración de IgY disminuyó ligeramente con la edad de la cría, mientras en las crías de madres viejas el descenso en el título de anticuerpos fue significativamente más marcado. Los resultados parecen indicar que en los bobos los efectos de las combinaciones de edad de los padres sobre la viabilidad de crías no se deben a efectos sobre la respuesta inmunitaria por IgY, al menos entre los 20 y 50 días de edad de las crías. Sin embargo, los resultados sugieren que sí existen efectos maternos sobre la respuesta inmunitaria de los bobos.

Abstract

In long-lived animals, it is expected that the cost of reproduction and reproductive success vary with age, generating trade-offs in the distribution of resources between somatic functions, reproductive functions. As a result of these trade-offs, two types of effects of parental age on offspring have been reported; a) negative, due to cellular and germ DNA damage; and b) positive, because within a population only high-quality phenotypes reach old age. However, the study of these effects in wild animals has been biased by the difficulty of sampling across the full age range of the study species. Furthermore, while it has not well explored, it is possible that the effects on offspring are due not only to effects of each parent's age alone, but the interaction between the two parents' ages. For example, in the blue-footed booby previous studies have shown that offspring viability increases, and the abundance of ticks decreases with increasing age difference between the chicks' parents. Elements of the adaptive immune response such as type Y immunoglobulins (IgY) could be an indicator of the effects of parental age on chicks. IgY are transferred by the mother through the yolk and have been shown to protect the young during its first days of life. In addition, studies suggest that maternal transfer of antibodies is regulated by the age and biological condition of the mother, as well as those of her partner. In this thesis, I carried out a study to detect if the difference in parental ages affects the IgY titer of the offspring using the blue-footed booby colony on Isabel Island, Nayarit, as the study population. Experimental nests were made by reciprocal exchange of clutches between sets of parents of different age combinations, in order to distinguish between the effects of egg contents (biological parents) and effects of parental care (adoptive parents). Blood was taken from the experimental offspring at 20, 35 and 50 days of age, and the IgY titer was calculated through the ELISA method. Linear mixed models (LMM) were used to analyze whether there were effects of the parents' age difference on chicks' antibody levels. There were no apparent effects of the age difference among the biological or adoptive parents on the IgY titer. However, there was an effect of chick age on IgY; as chicks aged, the level of antibodies dropped. There was also an effect of the interaction of the biological mother's age with the age of the chick on the antibody titer; among chicks of young biological mothers, IgY decreased slightly with the age of the offspring, while among chicks of old mothers, the decrease in antibody titer with chick age was significantly more pronounced. These results show that in blue-footed boobies, the previously demonstrated positive effects of increasing age difference between parents on the viability of the offspring are not due to the IgY immune response, at least between 20 and 50 days of age. However, they do suggest that there is an effect of maternal age on booby chicks' immune response.

Introducción

Durante la vida de un individuo, el costo de la reproducción y el esfuerzo reproductivo varía con la edad, moldeando las historias de vida y la dinámica poblacional de los animales (Nussey *et al.*, 2007; Lemaître *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015). La teoría de historias de vida establece que los individuos deben distribuir estratégicamente los recursos adquiridos entre funciones somáticas como el crecimiento, mantenimiento, reproducción, y supervivencia (Stearns, 1992), generando disyuntivas de historia de vida (Ratikainen y Kokko, 2010). Además, en animales de vida larga generalmente el desempeño en la reproducción aumenta durante los primeros años de vida, a medida que el individuo madura y adquiere experiencia (Limmer and Becker, 2009). No obstante, existe un decremento en el desempeño reproductivo asociado a la vejez debido al deterioro celular por la senescencia. A mayor edad la calidad del ADN de la línea germinal del individuo disminuye, lo que podría hacer a las crías más propensas a mutaciones potencialmente deletéreas (Aitken *et al.*, 2014). Sin embargo, en algunas poblaciones silvestres se ha observado que sólo ciertos fenotipos llegan a la vejez, lo que parece estar generando un efecto positivo de la edad del progenitor sobre la calidad genética de la descendencia (Manning, 1985).

Estos dos efectos – negativos y positivos – dominan los estudios sobre cómo la edad del progenitor afecta a la descendencia. Sin embargo, en su mayoría los efectos de la edad avanzada del progenitor sobre la progenie en los diferentes taxa son negativos. En algunos invertebrados se ha relacionado la edad avanzada de los padres con un menor éxito de eclosión de huevos, una reducción en la condición corporal de las crías y en su sobrevivencia (Price and Hansen, 1998; Jones, Balmford and Quinnell, 2000). En mamíferos disminuye la supervivencia juvenil, el aprendizaje y la capacidad motora de las crías (García-Palomares *et al.*, 2009); En aves como la golondrina común (*Hirundo rustica*) y el bobo de patas azules (*Sula nebouxii*) afecta la calidad del huevo, así como el crecimiento y el proceso inflamatorio de la respuesta inmune en las crías (Saino, Ambrosini, *et al.*, 2002; Beamonte-Barrientos *et al.*, 2010). No obstante, los efectos negativos de la edad podrían compensarse a través de ajustes estratégicos en la inversión reproductiva o de la elección de pareja (Paitz *et al.*, 2007; Johnson and Gemmell, 2012). Se ha visto tanto en gorriones como en los bobos que las hembras aumentan la inversión en el huevo (nutrientes y cuidado) si la condición biológica de su pareja es buena, aunque este efecto es aún poco explorado (Saino, Ferrari, *et al.*, 2002; Velando, Beamonte-Barrientos and Torres, 2006; Dentressangle, Boeck and Torres, 2008).

El conocimiento de efectos de la edad parental sobre la calidad de la descendencia se ha obstaculizado por dos sesgos generalizados en la literatura (ver Drummond and Rodríguez, 2015). En primer lugar, en animales de vida libre es difícil muestrear el rango completo de edades, por lo que frecuentemente se confunde entre la edad media y la vejez de los individuos. En segundo lugar, hacen falta estudios sobre los efectos de la interacción de edades del padre y de la madre sobre las crías (Price and Hansen, 1998; Jones, Balmford and Quinnell, 2000; Drummond and Rodríguez, 2015).

Drummond y Rodríguez (2015) investigaron la interacción de las edades de los progenitores sobre la calidad de la descendencia usando datos a largo plazo de una población del bobo de patas azules (*Sula nebouxii*). Al analizar la viabilidad de 3,361 crías con padres de hasta 21 años, descubrieron que las crías con ambos progenitores viejos (≥ 13 años) o ambos progenitores jóvenes (≤ 4 años) tienen menor probabilidad de convertirse en adultos reproductores que las crías con un progenitor viejo y otro joven. Especularon que: (1) los pollos cuyos padres pertenecen a dos cohortes distantes, sometidas a diferentes presiones selectivas y durante diferentes periodos de tiempo, suelen ser individuos con mayor heterocigocidad, o con genes de mejor calidad, o (2) el cuidado parental podría variar de manera compleja con las edades de los dos padres.

Un segundo estudio realizado en la misma colonia de bobos de patas azules, demostró que los pollos con un progenitor viejo (≥ 13 años) y uno joven (≤ 4 años) tenían una menor abundancia de garrapatas y mejor condición corporal que las crías cuyos padres fueron de edades similares (Ramos and Drummond 2017). Ambos rasgos podrían estar mediados por la inversión parental diferencial o la calidad genética de las crías, y verse reflejado en la eficiencia inmunológica de los pollos. Además, la variación en viabilidad de volantones descrita por Drummond y Rodríguez (2015) podría estar mediada por el daño infligido a los pollos por los parásitos o los costos a largo plazo de una baja inmunocompetencia que podría persistir hasta la edad adulta.

El bobo de patas azules, es un ave marina de vida larga (puede vivir más de 20 años), monógama, filopátrica, cuyas crías empluman alrededor del día 90 de vida y se reclutan como reproductores activos de la colonia entre los 2 y 6 años de vida (Nelson, 1978). Estos aspectos de la biología del bobo, así como la alta densidad de sus colonias lo hacen hospederos idóneos para ectoparásitos hematófagos (Choe, 2019). De hecho muchas especies de garrapatas han adaptado sus ciclos de vida a las temporadas de reproducción de aves marinas (Fig. 1; Dietrich, Gómez-Díaz and McCoy, 2011). Las garrapatas pueden reducir la sobrevivencia y el éxito reproductivo de las aves al alimentarse de su sangre e inyectar a través de la saliva factores tóxicos e inmunomoduladores

(Dusbábek, Uhler and Borský, 1994; Wikel and Bergman, 1997), además de ser vectores de patógenos (Dietrich *et al.*, 2011). Por ejemplo, en la saliva de las garrapatas se han reportado elementos proteicos y no proteicos moduladores de la respuesta inmune como la sialostanina Ly la prostaglandina E₂, además de toxinas como TSGP2 y TSGP4 que afectan el sistema cardiovascular del hospedero (Sá-Nunes *et al.*, 2007; Horka *et al.*, 2012). También pueden tener efectos negativos en el crecimiento y desarrollo de los polluelos, debido al compromiso entre el costo biológico de la respuesta inmune y el desarrollo somático (Morbey, 1996).

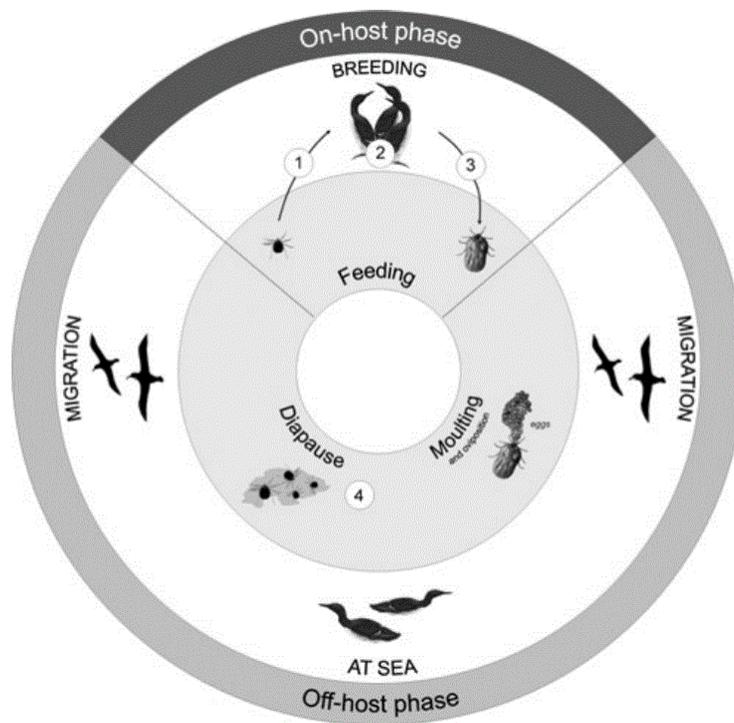


Fig. 1. Tomado de Dietrich *et al.*, 2011. Características generales de la interacción entre las aves marinas y las garrapatas. Cabe aclarar que el tiempo y duración de los diferentes periodos en los ciclos de vida varían con las especies. (1) Las garrapatas sin engordar buscan a su anfitrión. (2) Periodo de parasitismo sobre las aves marinas (El periodo de alimentación puede durar varios días). (3) La garrapata plétora se cae del hospedero. (4) La garrapata entra en hibernación en el área alrededor del hábitat.

En las aves la respuesta inmune a garrapatas incluye elementos tanto de la respuesta innata así como de la adquirida (Wikel and Bergman, 1997). Ante la picadura de una garrapata la respuesta inmune innata es la encargada de realizar el proceso inflamatorio y la colonización de células de respuesta (fagocitos y granulocitos) en la zona afectada (Schat, Kaspers and Kaiser, 2014). Los fagocitos no

sólo se encargan de eliminar patógenos, sino también de la presentación de los linfocitos con los patógenos para crear la memoria inmunitaria (respuesta adaptativa; Schat *et al.*, 2014). Al generarse la memoria inmunitaria, la defensa contra infestaciones subsecuentes se hace más eficiente, disminuyendo la magnitud de la infestación y el costo biológico de la respuesta inmune (Staszewski *et al.*, 2007). Por ejemplo, Dusbabek *et al.* (1994) realizaron tres infestaciones controladas de larvas de garrapata en gallinas (*Gallus gallus domesticus*), reportando un aumento de 74.6% en la cantidad de larvas que fallaron en adherirse al ave en la segunda infestación y 75.9% en la tercera. También encontraron un incremento en la cantidad de linfocitos y granulocitos en la sangre periférica a las picaduras, además de anticuerpos específicos a una proteína propia de las larvas.

Anticuerpos

Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) son glucoproteínas que se encuentran de forma soluble en la sangre u otros fluidos corporales de los vertebrados. Éstas son el componente del sistema de respuesta adaptativo, ya que neutralizan patógenos (Boulinier and Staszewski, 2014; Schat *et al.*, 2014). Las inmunoglobulinas del tipo “Y” o “IgY” son el tipo de anticuerpo circulante más común en aves (Davison, Kaspers and Schat, 2014), y se les denomina como anticuerpos maternos al ser transmitidos a las crías a través de la yema y al protegerlas durante los primeros días de vida (Nemeth *et al.*, 2008; Boulinier and Staszewski, 2014). Los anticuerpos maternos son fundamentales, no sólo para defender la cría contra enfermedades, sino también para evitar los altos costos biológicos de montar una respuesta inmune (Lobato *et al.*, 2012; Boulinier and Staszewski, 2014; Davison *et al.*, 2014).

Durante los primeros días de vida, el sistema inmune de las crías no es completamente funcional, por lo que depende en gran medida de los elementos de protección que los padres puedan aportar (Schat *et al.*, 2014). Los anticuerpos maternos protegen a la cría de manera pasiva (i.e. cuando un anticuerpo formado en un individuo es pasado a otro individuo en riesgo de una infección), haciéndola resistente a la enfermedad por virus o bacterias que hubiera contraído la madre (Lemke, Coutinho and Lange, 2004; Reid, Roberts and MacDuff, 2011; Schat, Kaspers and Kaiser, 2014). En las aves, la mayor concentración de IgY maternos se observa después de la eclosión y disminuye paulatinamente con la edad de los pollos (Hasselquist and Nilsson, 2009; Coughlan *et al.*, 2015). Diversos estudios sugieren que los anticuerpos transmitidos por la yema generan un efecto de bloqueo sobre la respuesta inmune adaptativa de las crías, pues la síntesis de los IgY propios comienza hasta que los anticuerpos maternos decaen (Garnier *et al.*, 2012; Boulinier and Staszewski, 2014; Murai *et al.*, 2016). Por ejemplo, en el pato de collar (*Anas platyrhynchos*), los

anticuerpos maternos descienden a partir del día 5 de vida y alcanzan su nivel mínimo alrededor del día 14, y a partir del día 20 de edad, los niveles de IgY propios de la cría incrementan (Liu and Higgins, 1990).

En las crías de especies modelo como gallinas y codornices (*Coturnix coturnix*), los IgY maternos decaen pocos días después de la eclosión (Garnier *et al.*, 2012). Sin embargo, en aves marinas se reportan disminuciones de estos anticuerpos a aproximadamente la mitad del periodo de crecimiento (Gasparini *et al.*, 2001; Hasselquist and Nilsson, 2009). En la gaviota tridáctila (*Rissa tridactyla*), que empluma a los 35 días, los IgY maternos disminuyen al día 15 de edad (Moreno, 2003; Staszewski *et al.*, 2007; Garnier *et al.*, 2012) y en la pardela atlántica (*Calonectris borealis*), con tiempo de emplumado de 90 días, los anticuerpos maternos descienden entre los 30 y 40 días de edad (Garnier *et al.*, 2012). Esta variación en la respuesta inmune podría ser moldeada por conductas que incrementan la exposición a patógenos y ectoparásitos como una dieta omnívora, el gregarismo o incluso la esperanza de vida (Promislow and Harvey, 1990; Sheldon and Verhulst, 1996; Lee *et al.*, 2008).

Por otro lado, la respuesta inmune de las crías puede variar en función del cuidado que reciben de los progenitores durante la incubación del huevo o el periodo de crianza (Ardia, Pérez and Clotfelter, 2010; Davison, Kaspers and Schat, 2014). Cuando se manipuló experimentalmente la temperatura del nido del pato Arcoíris (*Aix sponsa*), las crías incubadas a menor temperatura tenían una menor respuesta inflamatoria y un menor título de anticuerpos durante un reto inmune (Durant *et al.*, 2012). Similarmente, en otras aves se ha observado que la disponibilidad de alimento en los alrededores del nido, así como la cantidad y calidad de la alimentación que los padre brindan, modifican la respuesta inmune de las crías (Alonso-Alvarez and Tella, 2011; Hasselquist and Nilsson, 2012)

En el presente estudio se busca detectar si existen efectos de las diferentes combinaciones de edades parentales del bobo de patas azules sobre la respuesta inmune adaptativa en las crías. Esta especie es socialmente monógama, con cuidado biparental extenso, y las crías están expuestas a ectoparásitos vectores de enfermedades, como las garrapatas, por largos periodos de tiempo (Nelson, 1978; Ramos and Drummond, 2018). Los posibles efectos de la edad de los padres sobre la respuesta inmune adaptativa en las crías de bobo podrían deberse a mecanismos generales en los animales, pasando inadvertidos por la falta de estudios a través de la combinación de edades parentales (Drummond and Rodríguez, 2015).

Este estudio es parte de un experimento en el que se intercambiaron puestas entre parejas con diferentes combinaciones de edades para discernir si la alta calidad de las crías con un padre viejo y otro joven se debe al contenido del huevo (incluyendo principalmente anticuerpos, nutrientes y genes), o al cuidado parental (incluyendo principalmente incubación y alimentación). En otros componentes (en proceso) se evaluaron los efectos de las combinaciones de edades, a través de los huevos o el cuidado parental, sobre la eclosión de las crías y su tamaño, su crecimiento y sus telómeros.

Hipótesis

Se proponen dos hipótesis no mutuamente excluyentes:

Las crías con un padre viejo y un padre joven son más viables porque (H1) sus madres les aportan más anticuerpos en el huevo o (H2) los padres aportan más o mejor cuidado parental.

Predicciones

Al intercambiar puestas entre nidos con dos padres jóvenes y nidos con un padre joven y un padre viejo, además entre dos nidos con padres jóvenes, H1 predice que la respuesta inmune de las crías aumentará con la diferencia de edad entre los padres biológicos y H2 predice que la respuesta inmune de las crías aumentará con la diferencia de edad entre los padres adoptivos.

Métodos

Intercambio de puestas

El experimento se llevó a cabo en la colonia anillada de bobos de patas azules en Isla Isabel, México, en la que se ha realizado un monitoreo a largo plazo de aves anilladas al emplumar desde 1989. Mediante una revisión periódica realizada cada tercer día, se identificaron los nidos donde los progenitores tuvieron las edades deseadas para el estudio experimental. Durante los meses de febrero a junio del 2017 se realizaron intercambios recíprocos de puestas de parejas compuestas por aves jóvenes (≤ 9 años) y aves viejas (≥ 13 años). Se marcaron los huevos con carboncillo para dibujo (Koh I Noor) o plumón no tóxico (Koh I Noor) de acuerdo con su nido natal y orden de puesta determinado mediante el método de flotación (Hays and LeCroy, 1971). Realizando intercambios recíprocos de puestas en 3 tipos de pares de parejas se generaron 4 tratamientos experimentales y un tratamiento control resumidos en la Tabla 1. Se realizaron 90 intercambios recíprocos, obteniendo 180 nidos control y experimentales, de los cuales se perdieron 129 nidos debido a la depredación de gaviotas pardas (*Larus heermanni*) sobre los huevos y de culebras falso

coralillo (*Lampropeltis polyzona*) sobre las crías. Los 51 nidos sobrevivientes brindaron una muestra de 62 crías que llegaron a un mínimo de 20 días de edad y sobrevivieron hasta cumplir los 50 días; repartidas entre los cuatro tratamientos de esta manera: T1, 8; T2, 8; T3, 8; T4, 10; Control, 28. Todas las puestas fueron inspeccionadas cada tres días durante la incubación y el empollamiento hasta que las crías alcanzaron 70 días de edad. Mediante un análisis de regresión de riesgos proporcionales de Cox se determinó que ningún tratamiento tuvo un efecto significativo sobre la mortalidad de las crías ($p = 0.28$; Apéndice 1).

Tabla 1. Intercambios recíprocos entre parejas con diferentes combinaciones de edades.

Pares de parejas		N	Tratamientos
MJ+HV	↔ MJ+HJ	55	T2 y T4
MV+HJ	↔ MJ+HJ	55	T1 y T3
MJ+HJ	↔ MJ+HJ	70	Control

N = número de intercambios realizados. **MJ**= Macho Joven. **MV**=Macho Viejo. **HJ**=Hembra Joven. **HV**=Hembra Vieja.

Muestreo de sangre

Se realizaron tres colectas de 0.5 - 1 mililitros de sangre a cada cría a los 20, 35 y 50 días de edad, siguiendo los protocolos modificados de Conway (2006) y Healing et al. (2006). Cada muestra la tomé mediante la venopunción en la vena braquial o tibial, dependiendo de la visibilidad de las venas. Coloque la sangre en tubos microtainer sin anticoagulante con el separador a temperatura ambiente durante 5 minutos. Con el fin de mitigar el estrés en los animales, el tiempo total de manejo de las aves fue menor a 10 minutos. Con el fin de colaborar con otros proyectos en la colonia parte de la muestra sanguínea se destinó al sexado de las aves. Centrifugué cada muestra a 1400 rpm durante 10 minutos para separar el suero. Una vez centrifugado colecté y almacené el suero en alícuotas, las cuales se pusieron en nitrógeno líquido. Para evitar la desnaturalización de los anticuerpos, el manejo de las muestras la realicé en menos de una hora.

La colecta de sangre a los 62 individuos de 20, 35 y 50 días fue de 186 muestras. Sin embargo, durante el manejo en laboratorio perdí 28 muestras, perteneciente a: el suero a las tres edades para 4 crías, el suero de alguna edad para 14 crías y el suero de 2 edades para 1 cría. La muestra final que pudo ser analizada fue de 158 viales de suero pertenecientes a 58 crías, incluyendo 5 de T1, 8 de T2, 8 de T3, 10 de T4 y 27 de Control.

Cuantificación de IgY

El nivel (título) de inmunoglobulinas de la clase IgY, lo realicé utilizando la técnica de inmunoabsorción acoplado a enzimas (*ELISA*, por sus siglas en inglés) la cual, modifiqué de Wirtz *et al.* (1989). Realicé 3 diluciones seriadas 1:1600, 1:3200 y 1:6400 para cada una de las muestras de suero del bobo. Como control positivo utilicé suero de gallina en una dilución 1:100. Como control negativo utilicé suero de ratón a una dilución de 1:100. El ensayo experimental lo hice por triplicado colocando 100 µl de cada dilución (muestras y controles) en una placa (NUNC MaxiSorp®) para *ELISA* de 96 pozos. Dejé incubar por una hora a temperatura ambiente y en agitación. Transcurrido el tiempo, deseché el sobrenadante y agregué 100 µl de solución de bloqueo (*PBS 1X-0.05% Tween 20- 2% leche en polvo descremada*). Dejé en incubación por una hora con agitación y posteriormente, realicé seis lavados en agitación con duración de 5 minutos por lavado (200ul/pozo), utilizando solución de lavado (*PBS 1X- 0.05% Tween20*). Después de cada lavado, retiraba el sobrenadante. Al finalizar los lavados, añadí 100 µl del anticuerpo conjugado *goat anti-bird IgY-HRP (Bethyl Laboratories-110P)* en una dilución de 1:10,000 en solución de bloqueo. Incubé durante una hora a temperatura ambiente con agitación. Realicé otro ciclo de lavado y se adicionaron 100 µl de sustrato *OPD* (solución amortiguadora de Citrato-Fosfato 0.05M, pH 5 con *OPD* a 0.4mg/ml y 40 µl de H₂O₂). Por último, incubé la placa en obscuridad por 30 minutos y leí a 450 nm.

Para transformar los valores cualitativos de la prueba de *ELISA* a valores cuantitativos (mg/ml) utilicé la metodología propuesta por Gutiérrez-Sotelo *et al.* (En prep; basado en una curva estándar). Para la transformación se requirió de determinar las proteínas totales de cada muestra utilizando el kit de detección de proteínas totales (*PIERCE BCA PROTEIN ASSAY KIT-23255*).

Análisis estadísticos

Todos los análisis se realizaron en el ambiente para computación y gráficos estadísticos R (R Development Core Team, 2018). Todas las variables fueron estandarizadas previo al ajuste de modelos para minimizar la colinealidad de términos lineales, así como cuadráticos y para facilitar la interpretación de la estimación de los parámetros (Grueber *et al.*, 2011; Cade, 2015). Todos los modelos se ajustaron con una distribución de errores Gaussiana y con una función de enlace de identidad. Debido a que la colinealidad alta o incluso moderada puede inflar los errores estándar de las estimaciones de coeficientes y dificultar la detección de efectos genuinos (Zuur, Ieno and Elphick, 2010), calculé los factores de inflación de varianza (VIF, por sus siglas en inglés) para cada variable contenida en todos los modelos, de tal forma que variables con VIF mayores a 2

fueron excluidas de los análisis finales. Tanto la interacción entre las edades de los padres biológicos como la interacción entre las edades de los padres cuidadores tuvieron valores mayores a 2, por lo que utilicé la diferencia de edades (hembra menos macho) para poner a prueba mis hipótesis.

Para detectar si existe efecto de la diferencia de edades de los padres biológicos o los padres adoptivos sobre el título de anticuerpos, procedí a construir un modelo basal (c.f. Zuur *et al.*, 2009). Este modelo incluyó las variables que se conoce que influyen en el desarrollo de las crías de bobos: la fecha de puesta y el tamaño de nidada (D'Alba and Torres, 2007). Usando el modelo basal como referencia construí 15 modelos para poner a prueba mis hipótesis, utilizando la identidad de la cría como efecto aleatorio. Los efectos fijos fueron la expresión lineal y cuadrática tanto de la diferencia de edades de los padres biológicos como de la diferencia de edades de los padres adoptivos, edad promedio y edad centrada de las crías (centrado intraindividual; van de Pol and Wright, 2009), y el sexo de la cría. El método de centrado intraindividual fue implementado ya que permite detectar tanto diferencias en el título de anticuerpos entre crías (edad promedio; \bar{x}_j) como variaciones del título dentro (edad centrada; $x_{ij} - \bar{x}_j$) de los individuos a través de las tres edades de muestreo (20, 35 y 50 días). Dado que la diferencia de edad entre padres del bobo de patas azules sobre la viabilidad de las crías no depende de si el padre más viejo es la hembra o el macho (Drummond and Rodríguez, 2015), fue necesario incluir la expresión cuadrática de la diferencia de edad de padres para detectar efectos de diferencias positivas (hembra más vieja que macho) y negativas (macho más viejo que hembra) (c.f. Boyko 2008; Tsou, Liu and Hammitt, 2011). Además, incluí la expresión cuadrática de la edad centrada para tomar en cuenta que los títulos de anticuerpos de las crías suelen aumentar y descender cíclicamente con la edad (Davison, Kaspers and Schat, 2014); el orden de eclosión para controlar por las diferencias que existen en el desarrollo entre primeros y segundos huevos/crías (Drummond *et al.*, 1991; Carmona-Isunza, Núñez-de la Mora and Drummond, 2013); y el sexo de la cría para detectar diferencias entre macho y hembra (Moreno *et al.*, 2001).

También puse a prueba 5 interacciones de dos vías: 1) la expresión cuadrática de la diferencia de edad de los padres biológicos x la edad centrada de cada cría, 2) la expresión cuadrática de la diferencia de edad de los padres biológicos x la expresión cuadrática de la edad centrada de cada cría, 3) la expresión cuadrática de la diferencia de edad de padres adoptivos x la edad centrada de cada cría, 4) la expresión cuadrática de diferencia de edad de los padres adoptivos x la expresión cuadrática de la edad centrada de cada cría, 5) el sexo de la cría x la edad centrada de cada cría. Las interacciones 1 y 3 fueron incluidas para probar si la variación intraindividual de anticuerpos a

través de las edades de la cría aumenta con la diferencia de edad de los padres adoptivos o los progenitores. Las interacciones 2 y 4 fueron incluidas para probar si el aumento y descenso cíclico de anticuerpos se acrecentó con la diferencia de edad de los progenitores o de los padres adoptivos. Mientras que la interacción 5 se incluyó para ver si existían diferencias en el título de anticuerpos de las crías dependiendo del sexo.

Selección de modelos

Para ambos análisis clasifiqué los modelos de acuerdo con el criterio de información corregido para muestras pequeñas de Akaike's (AIC_c). Después calculé los pesos de Akaike para estimar el soporte relativo para cada modelo. Basado en el peso de Akaike seleccioné el modelo con mejor apoyo y mayor peso de AIC_c .

Resultados

Ni la diferencia de edades de los padres biológicos o la de los padres adoptivos tuvo un efecto sobre el título de anticuerpos (Tabla 3). El título de IgY disminuyó entre individuos ($\beta = -0.17$: Intervalo de confianza del 95%: -0.32 a -0.01; Fig. 2) y dentro de los individuos a través de las edades de muestreo ($\beta = -0.31$; IC 95%: -0.47 a -0.16; Fig. 2; Tabla. 4).

Tabla 3. Selección de modelos.

<i>Modelo</i>	<i>Estructura</i>	<i>K</i>	<i>logLik</i>	<i>AICc</i>	<i>$\Delta AICc$</i>	<i>wi</i>
1	BASAL+ WA + BA	7	-102.61	220.03	0	0.69
2	BASAL + SEXO:WA	7	-104.1	223.01	2.98	0.15
3	BASAL + WA2 + WA + BA	8	-103.32	223.68	3.65	0.11
4	BASAL+ ΔEB^2 + ΔEB + WA + $\Delta EB^2:WA^2$	9	-103.92	227.16	7.13	0.02
5	BASAL + ΔEA^2 + ΔEA + WA + BA + $\Delta EA^2:WA$	10	-103.59	228.79	8.76	0.01
6	BASAL+ ΔEA^2 + ΔEA + WA + $\Delta EA^2:WA^2$	9	-104.83	228.97	8.95	0.01
7	BASAL+ ΔEB^2 + ΔEB + WA + BA + $\Delta EB^2:WA$	10	-104.1	229.81	9.79	0.01
8	BASAL	5	-109.93	230.29	10.26	0
9	BASAL+ ESTATUS	6	-110.69	233.98	13.95	0
10	BASAL+ SEXO	6	-111.33	235.27	15.24	0
11	BASAL+ ΔEB^2 + ΔEB + ΔEA^2 + ΔEA + WA + BA	11	-106.53	237.01	16.98	0
12	BASAL+ ΔEB^2 + ΔEB	7	-111.48	237.77	17.74	0
13	BASAL+ ΔEA^2 + ΔEA	7	-111.76	238.33	18.31	0
14	BASAL+ ΔEB^2 + ΔEB + ΔEA^2 + ΔEA + WA^2 + WA + BA	12	-107.23	240.78	20.75	0
15	BASAL + ΔEB^2 + ΔEB + ΔEA^2 + ΔEA	9	-113.39	246.09	26.07	0

K es el número de parámetros de los modelos. **loglik** es el logaritmo natural de la verosimilitud. **AICc** criterio de información de Akaike ajustado a muestras pequeñas. **$\Delta AICc$** diferencias entre la puntuación de **AICc** entre el modelo actual y el modelo con mayor soporte. **wi** peso de Akaike acumulativo. **BASAL** es el modelo base compuesto por la fecha de puesta y la puesta, **ΔEA** la diferencia de edad de los padres adoptivos, **ΔEA^2** la diferencia de edad de los padres adoptivos cuadrática, **ΔEB** la diferencia de edad de los padres biológicos,

ΔEB^2 la diferencia de edad de los padres biológicos cuadrática, **ESTATUS** el orden de eclosión, **WA** es la edad centrada de las crías y **BA** la edad promedio de las crías. El modelo con mayor apoyo y un peso acumulativo de Akaike más cercano a-.95 está remarcados en color negro.

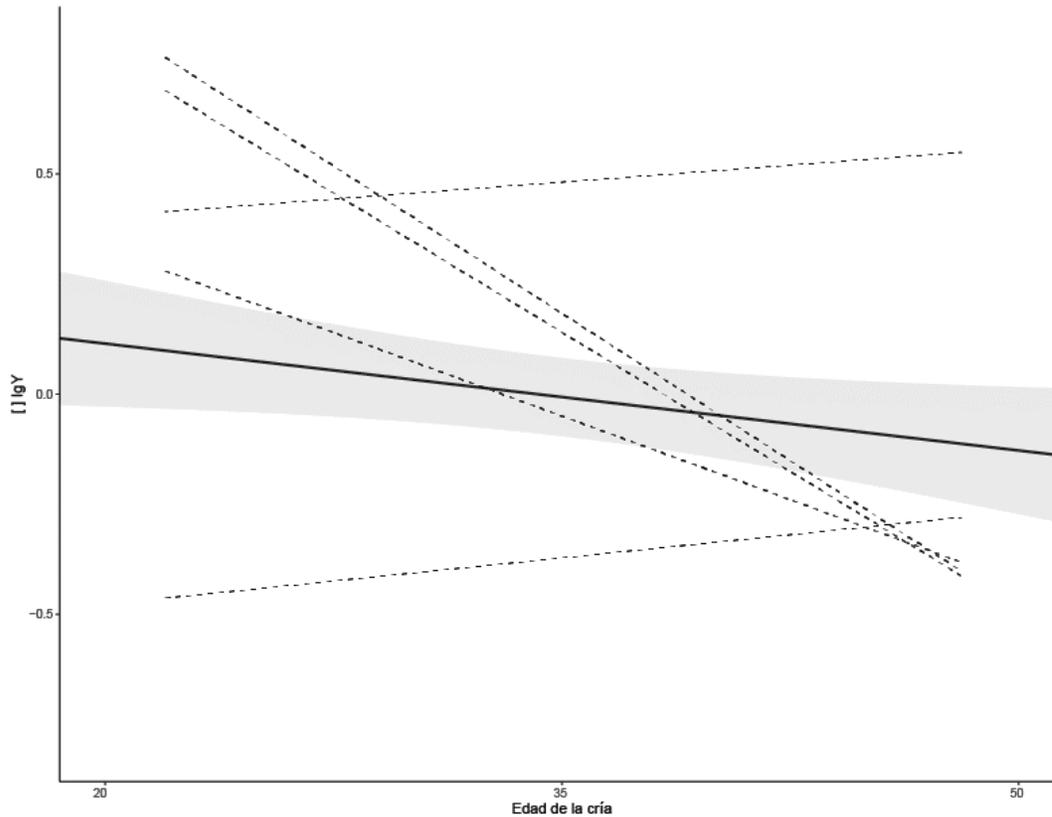


Fig. 2. Título de anticuerpos en función de edad de las crías. La línea continua representa el efecto entre los individuos, ilustrado en las líneas punteadas de 5 crías que se eligieron aleatoriamente.

Tabla 4. Resumen del modelo con mayor apoyo.

Factores	Estimado	Intervalo de confianza	
		2.5%	97.5%
<i>Intercepto</i>	0.00	-0.08	0.09
<i>Fecha de puesta</i>	-0.02	-0.19	0.14
<i>Puesta</i>	-0.06	-0.64	0.52
WA	-0.31	-0.47	-0.16
BA	-0.17	-0.32	-0.01

WA es la variación la edad centrada de la cría y **BA** la edad promedio de las crías.

Para explorar la varianza en el título de anticuerpos en las edades centradas de las crías, tomando en cuenta que los IgY hasta 50 d de edad podrían ser aun las transmitidas por la madre a través de la yema (Hasselquist and Nilsson, 2009; Garnier *et al.*, 2012), puse a competir el modelo más apoyado

de los análisis previos y un segundo modelo que incluía además la interacción entre la edad centrada de las crías y la edad de la madre biológica (Apéndice 3).

Resultó que la edad de la madre biológica interactuó con la edad de las crías entre 20 y 50 días (edad centrada) ($\beta = -0.44$; IC 95%: -0.71 a -0.17). En las crías de madres jóvenes, la concentración de IgY disminuyó ligeramente con la edad de la cría; mientras en las crías de madres viejas, cuyas concentraciones eran inicialmente más altas, la disminución fue mucho mayor y alcanzó un nivel mucho más bajo a los 50 días de edad (Fig. 3).

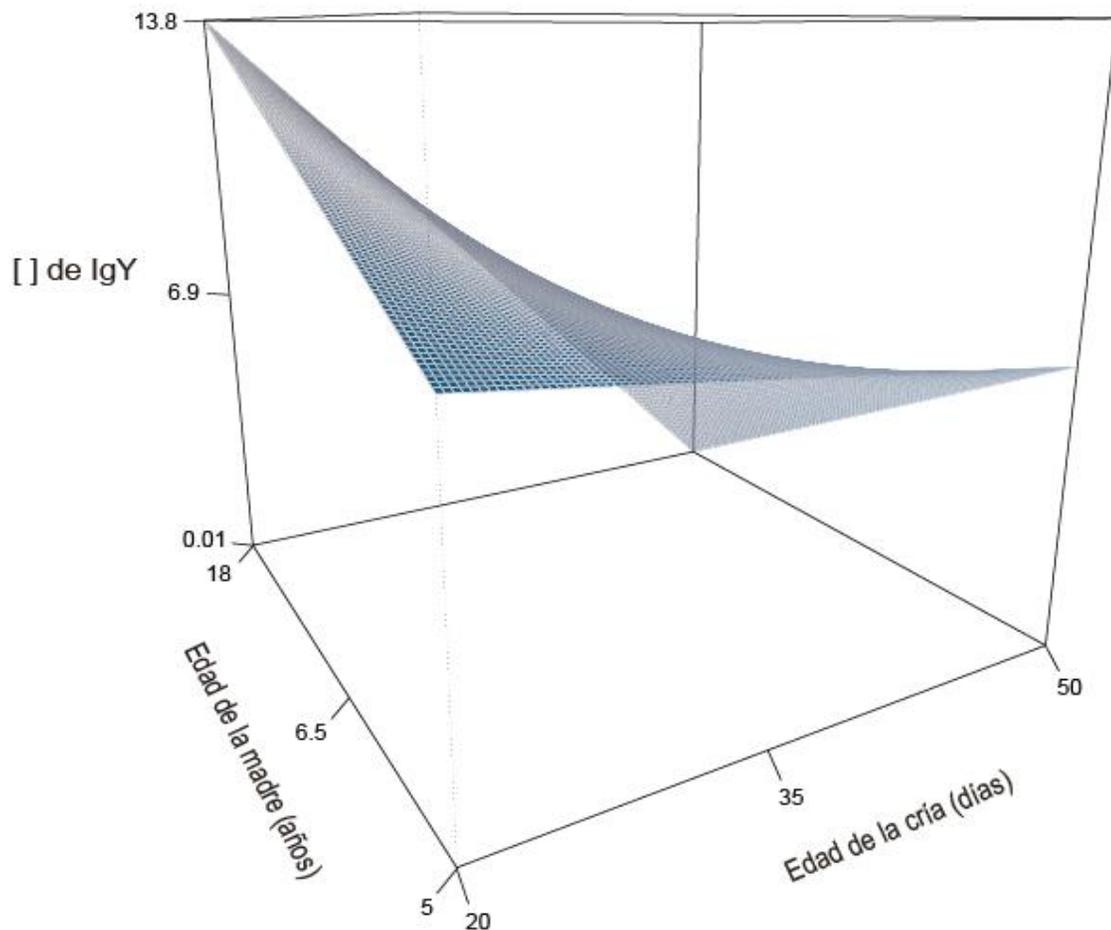


Fig. 3. Efecto de la interacción de la edad centrada de la cría y la edad de la madre biológica sobre el título de IgY de las crías.

Discusión

No se encontró una relación entre la diferencia de edad de los padres biológicos o adoptivos con el título de anticuerpos de la cría a los 20, 35 o 50 días de edad. Debido a la depredación por culebras y gaviotas, y la pérdida de muestras de sangre solo se analizaron 46 crías a 20 días, 52 crías a 35 días y 49 crías a 50 días; estos tamaños de muestra probablemente son inadecuados para revelar efectos de las combinaciones de edades de los padres. Es posible que la diferencia de edad de los padres biológicos o adoptivos afecta la concentración de IgY de la cría (recibido de la madre) en los primeros días de su vida (antes del día 20 de vida,), o afecta la generación propia de anticuerpos en la cría después del día 50, pero el IgY no se midió a esas edades. Igualmente, no se puede descartar que la diferencia de edad de los padres biológicos genere un efecto positivo mediante otros elementos contenidos en el huevo como genes, hormonas, nutrientes, antioxidantes u otras moléculas del propio sistema inmune (Eising *et al.*, 2001; Gil, 2003; Davison, Kaspers and Schat, 2014; Schat, Kaspers and Kaiser, 2014). No obstante, los resultados parecen indicar que los efectos de las combinaciones de edad de padres biológicos o adoptivos sobre la viabilidad de crías emplumados no se deben a hipotéticos efectos por IgY entre 20 y 50 días de edad de las crías.

El descenso general del título de anticuerpos en bobos del día 20 al 50 de edad parece coincidir con la tendencia reportada por Garnier *et al.*, (2012) y Liu & Higgins (1990) en la pardela atlántica (*Calonectris borealis*) y en el pato de collar (*Anas platyrhynchos*), en donde se observó que los anticuerpos maternos descienden progresivamente durante la primera mitad del periodo de emplumado. La disminución en los bobos podría estar dictada no solo por la vida media de los anticuerpos, sino también por la exposición a ectoparásitos durante la estancia en el nido (Morbey, 1996; Davison, Kaspers and Schat, 2014). El descenso de los IgY derivados de la madre podría acelerarse con la infestación de garrapatas, la cual alcanza su pico al día 29 de vida (Ramos and Drummond, 2017). La tendencia en el descenso de IgY difirió entre crías, posiblemente por diferencias en la infestación de ectoparásitos (Moreno *et al.*, 2008; Arriero, Majewska and Martin, 2013). En algunas crías aumentó el título de IgY, probablemente como consecuencia de la generación propia de anticuerpos (Pihlaja, Siitari and Alatalo, 2006).

La interacción significativa de la edad de la madre biológica y la edad de la cría sugiere que en los bobos existen efectos maternos sobre la respuesta inmunitaria de la descendencia. En las aves, la cantidad de anticuerpos transferidos a un huevo está altamente correlacionada con la cantidad de anticuerpos circulantes en la madre al momento de la formación del huevo (Grindstaff, Demas and Ketterson, 2005; Morales, Sanz and Moreno, 2006), y es de esperarse que la condición fisiológica y

las presiones ambientales a las que las hembras son sometidas modifiquen la cantidad de anticuerpos transferidos a las crías (Parmentier *et al.*, 2001; Saino, Ambrosini, *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2004; Grindstaff, Demas and Ketterson, 2005; Abdel-Moneim and Abdel-Gawad, 2006; Cade, 2015). Estudios han señalado que, frente a una infestación de ectoparásitos, y el estado fisiológico mermado de una hembra vieja, puede resultar en un aumento en el título de anticuerpos circulantes en sangre (Moreno *et al.*, 2008). Otro factor a considerar es la subalimentación de las crías, en pollos de gallinas se ha visto que los individuos que son privados de alimento ven afectada la respuesta inmune mediada por anticuerpos (Hangalapura *et al.*, 2005). Sin embargo, también se ha sugerido que la edad avanzada en hembras tenga repercusiones somáticas en las crías, generando efectos de envejecimiento prematuro en algunas funciones de la respuesta inmune (Boonekamp *et al.*, 2014; Tissier, Williams and Criscuolo, 2014; Van Den Heuvel, English and Uller, 2016). Se puede especular que las crías con una madre vieja presenten más IgY a los 20 días que las crías de madres jóvenes en “consecuencia de un posible debilitamiento fisiológico de las hembras viejas”; y que el descenso “grande” en IgY entre 20 y 50 días de las crías se deba a un agotamiento de anticuerpos en la posible ausencia de respuesta inmunitaria más adecuada o un deterioro del estado fisiológico por subalimentación.

Bibliografía

Abdel-Moneim, A. S. and Abdel-Gawad, M. M. A. (2006) 'Genetic variations in maternal transfer and immune responsiveness to infectious bursal disease virus', *Veterinary Microbiology*, 114(1–2), pp. 16–24. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.10.037.

Aitken, R. *et al.* (2014) 'Oxidative stress and male reproductive health', *Asian Journal of Andrology*, 16(1), p. 31. doi: 10.4103/1008-682x.122203.

Alonso-Alvarez, C. and Tella, J. L. (2011) 'Effects of experimental food restriction and body-mass changes on the avian T-cell-mediated immune response', *Canadian Journal of Zoology*, 79(1), pp. 101–105. doi: 10.1139/z00-190.

Ardia, D. R., Pérez, J. H. and Clotfelter, E. D. (2010) 'Experimental cooling during incubation leads to reduced innate immunity and body condition in nestling tree swallows', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1689), pp. 1881–1888. doi: 10.1098/rspb.2009.2138.

Arriero, E., Majewska, A. and Martin, T. E. (2013) 'Ontogeny of constitutive immunity: Maternal vs. endogenous influences', *Functional Ecology*, 27(2), pp. 472–478. doi: 10.1111/1365-2435.12057.

Beamonte-Barrientos, R. *et al.* (2010) 'Senescence of Maternal Effects: Aging Influences Egg Quality and Rearing Capacities of a Long-Lived Bird', *The American Naturalist*, 175(4), pp. 469–480. doi: 10.1086/650726.

Boonekamp, J. J. *et al.* (2014) 'Nestling telomere shortening, but not telomere length, reflects developmental stress and predicts survival in wild birds', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1785). doi: 10.1098/rspb.2013.3287.

Boulinier, T. and Staszewski, V. (2014) 'Maternal transfer of antibodies : Raising Maternal transfer of antibodies : raising immuno-ecology issues', (January). doi: 10.1016/j.tree.2007.12.006.

Cade, B. S. (2015) 'Model averaging and muddled multimodel inferences', *Ecology*, 96(9), pp. 2370–2382. doi: 10.1890/14-1639.1.

Carmona-Isunza, M. C., Núñez-de la Mora, A. and Drummond, H. (2013) 'Chronic stress in infancy fails to affect body size and immune response of adult female blue-footed boobies or their offspring', *Journal of Avian Biology*, 44(4), pp. 390–398. doi: 10.1111/j.1600-048X.2013.00057.x.

Choe, J. C. (2019) 'Encyclopedia of Animal Behavior', 3. doi: 10.1016/B978-0-12-809633-

8.20769-3.

Counihan, K. L. *et al.* (2015) 'The influence of year, laying date, egg fertility and incubation, individual hen, hen age and mass and clutch size on maternal immunoglobulin Y concentration in captive Steller's and spectacled eider egg yolk', *Developmental and Comparative Immunology*. Elsevier Ltd, 52(1), pp. 10–16. doi: 10.1016/j.dci.2015.04.005.

Courtney J. Conway (2006) 'Blood collection protocol for burrowing owls'. Tucson, AZ 85721: USGS Arizona Coop. Fish & Wildlife Research Unit, University of Arizona.

D'Alba, L. and Torres, R. (2007) 'Seasonal Egg-Mass Variation and Laying Sequence in a Bird With Facultative Brood Reduction', *The Auk*, 124(2), p. 643. doi: 10.1642/0004-8038(2007)124[643:sevals]2.0.co;2.

Davison, F., Kaspers, B. and Schat, K. (2014) *Development of avian immunology*, *Avian Immunology*. doi: 10.1016/B978-0-12-396965-1.00003-0.

Dentressangle, F., Boeck, L. and 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 and Sociobiology*, 62(12), pp. 1899–1908. doi: 10.1007/s00265-008-0620-6.

Dietrich, M., Gómez-Díaz, E. and McCoy, K. D. (2011) 'Worldwide Distribution and Diversity of Seabird Ticks: Implications for the Ecology and Epidemiology of Tick-Borne Pathogens', *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(5), pp. 453–470. doi: 10.1089/vbz.2010.0009.

Drummond, H. *et al.* (1991) 'Sexual Size Dimorphism and Sibling Competition: Implications for Avian Sex Ratios', *The American Naturalist*, 138(3), pp. 623–641. doi: 10.1086/285238.

Drummond, H. and Rodríguez, C. (2015) 'Viability of booby offspring is maximized by having one young parent and one old parent', *PLoS ONE*, 10(7), pp. 1–14. doi: 10.1371/journal.pone.0133213.

Durant, S. E. *et al.* (2012) 'Incubation temperature affects multiple measures of immunocompetence in wood duck (*Aix sponsa*) ducklings', *Integrative and Comparative Biology*, 50(July 2011), pp. E47–E47.

Dusbábek, F., Uhlir, J. and Borský, I. (1994) 'Age-Dependent Immune-Response of Chickens To Feeding By Argas-Persicus Larvae', *Veterinary Parasitology*, 51(3–4), pp. 307–319. doi: 10.1016/0304-4017(94)90169-4.

Eising, C. M. *et al.* (2001) 'Maternal androgens in black-headed gull (*Larus ridibundus*) eggs:

- Consequences for chick development', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 268(1469), pp. 839–846. doi: 10.1098/rspb.2001.1594.
- García-Palomares, S. *et al.* (2009) 'Long-Term Effects of Delayed Fatherhood in Mice on Postnatal Development and Behavioral Traits of Offspring', *Biology of Reproduction*, 80(2), pp. 337–342. doi: 10.1095/biolreprod.108.072066.
- Garnier, R. *et al.* (2012a) 'Maternal antibody persistence: A neglected life-history trait with implications from albatross conservation to comparative immunology', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1735), pp. 2033–2041. doi: 10.1098/rspb.2011.2277.
- Garnier, R. *et al.* (2012b) 'Maternal antibody persistence: A neglected life-history trait with implications from albatross conservation to comparative immunology', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1735), pp. 2033–2041. doi: 10.1098/rspb.2011.2277.
- Gasparini, J. *et al.* (2001) 'Induced maternal response to the Lyme disease spirochaete *Borrelia burgdorferi* sensu lato in a colonial seabird, the kittiwake *Rissa tridactyla*', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 268(1467), pp. 647–650. doi: 10.1098/rspb.2000.1411.
- Gil, D. (2003) 'Golden eggs: Maternal manipulation of offspring phenotype by egg androgen in birds', *Ardeola*, 50(2), pp. 281–294. Available at: http://www.ardeola.org/files/ardeola_545.pdf.
- Grindstaff, J. L., Demas, G. E. and Ketterson, E. D. (2005) 'Diet quality affects egg size and number but does not reduce maternal antibody transmission in Japanese quail *Coturnix japonica*', *Journal of Animal Ecology*, 74(6), pp. 1051–1058. doi: 10.1111/j.1365-2656.2005.01002.x.
- Grueber, C. E. *et al.* (2011) 'Multimodel inference in ecology and evolution: challenges and solutions', *Journal of Evolutionary Biology*, 24, pp. 699–711. doi: 10.1111/j.1420-9101.2010.02210.x.
- Hasselquist, D. and Nilsson, J. Å. (2009) 'Maternal transfer of antibodies in vertebrates: Trans-generational effects on offspring immunity', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1513), pp. 51–60. doi: 10.1098/rstb.2008.0137.
- Hasselquist, D. and Nilsson, J. Å. (2012) 'Physiological mechanisms mediating costs of immune responses: What can we learn from studies of birds?', *Animal Behaviour*. Elsevier Ltd, 83(6), pp. 1303–1312. doi: 10.1016/j.anbehav.2012.03.025.
- Hays, H. and LeCroy, M. (1971) 'Field Criteria for Determining Incubation Stage in Eggs of the Common Tern Author', *The Wilson Bulletin*, 83(4), pp. 425–429.

- Healing, T. *et al.* (2006) *Collecting, preserving and shipping specimens for the diagnosis of avian influenza A(H5N1) virus infection*. World Health Organization.
- Van Den Heuvel, J., English, S. and Uller, T. (2016) 'Disposable soma theory and the evolution of maternal effects on ageing', *PLoS ONE*, 11(1), pp. 1–17. doi: 10.1371/journal.pone.0145544.
- Horka, H. *et al.* (2012) 'The Tick Salivary Protein Sialostatin L Inhibits the Th9-Derived Production of the Asthma-Promoting Cytokine IL-9 and Is Effective in the Prevention of Experimental Asthma', *The Journal of Immunology*, 188(6), pp. 2669–2676. doi: 10.4049/jimmunol.1100529.
- Johnson, S. L. and Gemmell, N. J. (2012) 'Are old males still good males and can females tell the difference?: Do hidden advantages of mating with old males off-set costs related to fertility, or are we missing something else', *BioEssays*, 34(7), pp. 609–619. doi: 10.1002/bies.201100157.
- Jones, T. M., Balmford, A. and Quinnell, R. J. (2000) 'Adaptive female choice for middle-aged mates in a lekking sandfly', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 267(1444), pp. 681–686. doi: 10.1098/rspb.2000.1056.
- Lee, K. A. *et al.* (2008) 'Constitutive immune defences correlate with life-history variables in tropical birds', *Journal of Animal Ecology*, 77(2), pp. 356–363. doi: 10.1111/j.1365-2656.2007.01347.x.
- Lemaître, J. F. *et al.* (2015) 'Early-late life trade-offs and the evolution of ageing in the wild', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1806). doi: 10.1098/rspb.2015.0209.
- Lemke, H., Coutinho, A. and Lange, H. (2004) 'Lamarckian inheritance by somatically acquired maternal IgG phenotypes', *Trends in Immunology*, 25(4), pp. 180–186. doi: 10.1016/j.it.2004.02.007.
- Limmer, B. and Becker, P. H. (2009) 'Improvement in chick provisioning with parental experience in a seabird', *Animal Behaviour*. Elsevier Ltd, 77(5), pp. 1095–1101. doi: 10.1016/j.anbehav.2009.01.015.
- Liu, S. S. and Higgins, D. A. (1990) 'Yolk-sac transmission and post-hatching ontogeny of serum immunoglobulins in the duck (*Anas platyrhynchos*)', *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and*, 97(4), pp. 637–644. doi: 10.1016/0305-0491(90)90100-8.
- Lobato, E. *et al.* (2012) 'Maternal antibody persistence : a neglected life-history trait with implications from albatross conservation to comparative immunology', (December 2011), pp.

2033–2041. doi: 10.1098/rspb.2011.2277.

Manning, J. T. (1985) ‘Choosy females and correlates of male age’, *Journal of Theoretical Biology*, 116(3), pp. 349–354. doi: 10.1016/S0022-5193(85)80273-3.

Morales, J., Sanz, J. J. and Moreno, J. (2006) ‘Egg colour reflects the amount of yolk maternal antibodies and fledging success in a songbird’, *Biology Letters*, 2(3), pp. 334–336. doi: 10.1098/rsbl.2006.0471.

Morbey, Y. E. (1996) ‘The abundance and effects of ticks (*Ixodes uriae*) on nestling Cassin’s’, *Canadian Journal of Zoology*, 74, pp. 1585–1589. doi: 10.1139/z96-172.

Moreno, J. *et al.* (2001) ‘Sex differences in cell-mediated immunity in the Magellanic penguin *Spheniscus magellanicus*’, *Annales Zoologici Fennici*, 38(2), pp. 111–116.

Moreno, J. (2003) ‘Lifetime reproductive success in seabirds: interindividual differences and implications for conservation’, *Scientia Marina*, 67(S2), pp. 7–12. doi: 10.3989/scimar.2003.67s27.

Moreno, J. *et al.* (2008) ‘Pre-laying nutrition mediates maternal effects on offspring immune capacity and growth in the pied flycatcher’, *Oecologia*, 156(4), pp. 727–735. doi: 10.1007/s00442-008-1029-7.

Müller, W. *et al.* (2004) ‘Maternal antibody transmission and breeding densities in the Black-headed Gull *Larus ridibundus*’, *Functional Ecology*, 18(5), pp. 719–724. doi: 10.1111/j.0269-8463.2004.00902.x.

Murai, A. *et al.* (2016) ‘An ELISA for quantifying quail IgY and characterizing maternal IgY transfer to egg yolk in several quail strains’, *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Elsevier B.V., 175, pp. 16–23. doi: 10.1016/j.vetimm.2016.04.013.

Nelson, B. (1978) *The Sulidae: Gannets and Boobies*. Oxford: Oxford University Press, UK.

Nemeth, N. M., Oesterle, P. T. and Bowen, R. A. (2008) ‘Passive immunity to West Nile virus provides limited protection in a common passerine species’, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 79(2), pp. 283–290. doi: 10.1093/ajtmh/79.2.283 [pii].

Nussey, D. H. *et al.* (2007) ‘Environmental conditions in early life influence ageing rates in a wild population of red deer’, *Current Biology*, 17(23), pp. 1000–1001. doi: 10.1016/j.cub.2007.10.005.

Paitz, R. T. *et al.* (2007) ‘Experience pays: Offspring survival increases with female age’, *Biology Letters*, 3(1), pp. 44–46. doi: 10.1098/rsbl.2006.0573.

- Parmentier, H. K. *et al.* (2001) 'Immune responses and resistance to *Eimeria acervulina* of chickens divergently selected for antibody responses to sheep red blood cells', *Poultry Science*, 80(7), pp. 894–900. doi: 10.1093/ps/80.7.894.
- Pihlaja, M., Siitari, H. and Alatalo, R. V. (2006) 'Maternal antibodies in a wild altricial bird: Effects on offspring immunity, growth and survival', *Journal of Animal Ecology*, 75(5), pp. 1154–1164. doi: 10.1111/j.1365-2656.2006.01136.x.
- van de Pol, M. and Wright, J. (2009) 'A simple method for distinguishing within- versus between-subject effects using mixed models', *Animal Behaviour*, 77(3), pp. 753–758. doi: 10.1016/j.anbehav.2008.11.006.
- Price, D. K. and Hansen, T. F. (1998) 'How does offspring quality change with age in male *Drosophila melanogaster*?'', *Behavior Genetics*, 28(5), pp. 395–402. doi: 10.1023/A:1021677804038.
- Promislow, D. E. . L. and Harvey, P. H. (1990) 'Living Fast and Dying Young, A Comparative Analysis of Live History Variation among Mammals. *Journal of Zoology*, London, Lond., 220: 417-437.', *Journal of the Zoological Society of London*, 220, pp. 417–437.
- Ramos, A. G. and Drummond, H. (2017) 'Tick infestation of chicks in a seabird colony varies with local breeding synchrony, local nest density and habitat structure', *Journal of Avian Biology*, 48(4), pp. 472–478. doi: 10.1111/jav.01107.
- Ramos, A. G. and Drummond, H. (2018) 'Ectoparasite burden of Blue-footed Booby chicks depends on combined parental ages', *Ibis*, 160(4), pp. 914–918. doi: 10.1111/ibi.12624.
- Ratikainen, I. I. and Kokko, H. (2010) 'Differential allocation and compensation: Who deserves the silver spoon?', *Behavioral Ecology*, 21(1), pp. 195–200. doi: 10.1093/beheco/arp168.
- Reid, R., Roberts, F. and MacDuff, E. (2011) *Pathology Illustrated. Seventh, Journal of Chemical Information and Modeling. Seventh.* Edited by R. Reid, F. Roberts, and E. MacDuff. Churchill Livingstone. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- Sá-Nunes, A. *et al.* (2007) 'Prostaglandin E 2 Is a Major Inhibitor of Dendritic Cell Maturation and Function in *Ixodes scapularis* Saliva ', *The Journal of Immunology*, 179(3), pp. 1497–1505. doi: 10.4049/jimmunol.179.3.1497.
- Saino, N., Ferrari, R. P., *et al.* (2002) 'Early maternal effects mediated by immunity depend on sexual ornamentation of the male partner', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*,

269(1495), pp. 1005–1009. doi: 10.1098/rspb.2002.1992.

Saino, N., Ambrosini, R., *et al.* (2002) ‘Mate fidelity, senescence in breeding performance and reproductive trade-offs in the barn swallow’, *Journal of Animal Ecology*, 71(2), pp. 309–319. doi: 10.1046/j.1365-2656.2002.00600.x.

Schat, K. A., Kaspers, B. and Kaiser, P. (2014) *Avian Immunology*. Second. San Diego, CA 92101-4495, USA: Elsevier Ltd.

Sheldon, B. C. and Verhulst, S. (1996) ‘Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology’, *TREE*, 11(8). doi: 10.1126/science.328.5977.414-a.

Staszewski, V., McCoy, Karen D, *et al.* (2007) ‘Interannual dynamics of antibody levels in naturally infected long-lived colonial birds.’, *Ecology*, 88(12), pp. 3183–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18229852>.

Staszewski, V., McCoy, Karen D., *et al.* (2007) ‘Interannual dynamics of antibody levels in naturally infected long-lived colonial birds’, *Ecology*, 88(12), pp. 3183–3191. doi: 10.1890/07-0098.1.

Stearns, S. C. (1992) *The Evolution of Life Histories*. London: Oxford University Press. doi: 10.1046/j.1420-9101.1993.6020304.x.

Tissier, M. L., Williams, T. D. and Criscuolo, F. (2014) ‘Maternal effects underlie ageing costs of growth in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*)’, *PLoS ONE*, 9(5). doi: 10.1371/journal.pone.0097705.

Tsou, M. W., Liu, J. T. and Hammitt, J. K. (2011) ‘Parental age difference, educationally assortative mating and offspring count: Evidence from a contemporary population in Taiwan’, *Biology Letters*, 7(4), pp. 562–566. doi: 10.1098/rsbl.2010.1208.

Velando, A., Beamonte-Barrientos, R. and 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(3), pp. 535–542. doi: 10.1007/s00442-006-0457-5.

Wikel, S. K. and Bergman, D. (1997) ‘Tick-host immunology: Significant advances and challenging opportunities’, *Parasitology Today*, 13(10), pp. 383–389. doi: 10.1016/S0169-4758(97)01126-5.

Wirtz, R. A. *et al.* (1989) ‘ELISA method for detecting *Plasmodium falciparum* circumsporozoite

antibody', 67(5), pp. 535–542.

Zhang, H. *et al.* (2015) 'Age-dependent trait variation: The relative contribution of within-individual change, selective appearance and disappearance in a long-lived seabird', *Journal of Animal Ecology*, 84(3), pp. 797–807. doi: 10.1111/1365-2656.12321.

Zuur, A. F., Ieno, E. N. and Elphick, C. S. (2010) 'A protocol for data exploration to avoid common statistical problems', *Methods in Ecology and Evolution*, 1(1), pp. 3–14. doi: 10.1111/j.2041-210X.2009.00001.x.

Zuur, F. A. *et al.* (2009) *Mixed Effects Models and Extensions in Ecology with R, Profiles of drug substances, excipients, and related methodology*. New York, NY 10013, USA: Springer Science+Business Media. doi: 10.1016/B978-0-12-387667-6.00013-0.

Apéndice 1

Para analizar un posible efecto de los tratamientos sobre la supervivencia de las crías experimentales y control, se realizó un análisis de riesgos proporcionales de Cox. El análisis mostro que no existe efecto de los tratamientos sobre la mortalidad de las crías ($p = 0.28$).

Tabla 3. Modelo de riesgos proporcionales de Cox.

Tratamiento	HR	Intervalo de confianza		P
		2.50%	97.50%	
1	1.291	0.893	1.869	0.1747
2	1.277	0.930	1.753	0.1301
3	1.140	0.785	1.654	0.4911
4	1.368	0.995	1.882	0.0536

En donde: **HR** es el cociente de riesgos instantáneos.

Apéndice 2

Tabla 5. Estimados y valores de confianza de la comprobación del modelo

<i>Factores</i>	<i>Estimado</i>	<i>Intervalo de confianza</i>	
		2.5%	97.5%
<i>Intercepto</i>	0.00	-0.08	0.08
<i>Fecha de puesta</i>	-0.05	-0.22	0.12
<i>Puesta</i>	-0.01	-0.60	0.58
WAG	-0.87	-1.40	-0.35
CONF	-0.58	-1.11	-0.05

WA es la edad centrada de la edad de la cría y **CONF** la variación promedio.

Apéndice 3

Tabla 6. Selección de modelos.

<i>Modelo</i>	<i>Estructura</i>	<i>K</i>	<i>LogLik</i>	<i>AICc</i>	<i>ΔAICc</i>	<i>wi</i>
1	BASAL+ WA:EMB	8	-100.74	218.50	0.00	0.68
2	BASAL+ WA + BA	7	-102.61	220.00	1.51	0.32

WA es la edad centrada de la edad de la cría, **BA** la variación promedio y **EMB** es la edad de la madre biológica.

Tabla 7. Resumen del modelo con mayor apoyo.

<i>Factores</i>	<i>Estimado</i>	<i>Intervalo de confianza</i>	
		2.50%	97.50%
<i>Intercepto</i>	-0.00	-0.09	0.09
<i>Fecha de puesta</i>	-0.04	-0.22	0.14
<i>Puesta</i>	-0.02	-0.64	0.68
WA	-0.31	-0.44	-0.17
<i>EMB</i>	-0.03	-0.22	0.16
WA:EMB	-0.44	-0.71	-0.17

WA es la edad centrada de la edad de la cría y **EMB** es la edad de la madre biológica.

Apéndice 4

Tabla 8. Título de anticuerpos por cría.

Anillo	Nido	Estatus	Puesta	Sexo	IgY x Edad (mg/ml)		
					20 días	35 días	50 días
x995	17-006	1	2	M	0.70	0.39	0.03
Y063	17-018	1	2	F	9.91	0.35	2.72
x996	17-019	2	2	M	6.59	4.67	7.41
x997	17-028	1	2	F	7.44	4.19	0.76
x941	17-065	1	2	M	0.50	0.79	1.62
x942	17-067	1	2	M	7.83	2.04	0.39
x958	17-067	2	2	F	10.90	6.26	0.34
y231	17-115	1	2	M	10.54	0.92	0.50
y304	17-115	2	2	M	4.93	2.63	1.89
x925	17-116	1	2	M	1.12	0.16	1.20
y082	17-119	1	2	F	0.21	1.80	2.23
y005	17-130	1	2	M	5.95	8.44	5.43
y391	17-1307	1	2	M	6.22	0.89	0.40
y064	17-135	1	2	M	10.97	2.56	3.62
y029	17-758	1	2	F	8.40	1.05	2.59
y123	17-808	1	2	F	9.75	5.66	0.02
y246	17-846	1	2	F	2.40	0.30	0.19
y161	17-870	1	2	F	0.60	3.43	2.65
y178	17-870	2	2	F	6.24	4.50	0.15
y266	17-874	1	2	F	1.69	1.77	0.41
y249	17-888	1	2	M	2.94	0.30	1.36
y268	17-888	2	2	F	0.01	6.72	0.67
y335	17-893	2	2	M	7.16	0.55	0.78
y219	17-896	1	2	F	8.06	4.22	2.10
y247	17-901	2	2	F	0.25	0.11	0.09
y269	17-925	1	2	F	2.71	0.22	5.90
y308	17-925	2	2	F	3.38	6.21	4.77
y271	17-927	1	2	F	0.86	1.06	0.33
y251	17-928	1	2	F	0.72	4.88	2.22
y347	17-944	2	2	F	5.21	7.63	0.70
y267	17-966	2	2	M	5.04	2.03	2.04
y101	17-277	1	2	M	2.96	3.15	0.84
y116	17-299	1	2	F	0.94	7.46	0.17
y195	17-418	2	2	F	0.09	13.80	5.98
y223	17-448	2	2	F	2.86	1.09	2.25
y230	17-478	1	2	M	3.23	2.89	3.67
y265	17-483	2	3	M	5.28	2.36	1.22