



La relación de heterófilos/linfocitos con las estrategias vitales en
la golondrina común (*Hirundo rustica*).

Trabajo Fin de Máster.

Máster Universitario en Biología Avanzada: Investigación y Aplicación.

Línea de Biología Evolutiva.

Universidad de Sevilla, departamento de Zoología.

Sevilla, 3 de Julio de 2023

Tutores

Javier Balbontín Arenas

Alfonso Marzal Reynolds

Estudiante

Lorena Pinilla Rodríguez

Índice de contenidos

| | |
|---|----|
| 1. RESUMEN | 3 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 5 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 9 |
| 3.1. Área de estudio y procedimientos de toma de muestras en el campo | 9 |
| 3.2. Frotis sanguíneo y microscopía..... | 10 |
| 3.3. Detección molecular de infección por hemosporidios | 11 |
| 3.4. Análisis estadísticos | 11 |
| 4. RESULTADOS | 14 |
| 4.1. Perfil de leucocitos | 14 |
| 4.2. Parámetros morfológicos y fisiológicos asociados con el estrés..... | 20 |
| 4.3. Estrés y su relación con el estado de infección | 21 |
| 4.4. Relación de la eficacia biológica o <i>fitness</i> con el índice de estrés | 23 |
| 4.5. El estrés en los distintos periodos de reproducción..... | 23 |
| 5. DISCUSIÓN | 24 |
| 6. AGRADECIMIENTOS | 29 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA | 30 |

1. RESUMEN

La condición de estrés y la función inmune de los vertebrados pueden verse alteradas según la condición fisiológica de los individuos, la etapa del ciclo de vida en la que se encuentran o del parasitismo. Nosotros investigamos a la golondrina común, *Hirundo rustica*, durante su etapa de reproducción en España utilizando parámetros hematológicos para conocer su estado de estrés, medido mediante el índice heterófilos/linfocitos (i.e., H/L). Estudiamos el perfil de leucocitos en la sangre en relación con distintas variables como el sexo, la colonia de cría, la clase de edad, el año de captura, el estado de infección, el *fitness* o eficacia biológica (es decir, el número total de huevos, el número total de pollos, el número de puestas y la fecha de la primera puesta) y el periodo de la época de reproducción (prepuesta, incubando, con pollos en el nido y postpuesta). De manera que la ratio H/L alta indicó diferencias entre las dos clases de edad (presentando mayores índices los adultos) y entre el número de puestas (presentando mayores índices las parejas que pusieron tres puestas), pero no mostraron correlación con el parasitismo ni con el periodo de la época de reproducción. Este estudio muestra el valor del uso de parámetros hematológicos para conocer el estado y viabilidad de las poblaciones, y los resultados resaltan la necesidad de seguir trabajando en esta línea de investigación tanto para conocer la prevalencia de infección en especies migratorias como la golondrina, como para entender la ecología evolutiva de las especies mediante el uso del índice H/L.

PALABRAS CLAVE: condición de estrés, eficacia biológica, golondrina común, índice H/L, infección, perfil de leucocitos.

ABSTRACT: The stress condition and the immune function of vertebrates can be altered depending on the physiological condition, the stage of the life cycle or parasitism. Here, we studied the Barn Swallow, *Hirundo rustica*, during its reproduction period in Spain using hematological parameters to determine its state of stress, measured by heterophil/lymphocyte ratio (i.e., H/L). We observed how the leukocyte profile varied depending on sex, locality, age class, year, infection status, fitness (total eggs, total fledglings, clutches and laying date) and the period of breeding season (pre-laying, incubation, chicks in the nest and post-laying). Thus, the high ratio of H/L showed differences between age class (adults have higher H/L indices) and between the number of clutches (three clutches have higher H/L indices), but they did not show any correlation with parasitism or the stage of reproductive season. This study shows the value of using hematological parameters to determine the status and viability of populations, and the results highlight the need to investigate in this line of research, both to determine the prevalence of infection in migratory species such as the swallow and to understand the evolutionary ecology of species using the H/L ratio.

2. INTRODUCCIÓN

La influencia de la condición fisiológica en la supervivencia y el éxito reproductivo ha sido bien establecida en muchos taxones, incluyendo las aves. Por tanto, el estudio y cuantificación de respuestas fisiológicas frente a estresores intrínsecos y extrínsecos sirve para conocer el estado actual y futuro de las poblaciones (Bustillo-de la Rosa *et al.*, 2022; Fitzgerald *et al.*, 2022).

Las especies evolucionan ajustando su función inmune al contexto ecológico y medioambiental. En aves, la exposición a patógenos está mediada por factores ecológicos como el hábitat, la sociabilidad y la migración (Hasselquist, 2007). Por ejemplo, en especies altamente sociales se promueve la transmisión horizontal de patógenos y parásitos porque la corta distancia entre individuos en un grupo facilita esa transmisión. Por tanto, los parásitos tienen el potencial de actuar como fuerza de selección del tamaño grupal o de comportamientos solitarios (Côté y Poulin, 1995). Mientras que las especies migradoras de largas distancias están expuestas a mayor diversidad de fauna parásita y por ello desarrollan órganos de defensa inmune más grandes que aves sedentarias (Møller y Erritzøe, 1998). Por tanto, especies coloniales y migratorias desarrollarían mecanismos inmunológicos que contrarresten la elevada presión patogénica (Minias, 2018). La golondrina común, *Hirundo rustica*, es una pequeña ave paseriforme migratoria y social que se reproduce en colonias que pueden ser desde unas pocas parejas hasta más de 100, por cuyas características se convierte en buen modelo de estudio (Møller, 1987; Costanzo *et al.*, 2017; Romano *et al.*, 2018).

La inversión de recursos en la función inmune puede causar un compromiso entre rasgos de la historia de vida. Diversos estudios muestran un compromiso entre la inversión en el sistema inmune y la reproducción, ya que es energéticamente costoso

(Saino *et al.*, 2002; Ardia, 2005; Hanssen *et al.*, 2005). La función inmune se puede asociar evolutivamente con el ritmo de vida y la longevidad. De esta forma, especies más longevas invierten más en su propio mantenimiento que en la reproducción, desarrollando respuestas inmunes mayores (Minias, 2018).

Los análisis hematológicos se han mostrado como buen método para medir la condición fisiológica. El conteo, identificación del estado y morfología de las células de la sangre proveen de información sobre el estrés, condición inmunológica y reconocimiento de enfermedades e infecciones (Minias *et al.*, 2017; Ribeiro *et al.*, 2020; Ushine *et al.*, 2020; Fitzgerald *et al.*, 2022).

La evaluación de los perfiles de leucocitos sirve para medir el estrés, ya que representan los componentes del sistema inmune que proveen de protección frente patógenos y otros agentes estresantes (Ribeiro *et al.*, 2020; Fitzgerald *et al.*, 2022). En aves, los leucocitos se clasifican en granulocitos (basófilos, eosinófilos y heterófilos) y agranulocitos (linfocitos y monocitos). Los linfocitos son responsables de la inmunidad adquirida produciendo anticuerpos y respuestas específicas ante patógenos. Mientras que el resto de las células actúan en la inmunidad innata, que es la primera línea de defensa inmune (Minias *et al.*, 2017; Ribeiro *et al.*, 2020; Ushine *et al.*, 2020; Fitzgerald *et al.*, 2022). Las funciones de los eosinófilos y basófilos no están claras, pero parece que actúan en reacciones hiper sensitivas. Los eosinófilos participan en contra de infecciones parasitarias. Los monocitos fagocitan y degradan microorganismos, células anormales y desechos celulares (Ribeiro *et al.*, 2020). Los heterófilos están involucrados en la respuesta inflamatoria, encargándose de atacar bacterias a través de procesos como quimiotaxis, opsonización, fagocitosis y lisis, y participan en la respuesta inicial ante patógenos mediante la señalización por receptores y eliminación de esos patógenos, y en

la inmunidad innata para proteger de la infección viral (Ribeiro *et al.*, 2020; Ushine *et al.*, 2020).

Los heterófilos y linfocitos, en conjunto, conforman aproximadamente el 80% de los leucocitos. La relación entre ambos, conocida como índice H/L, se usa como medida de estrés, ya que si aumenta la concentración de corticosteroides provocada por un factor estresante se promoverá mayor reclutamiento de heterófilos con relación a los linfocitos. Consecuentemente, se produce un incremento en el índice H/L. De modo que la inmunidad aviar es medida por la ratio H/L (Grilli *et al.*, 2018; Włodarczyk *et al.*, 2018; Ribeiro *et al.*, 2020; Ushine *et al.*, 2020). La variación de este índice se ha registrado como el reflejo de un amplio espectro de estresores; como el parasitismo, la escasez de alimento, la muda, el miedo o alteraciones medioambientales (Jakubas *et al.*, 2013; Minias *et al.*, 2017; Włodarczyk *et al.*, 2018; Ribeiro *et al.*, 2020).

Los parásitos son un agente evolutivo importante, desafiando la aptitud biológica de los individuos. El efecto causado depende de la maquinaria genética del hospedador y del parásito, además de las condiciones en las que se encuentren. De manera que los sistemas de defensa del individuo infectado compiten por los recursos con otras actividades, por lo que se encontrará ante un compromiso energético. Estas problemáticas causadas por los parásitos son líneas importantes de estudio en biología evolutiva porque podemos conocer las fluctuaciones en la eficacia biológica de las poblaciones (Fletcher *et al.*, 2019; Dugas y Border, 2021).

La alteración del índice H/L se ha visto relacionada con el estrés inducido por parásitos. Algunos factores influyentes son el grado de virulencia, el grado de parasitemia y su interacción con aspectos del individuo como edad, sexo y condición corporal. Sin embargo, esta interacción no está clarificada, pues no hay respuestas consistentes. Algunos estudios de *Plasmodium*, *Haemoproteus* y *Leucocytozoon* muestran que

producen un incremento del índice, mientras que otros han hallado un descenso o incluso no observan dichas variaciones. Por tanto, se interpreta que el alto índice H/L es indicador de infecciones activas o buena habilidad para controlar y evitar infecciones parasitarias (Bustillo-de la Rosa *et al.*, 2022).

La detección de hemosporidios en aves ha mejorado gracias a los avances en técnicas moleculares. Con microscopía reconocemos los estadios del ciclo de infección de los parásitos y las morfologías en cada etapa. Mientras que las técnicas moleculares permiten comprobar el estado de infección, aseguran el género y el linaje del parásito (Valkiūnas *et al.*, 2009; Clark *et al.*, 2015). Estos métodos facilitan la descripción de secuencias de ADN parasitarias y el incremento de conocimiento acumulado en las bases de datos. Por tanto, es esencial combinar ambos métodos, la observación al microscopio y las técnicas moleculares como PCR para entender la verdadera diversidad y especificidad (Ciloglu *et al.*, 2016).

Durante la época de reproducción las aves sufren un incremento de la demanda física, que viene aparejado con limitaciones del suministro de energía que debe ser invertido en su propia supervivencia o en su descendencia, de modo que los padres entran en un compromiso energético y puede causar la supresión de su sistema inmune (Pap y Markus, 2003). Por tanto, invertir energía en la reproducción es para lograr el éxito reproductivo y, para ello, deben asignar los recursos a las crías y otorgarles protección a costa de su propia condición física (Norris y Evans, 2000).

En este trabajo se usó como modelo de estudio a la golondrina común para determinar cómo el estrés afecta a las estrategias vitales de sus individuos, de manera que se compruebe el uso del índice H/L como herramienta. Los objetivos de este trabajo son (1) describir el estado de estrés de los individuos a partir de parámetros hematológicos, (2) establecer la relación entre diferencias morfológicas y fisiológicas de los individuos

según el índice H/L, (3) identificar si los individuos infectados por malaria muestran diferencias en el índice H/L con respecto a los no infectados y (4) analizar la eficacia biológica asociando el estrés con el éxito reproductivo de los individuos y el periodo en el que se encontraban durante la época de reproducción.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Área de estudio y procedimientos de toma de muestras en el campo

Se estudiaron seis colonias reproductoras de *Hirundo rustica* en localidades rurales de las provincias de Sevilla y Badajoz (suroeste de España), durante febrero a julio en 2017 y 2018. Se recopilaban datos de 104 individuos (41 hembras y 63 machos). Para ello, se capturaron utilizando redes de niebla en cada sitio de cría y se identificó a cada ejemplar con una anilla metálica y otra anilla con una combinación de dos colores. Para cada individuo se midió la masa corporal con una balanza digital con un error de ± 0.01 g, el tarso con un calibre digital con un error de ± 0.01 mm y la longitud de las rectrices más externas con una regla con un error de 1 mm. Además, se realizó un conteo de los malófagos que se observaron. Clasificamos las golondrinas en dos clases de edad diferentes, siendo ambas sexualmente maduras: jóvenes y adultas, donde las primeras se definen como aquellos individuos de un año de edad que fueron anillados como polluelos/volantones en el año anterior. Las adultas son individuos de 2 años o más que estaban en su segundo año de migración o aquellos anillados como polluelos/volantones que fueron recapturados 2 años o más después de su primera captura.

De los 104 individuos capturados se recopilaban datos de su reproducción para 78 individuos. Se realizaron observaciones en un “Hide” con telescopios para identificar cada individuo marcado al nido que atendía durante la época de reproducción. Una vez

por semana se realizó un seguimiento de la reproducción visitando las colonias para determinar la fecha de la primera puesta que se estimó teniendo en cuenta que la hembra pone un huevo cada día y detectando entre visitas cuándo se producía la puesta con un error máximo de ± 3.5 días. En las sucesivas visitas se anotó el tamaño de puesta y el número de huevos y pollos totales, ya que la golondrina común realiza dos o tres puestas en cada estación reproductora (Romano *et al.*, 2018).

Se recogió una muestra de sangre con una aguja y un capilar tomada en la vena braquial, cuyo volumen dependía del rango clínicamente normal para aves de esta especie según su peso corporal. Se realizó un frotis sanguíneo extendiendo de manera homogénea una gota de sangre en el portaobjetos y dejándola secar al aire, después se almacenaron para su fijación y tinción en el laboratorio. El resto de sangre se almacenó en 500 μ l de SET-buffer (0.015M NaCl, 0.05M Tris, 0.001M EDTA y pH 8.0) para su posterior análisis molecular.

3.2. Frotis sanguíneo y microscopía

Los frotis se sumergieron en un frasco de metanol absoluto durante 5-10 minutos para fijar las células mediante la tinción de Wright-Giemsa (Samour, 2011; Davis, 2005).

Las muestras teñidas se observaron bajo el microscopio Leica DM5500B. Se identificaron los tipos celulares seleccionando las zonas uniformes (igual densidad de células) sin claros con el objetivo de 100x con aceite de inmersión. Así, obtuvimos el número de heterófilos, linfocitos, eosinófilos, monocitos, basófilos y trombocitos totales en cada individuo. Calculamos el número total de glóbulos blancos y el índice H/L dividiendo el número de heterófilos por los linfocitos. Por cada individuo se contaron alrededor de 2000 eritrocitos. La identificación se llevó a cabo utilizando como referencia

un atlas de hematología aviar clínica (Clark *et al.*, 2009). Además, se identificó el número de eritrocitos parasitados por hemosporidios y fueron determinados a nivel de género (*Plasmodium*, *Haemoproteus* y *Leucocytozoon*) utilizando como guía la identificación de parásitos maláricos aviares de Valkiūnas (2004), cuya comprobación se realizó posteriormente mediante el análisis por PCR.

3.3. Detección molecular de infección por hemosporidios

Se enviaron las muestras de sangre al Servicio de Técnicas Aplicadas a las Biociencias de la Universidad de Extremadura (STAB) para la extracción del ADN.

Una vez obtenidas las muestras de ADN, se diluyeron a 25 ng/μl para realizar la reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR anidada), siguiendo el protocolo de detección de parásitos descrito por Hellgren *et al.* (2004). Las placas de PCR analizadas contaban con controles negativos (agua) y controles positivos (de *Haemoproteus/Plasmodium* y de *Leucocytozoon*). Como cebadores se usaron para la primera PCR NF1 + NR3, mientras que para la segunda PCR se emplearon los cebadores F + R2 para detectar *Haemoproteus/Plasmodium* y FL + R2L para *Leucocytozoon*. Una vez amplificadas las muestras por PCR, el resultado se evaluó mediante una electroforesis de un gel de agarosa al 2%. El revelado se llevó a cabo en un documentador de geles BioRaD XR bajo luz ultravioleta.

3.4. Análisis estadísticos

Los datos fueron analizados usando el software estadístico de RStudio (Version 4.2.2. RStudio Team, n.d.). Primero, se comprobó si las variables se ajustaban a una

distribución normal mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Para aquellas variables con distribución no normal se buscó su normalización mediante una transformación logarítmica para el empleo de las pruebas estadísticas correspondientes.

Se realizó un análisis descriptivo evaluando la media y desviación estándar del número de cada uno de los componentes del perfil leucocitario según todas las variables tenidas en cuenta (sexo, colonia de cría, clase de edad, año de captura y estado de infección).

Para comprobar si existían diferencias según el sexo, la clase de edad, el año de captura y el estado de infección en relación con los parámetros hematológicos se aplicó la prueba t de Student; mientras que para ver diferencias según la colonia y el número de puestas se usó la prueba ANOVA; y para la fecha de primera puesta, el número de volantones totales y el número de huevos totales utilizamos una regresión lineal.

Para conocer la asociación entre la condición de estrés mediante el uso de parámetros hematológicos con las diferentes variables morfológicas, utilizamos el Modelo lineal General (GLM) usando el índice H/L como variable dependiente y el sexo, peso, tarso, longitud de las rectrices externas, año de captura y colonia de reproducción como variables independientes. En un segundo análisis GLM con la ratio H/L como variable dependiente, incluimos como variables independientes el estado de infección como un factor de dos niveles (i.e., 1 = infectado, 0 = no infectado) y la abundancia de malófagos, así como la interacción entre ambos factores. Para testar cómo la inversión o la fenología en la reproducción explica la ratio H/L como medida de estrés, se realizaron dos GLMs, ambos usando como variable dependiente el índice H/L. En uno de ellos se tuvieron en cuenta como variables independientes el peso, el tarso, el sexo, el número de puestas, el número total de huevos y volantones y la colonia de reproducción. Luego, clasificamos el periodo de reproducción en cuatro etapas: (1) antes de la puesta (i.e.,

Prepuesta), (2) durante el periodo de incubación (i.e., Incubando), (3) con pollos en el nido (i.e., Pollos) y (4) cuando el nido está vacío (i.e., Post puesta). De esta manera este último análisis de GLM incluyó como variables independientes la fecha de la primera puesta y estos periodos de la época de reproducción.

Para hallar los GLMs adecuados, se partió de un modelo *full* (todas las variables explicativas posibles) para alcanzar uno reducido usando el paquete MASS con la función `stepAIC()` que compara con un “Stepwise Backward Procedure” los diferentes modelos en una comparación por pasos hacia atrás y seleccionando mediante un test ANOVA el modelo más parsimonioso hasta llegar al mejor modelo posible (Venables y Ripley, 2002). Las variables independientes incluidas en los modelos fueron previamente estandarizadas con media igual a 0 y desviación típica igual a 2 siguiendo Gelman (2008).

4. RESULTADOS

4.1. Perfil de leucocitos

Los resultados descriptivos sobre el conteo de células sanguíneas están presentados en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Índice H/L y el número de los diferentes tipos de leucocitos (heterófilos, linfocitos, eosinófilos y monocitos) (media \pm desviación estándar) en golondrina común según su sexo, colonia, clase de edad, año de captura y estado de infección (i.e., Sí = infectado; No = no infectado).

| VARIABLES | | N | PARÁMETROS | | | | |
|---------------------|-------------|----|-----------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| | | | H/L | Heterófilos | Linfocitos | Eosinófilos | Monocitos |
| SEXO | H | 41 | 0.6 \pm 0.5 | 1.8 \pm 1.2 | 4.4 \pm 3.4 | 0.5 \pm 0.7 | 0.5 \pm 2 |
| | M | 63 | 0.5 \pm 0.7 | 1.2 \pm 1.4 | 2.6 \pm 2 | 0.3 \pm 0.6 | 0.2 \pm 0.4 |
| COLONIA | CANDEAL | 5 | 0.35 \pm 0.40 | 1.6 \pm 2.2 | 6.1 \pm 4.6 | 0.4 \pm 0.7 | 2.8 \pm 5.4 |
| | LA CALERA | 26 | 0.72 \pm 0.74 | 1.8 \pm 1.9 | 2.6 \pm 1.6 | 0.5 \pm 0.7 | 0.3 \pm 0.5 |
| | LA ALEGRÍA | 19 | 0.38 \pm 0.54 | 0.9 \pm 1.1 | 3.6 \pm 2.5 | 0.3 \pm 0.7 | 0.06 \pm 0.2 |
| | LAS COLADAS | 31 | 0.60 \pm 0.48 | 1.3 \pm 0.9 | 3.2 \pm 2.2 | 0.4 \pm 0.7 | 0.2 \pm 0.4 |
| | CHAPARRO | 17 | 0.73 \pm 0.82 | 1.4 \pm 1.1 | 3.3 \pm 3.8 | 0.3 \pm 0.4 | 0.1 \pm 0.3 |
| | PERALERA | 6 | 0.30 \pm 0.32 | 1.6 \pm 1.2 | 3.7 \pm 3.6 | 0.6 \pm 0.5 | 0.3 \pm 0.5 |
| CLASE DE EDAD | ADULTO | 46 | 0.72 \pm 0.4 | 1.6 \pm 1.6 | 2.7 \pm 1.8 | 0.4 \pm 0.7 | 0.3 \pm 0.5 |
| | JOVEN | 42 | 0.4 \pm 0.4 | 1.3 \pm 1.1 | 4.1 \pm 3.1 | 0.4 \pm 0.7 | 0.1 \pm 0.3 |
| AÑO | 2017 | 86 | 0.57 \pm 0.63 | 1.3 \pm 1.3 | 2.8 \pm 2 | 0.4 \pm 0.6 | 0.2 \pm 0.4 |
| | 2018 | 18 | 0.47 \pm 0.43 | 2 \pm 1.5 | 5.6 \pm 4.3 | 0.6 \pm 0.8 | 0.9 \pm 2.9 |
| ESTADO DE INFECCIÓN | SÍ | 12 | 0.54 \pm 0.69 | 1.8 \pm 1.1 | 5.9 \pm 4.3 | 0.5 \pm 0.9 | 0.1 \pm 0.2 |
| | NO | 92 | 0.56 \pm 0.59 | 1.3 \pm 1.4 | 2.9 \pm 2.1 | 0.4 \pm 0.6 | 0.4 \pm 1.3 |

El número de linfocitos (t-test = 3.5, d.f = 72.98, $P = 0.001$) y de heterófilos (t-test = 3.53, d.f = 87.8, $P = 0.0006$) fue superior en hembras que en machos (**Figura 1**), pero no hubo diferencias para el índice H/L (t-test = 0.73, d.f = 91.15, $P = 0.47$), eosinófilos (t-test = 1.28, d.f = 69.58, $P = 0.2$) o monocitos (t-test = -0.05, d.f = 53.28, $P = 0.96$).

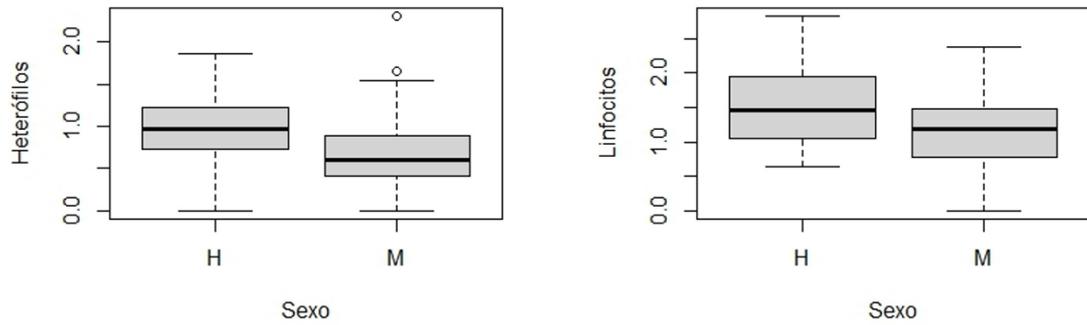


Figura 1. Representación gráfica del número de heterófilos y linfocitos contados en relación con el sexo.

Según la colonia en la que se realizó el muestreo, encontramos diferencias estadísticamente significativas en el número de monocitos ($F_{(5, 98)} = 4.33, p = 0.001$). Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en el índice H/L ($F_{(5, 95)} = 1.42, p = 0.22$), en el número de heterófilos ($F_{(5, 98)} = 1.02, p = 0.41$), el número de linfocitos ($F_{(5, 98)} = 0.91, p = 0.48$), o en el número de eosinófilos ($F_{(5, 98)} = 0.52, p = 0.76$).

Teniendo en cuenta las diferencias entre las dos clases de edad consideradas, encontramos diferencias significativas en el número de monocitos (t-test = 2.01, d.f = 81.17, $P = 0.04$), en el índice H/L (t-test = 2.50, d.f = 78.09, $P = 0.01$) y en el número de linfocitos (t-test = -2.77, d.f = 83.54, $P = 0.006$) (**Figura 2**). No obstante, no hallamos diferencias entre clases de edad en el número de heterófilos (t-test = 0.97, d.f = 83.83, $P = 0.34$), ni en el de eosinófilos (t-test = 0.01, d.f = 82.39, $P = 0.99$).

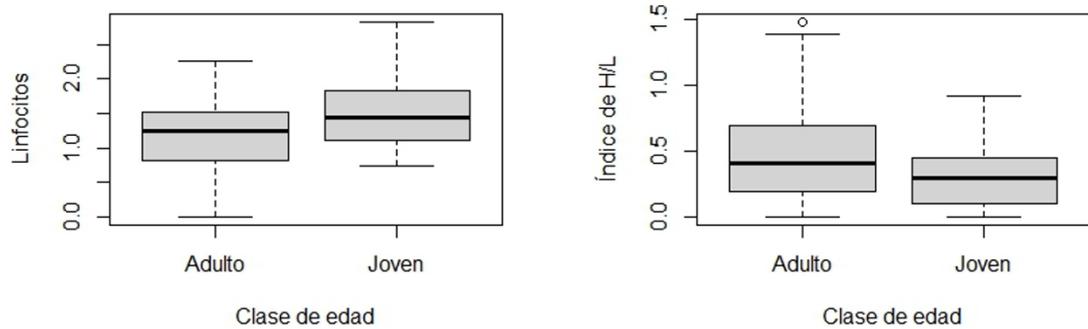


Figura 2. Representación gráfica de la relación entre variables dependientes como linfocitos e índice H/L frente a la clase de edad.

Respecto al año en el que se tomaron las muestras se encontraron diferencias significativas en el número de linfocitos ($t\text{-test} = -2.52$, $d.f = 20.52$, $P = 0.02$) (**Figura 3**), pero no para el resto de las variables analizadas (Heterófilos: $t\text{-test} = -1.97$, $d.f = 23.02$, $P = 0.06$; H/L: $t\text{-test} = 1.28$, $d.f = 30.83$, $P = 0.21$; Eosinófilos: $t\text{-test} = -1.01$, $d.f = 21.6$, $P = 0.32$; y Monocitos: $t\text{-test} = -1.09$, $d.f = 18.32$, $P = 0.29$).

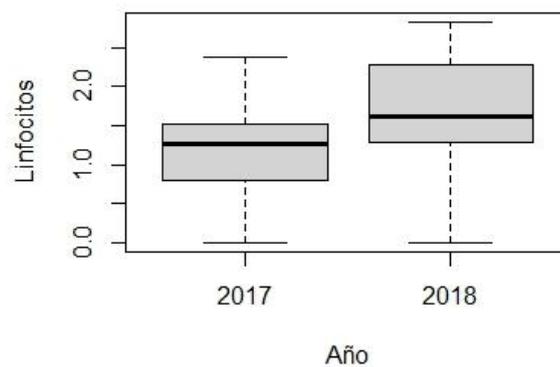


Figura 3. Representación gráfica de la relación entre el número de linfocitos como la variable dependiente frente al año de captura.

Dependiendo del estado de infección, se observaron diferencias significativas en el número de linfocitos (t-test = -2.23, d.f = 14.76, $P = 0.04$) (**Figura 4**). Pero no encontramos diferencias entre estar infectado o no en el índice H/L (t-test = 0.52, d.f = 15.96, $P = 0.61$), en el número de heterófilos (t-test = -1.65, d.f = 18.25, $P = 0.11$), en el número de eosinófilos (t-test = -0.32, d.f = 15.43, $P = 0.75$), o en el número de monocitos (t-test = 1.62, d.f = 35.20, $P = 0.11$).

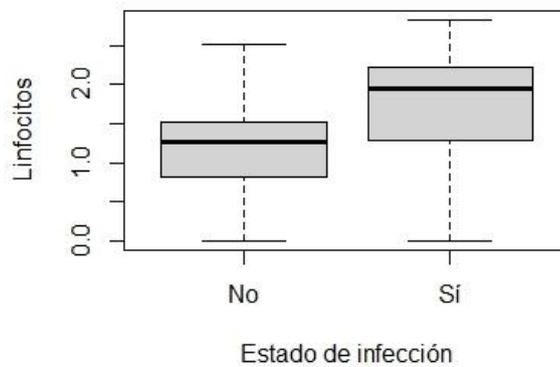


Figura 4. Representación gráfica de la relación entre el número de linfocitos frente al estado de infección por parásitos sanguíneos.

Para el número de puestas se encontraron diferencias significativas en el índice H/L ($F_{(2, 69)} = 5.41, p = 0.006$) y en el número de heterófilos ($F_{(2, 70)} = 3.31, p = 0.04$) (**Figura 5**), pero no para el resto de las variables (Linfocitos: $F_{(2, 70)} = 1.64, p = 0.20$; Eosinófilos: $F_{(2, 70)} = 0.25, p = 0.78$; y Monocitos: $F_{(2, 70)} = 0.96, p = 0.39$).

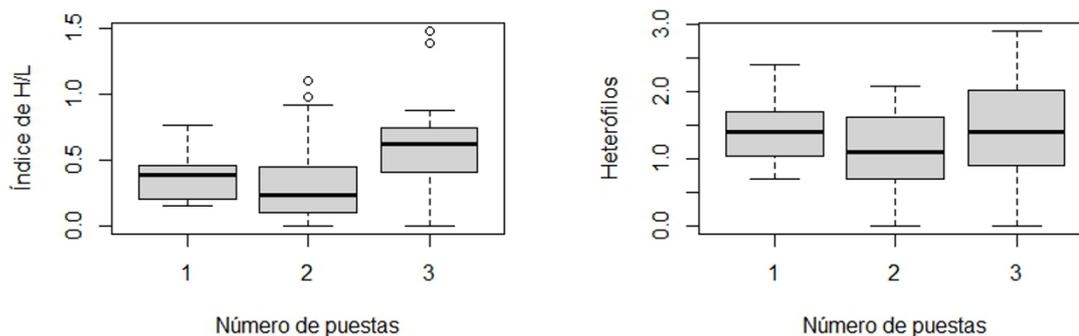


Figura 5. Representación gráfica de la relación entre el índice H/L y el número de heterófilos frente al número de puestas.

Con respecto a la época de reproducción, hallamos diferencias significativas en el número de eosinófilos ($F_{(3, 74)} = 2.80, p = 0.04$), pero no para el resto de los parámetros analizados (Linfocitos: $F_{(3, 74)} = 1.04, p = 0.38$; Heterófilos: $F_{(3, 74)} = 1.53, p = 0.21$; H/L: $F_{(3, 73)} = 0.73, p = 0.53$; y Monocitos: $F_{(3, 74)} = 1.82, p = 0.15$).

Encontramos que el número de huevos totales puestos por la hembra o en el caso del macho por su pareja durante la estación reproductora explicaba una parte de la varianza en el número de linfocitos ($\beta \pm SE = -0.06 \pm 0.02, t = -2.52, p = 0.01$) y en el índice H/L ($\beta \pm SE = 0.03 \pm 0.01, t = 2.48, p = 0.01$). Conforme aumenta el número total de huevos aumenta el índice H/L (**Figura 6**). Mientras que encontramos el efecto opuesto con el número de linfocitos (**Figura 6**). Sin embargo, no hallamos resultados significativos en el número de heterófilos ($\beta \pm SE = 0.01 \pm 0.02, t = 0.39, p = 0.699$), en el de eosinófilos ($\beta \pm SE = -0.002 \pm 0.02, t = -0.10, p = 0.92$), ni en el número de monocitos ($\beta \pm SE = -0.02 \pm 0.02, t = -0.92, p = 0.36$).

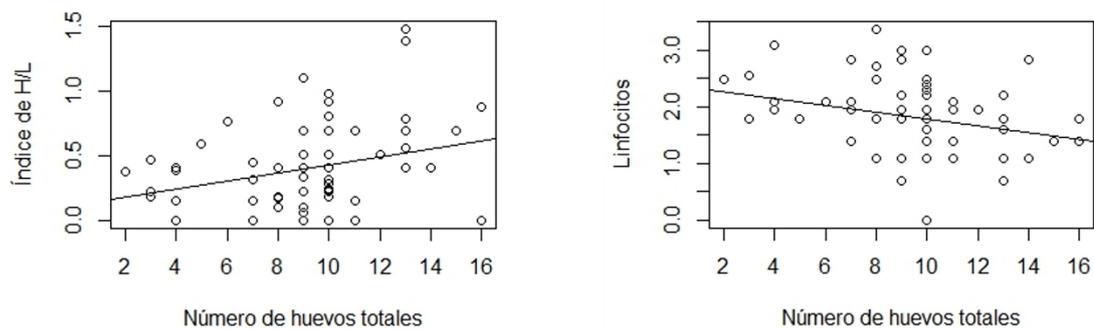


Figura 6. Representación gráfica de la relación entre el índice H/L y el número de linfocitos frente al número de huevos totales.

Encontramos que a medida que aumenta el número de pollos totales disminuye el número de linfocitos ($\beta \pm SE = -0.06 \pm 0.02$, $t = -2.298$, $p = 0.02$) (**Figura 7**). No obstante, para el resto de las variables no encontramos diferencias (Heterófilos: $\beta \pm SE = -0.01 \pm 0.02$, $t = -0.41$, $p = 0.68$; H/L: $\beta \pm SE = 0.01 \pm 0.01$, $t = 1.004$, $p = 0.32$; Eosinófilos: $\beta \pm SE = -0.015 \pm 0.02$, $t = -0.68$, $p = 0.5$; Monocitos: $\beta \pm SE = -0.024 \pm 0.02$, $t = -1.09$, $p = 0.28$).

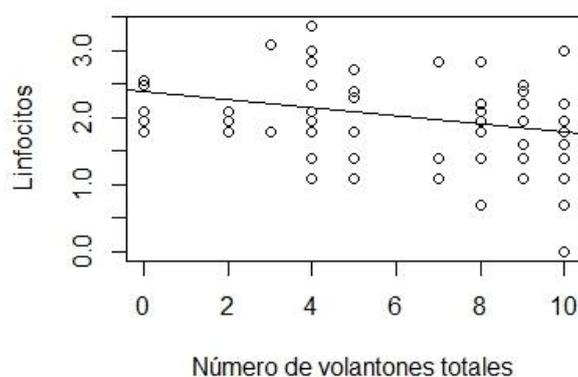


Figura 7. Representación gráfica de la relación entre el número de linfocitos frente al número de volantones totales.

La fecha de primera puesta no explicaba la varianza de ninguna de las variables analizadas (Linfocitos: $\beta \pm SE = 0.005 \pm 0.003$, $t = 1.698$, $p = 0.09$; Heterófilos: $\beta \pm SE = 0.002 \pm 0.003$, $t = 0.53$, $p = 0.6$; H/L: $\beta \pm SE = -0.002 \pm 0.001$, $t = -1.06$, $p = 0.29$; Eosinófilos: $\beta \pm SE = -0.001 \pm 0.003$, $t = -0.38$, $p = 0.70$; Monocitos: $\beta \pm SE = 0.003 \pm 0.003$, $t = 0.99$, $p = 0.33$).

4.2. Parámetros morfológicos y fisiológicos asociados con el estrés

El análisis GLM para las variables relacionadas con los datos morfológicos para explicar el índice H/L como condición de estrés, indicó que el mejor modelo fue aquel que incluyó la clase de edad como única variable predictora. Concretamente, encontramos que los individuos con clase de edad de 2 años o superior tenían una ratio H/L mayor que los individuos de un año de edad (**Tabla 2; Figura 8**).

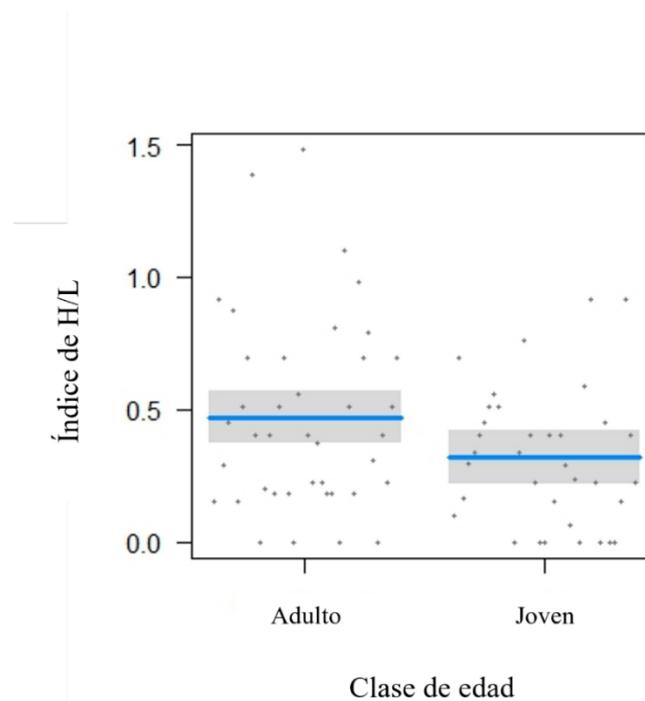


Figura 8. Efectos de la clase de edad en el índice H/L en una población de golondrina común estudiada en el suroeste de España.

4.3. Estrés y su relación con el estado de infección

Se identificaron parásitos hemosporidios de los géneros *Plasmodium*, *Haemoproteus* y *Leucocytozoon*. La prevalencia fue del 19.2% en hembras y de 8.1% en machos (**Figura 9**). Con respecto a la clase de edad, los individuos jóvenes presentaron una prevalencia de un 16.7% en comparación con un 10.3% en los adultos (**Figura 10**). Además, también encontramos diferencias en el estado de infección según el año de captura. Concretamente, fue de un 7.7% en 2017 y 36.4% en 2018 (**Figura 11**).

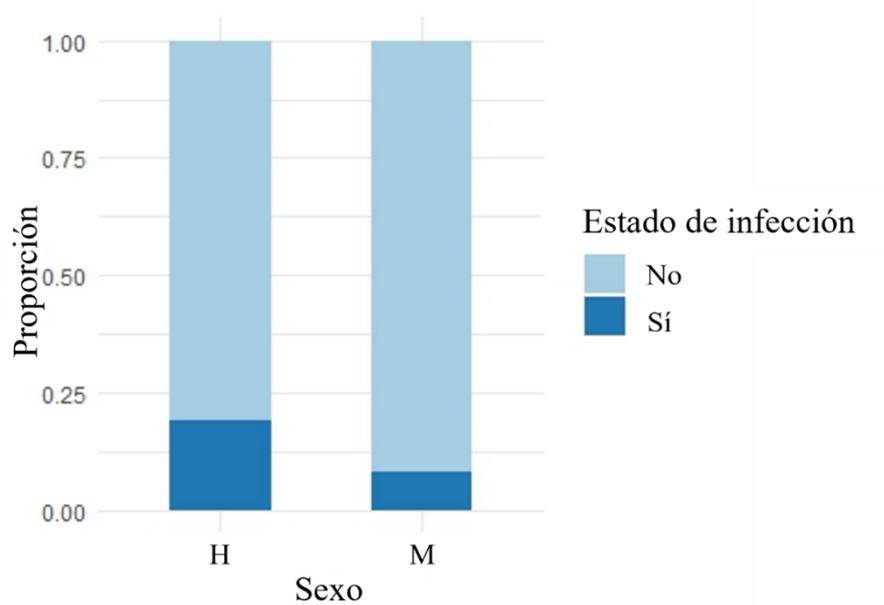


Figura 9. Representación gráfica de la prevalencia de infección según el sexo en una población de golondrina común estudiada en el suroeste de España.

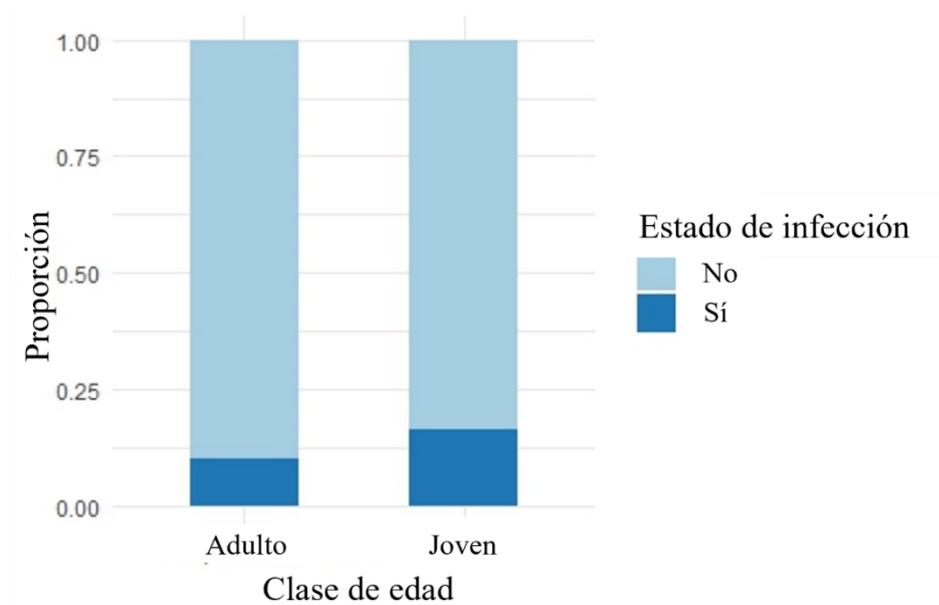


Figura 10. Representación gráfica de la prevalencia de infección según la clase de edad en una población de golondrina común estudiada en el suroeste de España.

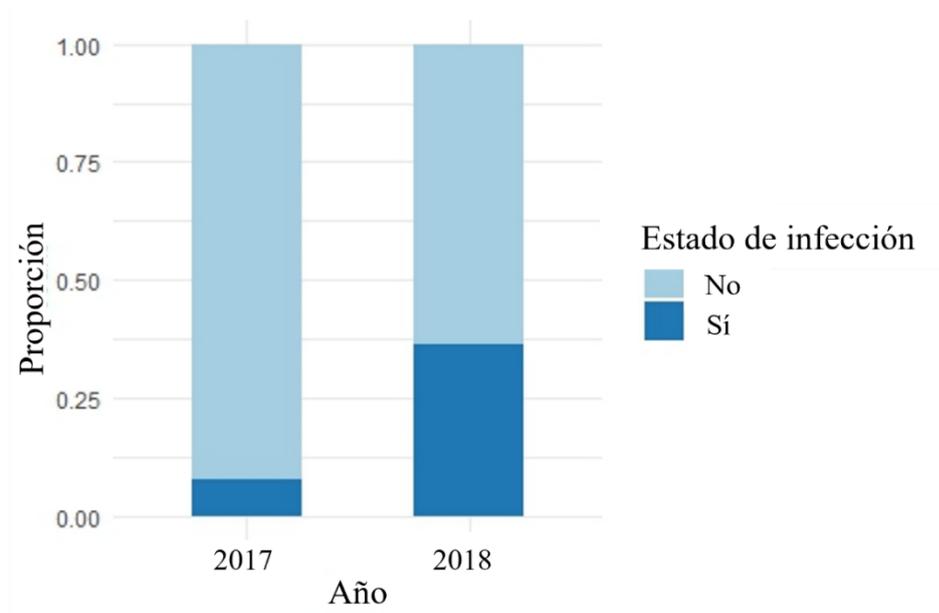


Figura 11. Representación gráfica de la prevalencia de infección según el año de captura en una población de golondrina común estudiada en el suroeste de España.

El modelo GLM que incluyó la relación entre la ratio de H/L y el estado de infección no explicó la existencia de una correlación entre ambos (**Tabla 2**).

4.4. Relación de la eficacia biológica o *fitness* con el índice de estrés

El análisis GLM para las variables relacionadas con los datos de la eficacia biológica de los individuos para explicar el índice H/L como condición de estrés, indicó que el mejor modelo fue aquel que incluyó el número de puestas como única variable predictora. Concretamente, encontramos que los individuos que pusieron 3 puestas tenían una ratio H/L mayor que los individuos con menor número de puestas (**Tabla 2; Figura 12**).

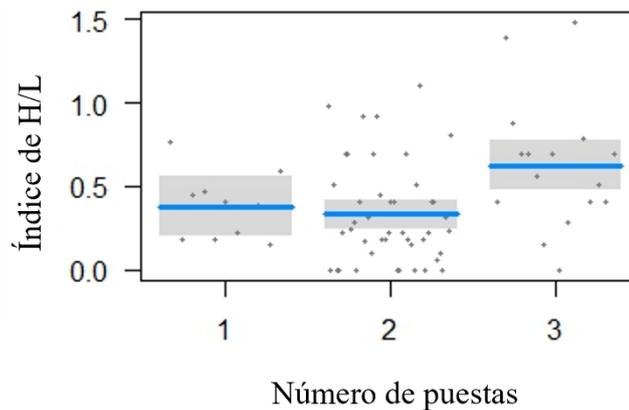


Figura 12. Efectos del número de puestas en el índice H/L en una población de golondrina común estudiada en el suroeste de España.

4.5. El estrés en los distintos periodos de reproducción

En el modelo GLM con el que evaluamos el efecto del periodo de la época de reproducción en la condición de estrés medida con el índice H/L, no encontramos diferencias significativas que explicaran una correlación. De manera que resultó que durante la época de reproducción los individuos no sufren un estrés significativo (**Tabla 2**).

Tabla 2. Resultados de los GLMs reducidos para identificar los factores asociados con el índice H/L.

| VARIABLES DEPENDIENTES | N | AIC | VARIABLES EXPLICATIVAS | β | SE | F | d.f | P-value |
|----------------------------------|-----|-------|-------------------------------|---------|-------|------|-------|----------|
| Índice H/L (datos: morfología) | 104 | 44.35 | Clase de edad (joven) | - 0.15 | 0.07 | 4.47 | 1, 75 | 0.04 * |
| Índice H/L (estado de infección) | 104 | 46.7 | Estado de infección | - 0.32 | 0.15 | 1.33 | 1, 75 | 0.25 |
| | | | Malófagos | - 0.007 | 0.004 | 1.04 | 1, 74 | 0.31 |
| | | | Estado de infección:Malófagos | 0.015 | 0.008 | 3.66 | 1, 73 | 0.06 . |
| Índice H/L (datos: fitness) | 78 | 58.5 | Número de puestas | 0.29 | 0.15 | 5.38 | 2, 69 | 0.006 ** |
| Índice H/L (datos: periodo cría) | 78 | 39.9 | NULL | | | | | |

5. **DISCUSIÓN**

Nuestro estudio confirma que la cuantificación de parámetros hematológicos puede usarse como medida de la condición de estrés y el estado de las poblaciones. Encontramos que los individuos que invierten más en la reproducción, en relación con el número de puestas producidas durante un periodo reproductor, tuvieron un índice de estrés mayor que los que realizaron menor número de puestas. Aunque no encontramos el mismo resultado para el número de pollos totales o la etapa de la época de reproducción. Se observó variación del índice según el número de huevos totales, pero cuando analizamos la correlación incluyendo todas las variables del *fitness* esta relación desaparece debido a que quizá no es por el número de huevos que tienen, sino por las veces que tienen que realizar una puesta y poner más huevos. También nuestros resultados establecieron la correlación entre el índice H/L y la clase de edad.

En este estudio encontramos que las hembras presentan mayor cantidad de heterófilos y linfocitos que los machos, lo que explica que no haya diferencias en el índice H/L. A pesar de que muchos estudios muestran diferencias entre sexos en este índice, argumentando que la razón se debe a la distinta contribución en el cuidado parental (Hörak *et al.*, 1998; Schmidt *et al.*, 2007; Palacios *et al.*, 2017), no hallamos tales

diferencias concordando con otros hallazgos que sugieren la ausencia de diferencias sexuales con respecto al estrés que conllevan los compromisos fisiológicos y de la historia de vida de los individuos (Losdat *et al.*, 2016; Chediack *et al.*, 2022). Varias evidencias mostraron que los perfiles de leucocitos difieren entre sexos debido a que las hormonas sexuales actúan como moduladores ante la respuesta del sistema inmune, siendo la testosterona en machos inmunosupresora y el estrógeno en hembras potenciador (Campo y Davila, 2002; Foo *et al.*, 2016; Roved *et al.*, 2017; Grilli *et al.*, 2018; Ribeiro *et al.*, 2020). El número más alto de linfocitos en el caso de las hembras podría explicarse debido a que la prevalencia en la infección por parásitos hemosporidios fue mayor (19.2%) que en los machos (8.1%).

La variación en el número de monocitos según la localidad de las poblaciones de estudio puede explicarse debido a la distinta probabilidad de infectarse en cada una, ya que los monocitos participan en infecciones parasitarias degradando microorganismos (Ribeiro *et al.*, 2020). Es conocido que el índice H/L responde a diferentes estresores medioambientales (Johnstone *et al.*, 2012), aunque en este estudio no encontramos tales distinciones posiblemente porque los individuos estaban respondiendo de manera similar a las distintas condiciones que conforman las localidades.

Los resultados obtenidos entre las dos clases de edad muestran diferencias en el índice H/L, el número de linfocitos y de monocitos. La edad es un factor biológico importante al medir las variables hematológicas, ya que se han registrado datos de varios trabajos que muestran cómo existe tal influencia, habiendo una distinta inversión de recursos por parte de los más jóvenes a comparación de los adultos de más edad (Campo y Davila, 2002; Schmidt *et al.*, 2007; Montolio *et al.*, 2017). Mayor número de linfocitos y monocitos en jóvenes se puede explicar debido a que la prevalencia de infección en jóvenes fue mayor (16.7%) que en los adultos (10.3%), posiblemente debido a que los

jóvenes e inexpertos son más vulnerables a estos parásitos. También demostramos diferencias significativas en el índice H/L, siendo los adultos quienes presentan mayor nivel de estrés. Estos resultados están de acuerdo con otros trabajos como los de Losdat *et al.* (2016) que observaron cómo el índice H/L en gorriones fue mayor en individuos de más edad. Esto puede deberse a varias hipótesis, por un lado, los adultos basándose en sus experiencias previas están asignando más energía a unos procesos costosos en comparación a otros como la propia supervivencia, al contrario de lo que harían los jóvenes que invierten más en sí mismos (Dickens y Romero, 2010; Montolio *et al.*, 2017). Por otro lado, si tenemos en cuenta la esperanza de vida, sugerimos que los jóvenes optan por no invertir tanta energía y recursos en la época reproductiva de ese año, ya que tendrán más posibilidades de reproducirse en los siguientes años, al contrario de lo que sucede con individuos ya adultos de dos o más años cuyas posibilidades de intentos de reproducción son ya menores (Williams, 1996; Velando *et al.*, 2006; Losdat *et al.*, 2016). Estos hallazgos se apoyan en las observaciones de que a medida que aumenta la edad va decayendo la función inmune (Cichón *et al.*, 2003; Palacios *et al.*, 2007).

Atendiendo al año de captura, se observaron diferencias en el número de linfocitos. Durante el año 2018 los individuos de *H. rustica* presentaban mayor cantidad, pudiéndose interpretar como una mayor actividad del sistema inmune durante ese año debido a que la prevalencia de infección era mayor (36.4%) en comparación con el año 2017 (7.7%). Los individuos infectados presentaban mayor número de linfocitos con respecto a los no infectados porque éstos se activan aumentando su número como respuesta a estos parásitos (Minias *et al.*, 2017; Ribeiro *et al.*, 2020; Ushine *et al.*, 2020; Fitzgerald *et al.*, 2022). Por otro lado, no observamos asociación entre la condición de estrés y el estado de infección por parásitos maláricos. Estos resultados muestran incongruencias al compararlos con otros trabajos como el de Lüdtke *et al.* (2013) en el

pinzón común (*Fringilla coelebs*) y la curruca capirotada (*Sylvia atricapilla*), que hallaron un mayor índice H/L en los individuos infectados. Sin embargo, los trabajos de van Dijk *et al.* (2015) o Meza-Montes *et al.* (2023) no hallaron asociación entre el parasitismo y el índice H/L en el ánade común (*Anas platyrhynchos*) y el cucarachero nuquirrufo (*Campylorhynchus rufinucha*), respectivamente. No encontrar dicha asociación puede deberse a que los parásitos hemosporidios afectan al índice de H/L cuando los individuos se hallan bajo un factor que ejerza mucha presión sobre ellos, tal y como la migración o la época de reproducción (Minias, 2018). Atendiendo a términos de coevolución, nuestros resultados apoyan la hipótesis de la reina roja que explica cómo los organismos están en constante cambio para adaptarse y proliferar mientras compiten con otros, así dos especies pueden entrar en la denominada “carrera armamentística” donde obtienen mejores adaptaciones para atacar o defenderse de la otra especie y sobrevivir (van Valen, 1973). Nuestro caso de estudio es una especie cuyo sistema inmunitario y sus componentes celulares adquiridos proporcionan al hospedador un conjunto de defensas altamente específicas que se activan ante la presencia de este agente parasitario sanguíneo, dando como resultado una defensa mejorada y más duradera tras varios casos de reinfección con las mismas cepas del parásito (Saino *et al.*, 2001; Møller y Erritzøe, 2002).

Futuros estudios pueden ir encaminados a investigar la prevalencia de infección, relacionándola con el índice H/L y la condición corporal de cada individuo de golondrina común, como los trabajos de Bustillo-de la Rosa *et al.* (2022) en la alondra de Dupont (*Chersophilus duponti*) y Jiménez-Peñuela *et al.* (2019) en el gorrión común (*Passer domesticus*), además de conocer cómo se ven afectadas las infectadas durante las distintas épocas de su ciclo de vida como la época de reproducción o la migración, o estudiar qué factores están correlacionados con la prevalencia de infección permitiéndonos obtener

mayor conocimiento del proceso de coevolución entre golondrina común y parásitos maláricos.

Resultó que conforme aumenta el número de puestas aumenta la ratio H/L y disminuye el número de linfocitos, por lo que sugerimos que cuantas más puestas pone una pareja el coste asociado a invertir de nuevo en el proceso que requiere poner una puesta y los gastos energéticos que conlleva producir más huevos es significativamente mayor, por tanto, explicaría el mayor índice de estrés y la inmunosupresión (Thomson *et al.*, 1998). El número de linfocitos varía según el número de huevos totales y el número de volantones totales. Esto concuerda con otros trabajos como el de Saino *et al.* (1997) que muestran cómo los nidos con más crías tienen una reducción de los linfocitos en comparación con los nidos con menos pollos. Esto puede interpretarse como una mejor inmunocompetencia de los padres cuando tienen menor número de descendientes, ya que pueden aportar más esfuerzos en su cuidado y asignar mejor los recursos entre ellos, ofreciéndoles incluso más oportunidades para invertir en su propia supervivencia (Saino *et al.*, 1997; Ilmonen *et al.*, 2003; Grzędzicka, 2017). Por otro lado, observar variación en el número de eosinófilos durante las distintas etapas de esta época reproductora sugiere que la reproducción altera el sistema inmunológico, tal y como anteriormente otros trabajos han demostrado también (Grilli *et al.*, 2018; Ribeiro *et al.*, 2020). No obstante, no hallamos correlación entre la condición de estrés con las etapas de esta época de reproducción, de manera que este periodo no presenta una demanda energética tan importante. Durante otras partes del ciclo vital de las aves, incluida la golondrina común, el periodo migratorio puede suponer una demanda energética importante y podrían ser factores que influyan en el índice de estrés u otros parámetros sanguíneos tanto o igual que la época de reproducción (Machado-Filho *et al.*, 2010). Por tanto, futuros estudios podrían ir orientados en comparar el nivel de estrés mediante la ratio H/L durante ambos

procesos, la migración y la reproducción, tal y como analizó Machado-Filho *et al.* (2010) en especies de *Elaenia* o como comprobaron Owen y Moore (2006) en su estudio de la condición inmunológica durante la migración del otoño y durante la época de reproducción del zorzalito de Swainson (*Catharus ustulatus*), el zorzalito rojizo (*Catharus fuscescens*) y el zorzal maculado (*Hylocichla mustelina*) que encontraron que la reducción en la capacidad inmune fue más importante durante la migración que en el periodo de reproducción.

En conclusión, hemos podido establecer un perfil de leucocitos atendiendo a datos recopilados de la condición fisiológica y la eficacia biológica de la golondrina común. Estos resultados implican el aumento del conocimiento sobre el estado y la viabilidad de las poblaciones estudiadas, mejorando la comprensión de los factores que afectan a la función inmune y al estrés. De modo que futuros trabajos pueden tener en cuenta estos parámetros hematológicos para conocer más sobre el contexto ecológico y evolutivo de esta especie de ave.

6. AGRADECIMIENTOS

Agradecemos por la identificación de células sanguíneas en los frotis mediante microscopía a Sergio Reinoso, por los análisis PCR a Marina Bollo y por la toma de datos de campo a Cosme López, Javier Balbontín, Alfonso Marzal, Sergio Magallanes y Luz García.

7. BIBLIOGRAFÍA

-Ardia, D. R. (2005). Individual quality mediates trade-offs between reproductive effort and immune function in tree swallows. *Journal of Animal Ecology*, 74, 517-524.

-Bustillo-de la Rosa, D., Calero-Riestra, M., Pérez-Granados, C., Mereu, S., Morales, M. B., Traba, J., López-Iborra, G. M., Barrero, A., Gómez-Catasús, J., Reverter, M., Viñuela, J., Oñate, J. J., Hervás, I., Justribó, J. H. y García, J. T. (2022). Leukocyte profile variation in Dupont's Lark (*Chersophilus duponti*) in Spain and Morocco. *Journal of Ornithology*, 163, 539-551.

-Campo, J. L. y Davila, S. G. (2002). Estimation of heritability for heterophil: lymphocyte ratio in chickens by restricted maximum likelihood: effects of age, sex, and crossing. *Poultry Science* 81, 1448–1453.

-Cichón, M., Sendekka, J. y Gustafsson, L. (2003). Age-related decline in humoral immune function in Collared Flycatchers. *Journal Evolutionary Biology*, 16, 1205-1210.

-Ciloglu, A., Yildirim, A., Duzlu, O., Onder, Z., Dogan, Z. e Inci, A. (2016). Investigation of avian haemosporidian parasites from raptor birds in Turkey, with molecular characterisation and microscopic confirmation. *Folia Parasitologica*, 63.

-Costanzo, A., Ambrosini, R., Caprioli, M., Gatti, E., Parolini, M., Canova, L., Rubolini, D., Romano, A., Gianfranceschi, L. y Saino, N. (2017). Lifetime reproductive success, selection on lifespan and multiple sexual ornaments in male European barn swallows. *Evolution*, 71(10), 2457-2468.

-Côté, I. M. y Poulin, R. (1995). Parasitism and group size in social animals: A meta-analysis. *Behavioral Ecology*, 6, 159–165.

- Chediack, J. G., Padrones, M. N., Ronchi, G., Arias, R. J. y Cid, F. D. (2022).** Daily and fasting variation in blood parameters and HL ratio in House Sparrow (*Passer domesticus*). *Canadian Journal of Zoology*, 100(6), 389-400.
- Clark, P., Boardman, W. S. y Raidal, S. R. (2009).** Atlas of Clinical Avian Hematology. *John Wiley & Sons*, 200.
- Clark, N. J., Adlard, R. D. y Clegg, S. M. (2015).** Molecular and morphological characterization of *Haemoproteus (Parahaemoproteus) ptilotis*, a parasite infecting Australian honeyeaters (Meliphagidae), with remarks on prevalence and potential cryptic speciation. *Parasitology Research*, 114, 1921–1928.
- Davis, A. K. (2005).** Effect of handling time and repeated sampling on avian white blood cell counts. *Journal Field Ornithology* 76(4). 334–338.
- Dickens, M. y Romero, L. M. (2010).** Stress responsiveness decrease with age in precocial, juvenile chukar. *The Wilson Journal of Ornithology* 122, 762–766.
- Dugas, M. B. y Border, S. E. (2021).** Effects of a novel ectoparasite on condition and mouth coloration of nestling barn swallows. *Biological Journal of the Linnean Society*, 135, 52-61.
- Fitzgerald, M., Lynch, S. A. y Jessopp, M. (2022).** Breeding stage impacts on chronic stress and physiological condition in northern gannets (*Morus bassanus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 274.
- Foo, Y. Z., Nakagawa, S., Rhodes. G. y Simmons, L. W. (2016).** The effects of sex hormones on immune function: a meta-analysis. *Biological Reviews* 92, 551–571.

-Fletcher, K., Träff, J. y Gustafsson, L. (2019). Importance of infection of haemosporidia blood parasites during different life history stages for long-term reproductive fitness of collared flycatchers. *Journal of Avian Biology*, 50(8).

-Gelman, A. (2008). Scaling regression inputs by dividing by two standard deviations. *Statistics in Medicine*, 27, 2865-2873.

-Grilli, M. G., Pari, M. e Ibáñez, A. (2018). Poor body conditions during the breeding period in a seabird population with low breeding success. *Marine Biology*, 165(9), 142.

-Grzędzicka, E. (2017). Immune challenge of female great tits at nests affects provisioning and body conditions of their offspring. *acta ethologica*, 20, 223-233.

-Hanssen, S. A., Hasselquist, D., Folstad, I. y Erikstad, K. E. (2005). Cost of reproduction in a long-lived bird: Incubation effort reduces immune function and future reproduction. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 272, 1039–1046.

-Hasselquist, D. (2007). Comparative immunoecology in birds: Hypotheses and tests. *Journal of Ornithology*, 148, 571–582.

-Hõrak, P., Ots, I. y Murumägi, A. (1998). Haematological health state indices of reproducing Great Tits: a response to brood size manipulation. *Functional Ecology* 12, 700-707.

-Ilmonen, P., Hasselquist, D., Langefors, Å. y Wiehn, J. (2003). Stress, immunocompetence and leukocyte profiles of pied flycatchers in relation to brood size manipulation. *Oecologia*, 136, 148-154.

-Jakubas, D., Wojczulanis-Jakubas, K. y Kulaszewicz, I. (2013). Factors affecting haematological variables and body mass of reed warblers (*Acrocephalus*

scirpaceus) and sedge warblers (*A. schoenobaenus*). *Annales Zoologici Fennici*, 50, 146-157.

-Jiménez-Peñuela, J., Ferraguti, M., Martínez-de la Puente, J., Soriguer, R. y Figuerola, J. (2019). Urbanization and blood parasite infections affect the body condition of wild birds. *Science of the Total Environment*, 651, 3015-3022.

-Johnstone, C. P., Reina, R. D. y Lill, A. (2012). Interpreting indices of physiological stress in free-living vertebrates. *Journal of Comparative Physiology B*, 182(7), 861–879.

-Losdat, S., Arcese, P., Sampson, L., Villar, N. y Reid, J. M. (2016). Additive genetic variance and effects of inbreeding, sex and age on heterophil to lymphocyte ratio in song sparrows. *Functional Ecology*, 30, 1185-1195.

-Lüdtke, B., Moser, I., Santiago-Alarcon, D., Fischer, M., Kalko, E. K. V., Schaefer, H. M., Suarez-Rubio, M., Tschapka, M. y Renner, S. C. (2013). Associations of Forest Type, Parasitism and Body Condition of Two European Passerines, *Fringilla coelebs* and *Sylvia atricapilla*. *PLoS ONE*, 8(12).

-Machado-Filho, R. A. N., Balsamão, G. M. y Marini, M. Â. (2010). Seasonal differences in immune profiles and body conditions of migratory and permanente resident neotropical flycatchers. *The Condor*, 112(3), 579-590.

-Meza-Montes, E., Fernández-Gómez, R. A., Llanes-Quevedo, A., Navarro-Sigüenza, A. G., Santiago-Alarcon, D. y Sosa-López, J. R. (2023). Vocal behaviour, parasitic infection, chronic stress and body condition in rufous-naped wrens (*Campylorhynchus rufinucha*). *Ibis*, 165, 676-684.

-**Minias, P., Włodarczyk, R. y Meissner, W. (2017)**. Leukocyte profiles are associated with longevity and survival, but not migratory effort: A comparative análisis of shorebirds. *Functional Ecology*, 32(2), 369-378.

-**Minias, P. (2018)**. Evolution of heterophil/lymphocyte ratios in response to ecological and life-history traits: A comparative análisis across the avian tree of life. *Journal of Animal Ecology*, 88, 554-565.

-**Montolio, S. A., López, R. M., Cray, C., González, S. L., Francisco, O. N., Sánchez, I. M., Casas-Díaz, E. y Valera, R. C. (2017)**. Hematologic reference intervals and age effect in European Strigiformes. *Veterinary Clinical Pathology* 46(3), 483–495.

-**Møller, A. P. y Erritzøe, J. (1998)**. Host immune defence and migration in birds. *Evolutionary Ecology*, 12(8), 945–953.

-**Møller, A. P. (1987)**. Advantages and disadvantages of coloniality in the swallow, *Hirundo rustica*. *Animal Behaviour*, 35, 819-832.

-**Møller, A. P. y Erritzøe, J. (2002)**. Coevolution of host immune defence and parasite-induced mortality: relative spleen size and mortality in altricial birds. *Oikos*, 99, 95-100.

-**Norris, K. y Evans, M. R. (2000)**. Ecological immunology: life history trade-offs and immune defense in birds. *Behavioral Ecology*, 11(1), 19-26.

-**Owen, J. C. y Moore, F. R. (2006)**. Seasonal differences in immunological condition of three species of thrushes. *The Condor*, 108, 389-398.

-**Palacios, M. J., Cunnick, J. E., Winkler, D. W. y Vleck, C. M. (2007)**. Immunosenescence in some but not all immune components in a free-living vertebrate, the tree swallow. *Proceedings of The Royal Society* 274, 951-957.

-Palacios, M. J., Valera, F., Colominas-Ciuró, R. y Barbosa, A. (2017). Cellular and humoral immunity in two highly demanding energetic life stages: reproduction and moulting in the Chinstrap Penguin. *Journal of Ornithology*, 159, 283-290.

-Pap, P. y Markus, R. (2003). Cost of reproduction, T-lymphocyte mediated immunocompetence and health status in female and nestling Barn Swallows *Hirundo rustica*. *Journal of Avian Biology*, 34, 428-434.

-Ribeiro, P. V. A., Baesse, C. Q., Cury, M. C. y de Melo, C. (2020). Leukocyte profile of the helmeted manakin, *Antilophia galeata* (Passeriformes: Pipridae) in a Cerrado forest fragment. *Zoologia An International Journal for Zoology*, 37.

-Romano, A., Nodari, R., Bandi, C., Caprioli, M., Costanzo, A., Ambrosini, R., Rubolini, D., Parolini, M., Epis, S. y Saino, N. (2018). Haemosporidian parasites depress breeding success and plumage coloration in female barn swallows (*Hirundo rustica*). *Journal of Avian Biology*, 50(2).

-RStudio Team. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, 4.2.2.
<https://posit.co/>.

-Roved, J., Westerdahl, H. y Hasselquist. D. (2017). Sex differences in immune responses: hormonal effects, antagonistic selection, and evolutionary consequences. *Hormones and Behavior* 88, 95–105.

-Saino, N., Calza, S. y Møller, A. P. (1997). Immunocompetence of nestling barn swallows in relation to brood size and parental effort. *British Ecological Society*, 66(6), 827-836.

-Saino, N., Martinelli, R. y Møller, A. P. (2001). Immunoglobulin plasma concentration in relation to egg laying and mate ornamentation of female barn swallows (*Hirundo rustica*). *Journal of Evolutionary Biology*, 14, 95-109.

-Saino, N., Incagli, M., Martinelli, R. y Møller, A. P. (2002). Immune response of male barn swallows in relation to parental effort, corticosterone plasma levels, and sexual ornamentation. *Behavioral Ecology*, 13, 169–174.

-Samour, J. (2011). Diagnostic Value of Hematology. En G.J. Harrison y T.L. Lightfoot (Eds.), *Clinical Avian Medicine*, 2, 587-609. *Spix Publishing, Inc.*

-Schmidt, E. MS., Paulillo, A. C., Santin, E., Dittrich, R. L. y De Oliveira, E. G. (2007). Hematological and serum chemistry values for the ringnecked pheasant (*Phasianus colchicus*): variation with sex and age. *International Journal Poultry Science* 6,137–139.

-Thomson, D. L., Monaghan, P. A. T. y Furness, R. W. (1998). The demands of incubation and avian clutch size. *Biological Reviews*, 73(3), 293-304.

-Ushine, N., Kurata, O., Tanaka, Y., Sato, T., Kurahashi, Y. y Hayama, S. (2020). The effects of migration on the immunity of Black-Headed Gulls (*Chroicocephalus ridibundus*: Laridae). *The Journal of Veterinary Medical Science*, 82(11), 1619-1626.

-van Dijk, J. G. B., Fouchier, R. A. M., Klaassen, M. y Matson, K. D. (2015). Minor differences in body condition and immune status between avian influenza virus-infected and noninfected mallards: a sign of coevolution? *Ecology and Evolution*, 5(2), 436-449.

-**Valkiūnas, G. (2004)**. Avian malaria parasites and other haemosporidia. *CRC Press*, 946.

-**Valkiūnas, G., Iezhova, T.A., Loiseau, C. y Sehgal, R. N. M. (2009)**. Nested cytochrome b polymerase chain reaction diagnostics detect sporozoites of haemosporidian parasites in peripheral blood of naturally infected birds. *Journal of Parasitology*. 95, 1512–1515.

-**van Valen, L. (1973)**. A new evolutionary law. *Evolutionary Theory*, 1, 1-30.

-**Velando, A., Drummond, H. y Torres, R. (2006)**. Senescent birds redouble reproductive effort when ill: confirmation of the terminal investment hypothesis. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 273, 1443–1448.

-**Venables, W. N. y Ripley, B. D. (2002)**. Modern Applied Statistics with S, Fourth edition. *Springer, New York*. ISBN 0-387-95457-0, <https://www.stats.ox.ac.uk/pub/MASS4/>.

-**Hellgren, O., Waldenström, J. y Bensch, J. (2004)**. A new PCR assay for simultaneous studies of Leucocytozoon, Plasmodium, and Haemoproteus from avian blood. *Journal of Parasitology* 90(4), 797-802.

-**Williams, G. C. (1966)**. Natural selection, the costs of reproduction, and a refinement of Lack's principle. *American Naturalist*, 100, 687–690.

-**Włodarczyk, R., Podlasczuk, P., Kaczmarek, K., Janiszewski, T. y Minias, P. (2018)**. Leukocyte profiles indicate nutritional, but not moulting stress in a migratory shorebird, the Common Snipe (*Gallinago gallinago*). *Journal of Ornithology*, 159, 345-354.