

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Facultad de Ciencias

Grado en Biología

Trabajo Fin de Grado

¿Influye la edad, sexo o hábitat de cría en la infección por malaria aviar del papamoscas cerrojillo?

Código del TFG: **BL20-76-BEF**

Tipología: **Trabajo de iniciación a la investigación**

Autora: Cristina Camacho Rodríguez



02/07/2021

Índice general

Índice de ilustraciones.....	2
Índice de tablas.....	2
RESUMEN	3
ABSTRACT	3
CONCLUSIONS.....	4
INTRODUCCIÓN	4
OBJETIVOS	6
MATERIALES Y MÉTODOS	7
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
CONCLUSIONES.....	16
BIBLIOGRAFÍA	16
ANEXO I: ANÁLISIS EXPLORATORIOS.....	22
ANEXO II: MODELOS DE DIAGNÓSTICO.....	23

Índice de ilustraciones

GRÁFICA 1	13
GRÁFICA 2	15
GRÁFICA A.1 (anexo I)	22
GRÁFICA A.2 (anexo I)	23
GRÁFICA A.3 (anexo I)	23
GRÁFICA A.4 (anexo II)	24

Índice de tablas

TABLA 1	9
TABLA 2	12
TABLA 3	14
TABLA 4	14
TABLA 5	15
TABLA A.1 (anexo I)	22

RESUMEN

Los parásitos de la malaria aviar, *Haemoproteus*, *Plasmodium* y *Leucocytozoon*, son comunes en aves, y tienen consecuencias negativas en la eficacia biológica de los individuos. Este trabajo se centra en los factores individuales y ambientales que influyen en la probabilidad de infección de esta enfermedad en el papamoscas cerrojillo (*Ficedula hypoleuca*), un pequeño ave paseriforme, migrador de larga distancia. Para ello, se tomaron más de 900 muestras de sangre durante 10 años (desde 2005 hasta 2014) de una población de papamoscas que cría en dos hábitats muy diferenciados, un robledal natural y un pinar manejado, cerca de Madrid. Encontramos que, la probabilidad de infección aumentó con la edad, y no se vio afectada por otro tipo de características individuales (sexo, peso y fecha de puesta) ni ambientales (año, hábitat de cría, temperatura y precipitación). Nuestro trabajo enfatiza que, para entender las interacciones entre el huésped y el parásito, es esencial comprender los determinantes individuales y ambientales del parasitismo.

Palabras clave: malaria aviar; sexo del huésped; edad; hábitat del huésped; *Ficedula hypoleuca*.

ABSTRACT

Avian malaria parasites, *Haemoproteus*, *Plasmodium* and *Leucocytozoon*, are common in birds and have negative consequences on individual fitness. This work focuses on the individual and population factors that influence the prevalence of the avian malaria in the pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*), a small migratory passerine. To this end, more than 900 blood samples were collected during 10 years (from 2005 to 2014) from a pied flycatcher population breeding in two contrasting habitats, a natural oak woodland and a managed pine forest, near Madrid. We found that the probability of infection increased with the age, but was not affected by other individual traits (sex, weight and laying date). At the population level, however, none of the variables analyzed (year, breeding habitat, temperature and precipitation) were related to malaria prevalence in the population. We emphasize that to understand host-parasite interactions, it is essential to understand both the individual and environmental determinants of parasitism.

CONCLUSIONS

The study population of pied flycatcher had a high prevalence of avian malaria (40.35%). We found that, at individual level, the probability infection was not related to either sex or weight. In contrast, the probability of malaria infection increased with age, which is consistent with predictions based on previous studies. At the population level, initial analyses suggested that prevalence increased over the study period. However, further examination indicated that this results was actually a statistical artefact. All other population variables were not related to malaria prevalence. We emphasize that to understand host-parasite interactions, it is essential to understand both the individual and environmental determinants of parasitism.

Keywords: avian malaria; host sex; age-related; host habitat; *Ficedula hypoleuca*.

INTRODUCCIÓN

Numerosos estudios sobre las interacciones huésped-parásito han demostrado que los parásitos pueden tener efectos importantes en la reproducción y supervivencia del huésped, con el consecuente impacto en la dinámica poblacional de este último (Marzal et al. 2005). Sin embargo, el grado de severidad de estos impactos varía según las características del huésped, del parásito y del ambiente (Paquette et al. 2020). Por tanto, para comprender las interacciones entre huésped y parásito es esencial entender primero los determinantes individuales y ambientales del parasitismo (Paquette et al. 2020).

Los parásitos de la malaria aviar, al igual que la malaria humana, son protozoos pertenecientes al orden Haemosporidia, y, entre los géneros más comunes se encuentran *Plasmodium*, *Haemoproteus* y *Leucocytozoon* (Carter T. Atkinson, Thomas, and Hunter 2008). Necesitan de la ayuda de vectores, en este caso, dípteros hematófagos, para poder ser transmitidos y así completar su ciclo de vida (Ishtiaq et al. 2008). Afectan principalmente a los glóbulos rojos de las aves y se caracterizan por provocar graves síntomas en los individuos afectados, como son la anemia, letargo, anorexia, y plumas encrespadas (Carter T. Atkinson, Thomas, and Hunter 2008; C. T. Atkinson and Van Riper 1991). Estos síntomas pueden producir un importante declive en la salud del individuo infectado, y con frecuencia, la muerte. De hecho, existen evidencias de que, aproximadamente una semana después del contagio, empieza a deteriorarse la condición física debido a que disminuye el consumo de alimento, lo

que aumenta significativamente la mortalidad (Carter T. Atkinson, Thomas, and Hunter 2008). Los individuos que consiguen superar este período adquieren una infección crónica de baja-mediana intensidad, gracias a la acción del sistema inmune (Atkinson, C. T. 1995).

Son varios los factores que pueden afectar a la prevalencia de los parásitos de la malaria aviar en la población. La prevalencia de malaria puede fluctuar en el tiempo y espacio, debido a la densidad de la población de huéspedes y la variación de abundancia de parásitos a través del tiempo (Arneberg et al. 1998). Esta también puede verse modificada a causa de factores ambientales, tales como la contaminación, las alteraciones de hábitat y especies introducidas (Lafferty and Kuris 1999). Las condiciones climáticas como la temperatura o la humedad pueden jugar también un papel clave en la prevalencia ambiental de los parásitos de la malaria, ya que los vectores presentan requerimientos climáticos específicos para completar su ciclo de vida (por ejemplo, necesitan una temperatura determinada; Lapointe, Goff, and Atkinson 2010). Asimismo, otras características ambientales y especie-específicas como son el área de distribución, el tamaño poblacional o tamaño de la nidada, también pueden afectar a la prevalencia de parásitos de malaria aviar (Arneberg et al. 1998).

Además del ambiente, las características individuales pueden determinar la susceptibilidad y severidad de la parasitación. Así, las diferencias existentes en el sexo, edad, condición corporal o comportamiento pueden interferir en la susceptibilidad de la infección por malaria o en la supervivencia a la misma (McCurdy et al. 1998). Por ejemplo, estudios previos determinan que, en machos, la testosterona puede provocar efectos inmunosupresores (Schuurs and Verheul 1990), mientras que en hembras, el esfuerzo reproductivo de producir y/o incubar los huevos, tiene un efecto similar (McCurdy et al. 1998). Se hallan evidencias de un aumento de probabilidad de infección de malaria aviar con la edad (Carter T. Atkinson et al. 2005; Carter T. Atkinson and Samuel 2010), sin embargo también otros han demostrado que no existen diferencias, como es el caso de Garvin, Szell, & Moore, (2006), donde no encontraron diferencias de probabilidad de infección por edad o sexo, pero hallaron que los individuos con menor porcentaje de grasa corporal tenían más probabilidad de infección por malaria.

Debido a las implicaciones de esta enfermedad, es importante y necesario seguir investigando para conocer en detalle los factores que determinan su éxito y así poder elaborar planes adecuados de gestión para salvaguardar el bienestar de los individuos.

OBJETIVOS

El objetivo principal del trabajo es ampliar nuestro conocimiento sobre los determinantes individuales (por ejemplo, sexo o edad) y ambientales (temperatura, precipitación; ver materiales y métodos) de la prevalencia y probabilidad de infección de malaria aviar. Para ello, se usaron datos de 10 años (desde 2005 hasta 2014), recogidos de una población de papamoscas cerrojillo (*Ficedula hypoleuca*) que lleva siendo monitorizada individualmente desde 1988.

Basado en trabajos previos (Sanz et al. 2001; entre otros: McCurdy et al. 1998; Sehgal 2015), predecimos que: I) La probabilidad de infección será mayor en hembras, debido a la cantidad mayor de recursos respecto al macho que esta invierte en la reproducción (como son la formación de huevos o incubación), lo que la debilita. II) La probabilidad de infección puede aumentar o disminuir con la edad, ya que en otros estudios se obtienen resultados contradictorios, algunos encuentran un aumento de la probabilidad de infección con la edad (Allander and Bennett 1994; Norris, Anwar, and Readt 1994) y otros, una disminución (van Oers et al. 2010; Sol, Jovani, and Torres 2003). III) La cantidad de individuos infectados aumentará con la temperatura y/o precipitación, lo que favorece un hábitat óptimo para la proliferación de los vectores transmisores de hemoparásitos, ya que se ha demostrado que la prevalencia puede variar a escala local (Wood et al. 2007) y en concreto, con el aumento de temperatura y precipitación (Gonzalez-Quevedo, Davies, and Richardson 2014; Jones, Cheviron, and Carling 2013). IV) La prevalencia será mayor en la población de papamoscas cerrojillo del pinar, ya que este es monocultivo manejado, con más deforestación y menos complejidad que el robledal y, previamente se ha demostrado que la deforestación y la actividad antropogénica puede fomentar el aumento de prevalencia de malaria (Yaw A. Afrane, Andrew K. Githeko 2012). V) La prevalencia poblacional aumentará cuanto mayor sea la densidad poblacional, al haber más interacción entre individuos y mayor probabilidad de que los vectores encuentren y piquen a aves.

MATERIALES Y MÉTODOS

ESPECIE DE ESTUDIO

El papamoscas cerrojillo (*Ficedula hypoleuca*) es un paseriforme de pequeño tamaño (entre 11 y 14 gramos de peso) y con gran dimorfismo sexual durante la época de cría, cuando el macho presenta un plumaje negro y blanco, que tras la muda otoñal pasa a ser marrón parecido al de las hembras. Ambos sexos poseen distintivas manchas blancas en la cola y las alas. Es una especie migrante que realiza la invernada en la zona subtropical del oeste de África, y en los períodos reproductivos se establece en Europa occidental, oriental y suroeste de Siberia, predominantemente en bosques húmedos de robles y coníferas donde es muy frecuente encontrar agujeros naturales en los troncos de los árboles (Lundberg y Alatalo 1992).

La época reproductora del papamoscas cerrojillo en la zona de estudio dura desde finales de abril, cuando llegan los primeros machos a las zonas de cría, hasta principios de julio, cuando los últimos volantones abandonan el nido (Lundberg y Alatalo 1992). Esta especie es bastante filopátrica, tiene predilección por las cajas nido para criar y una alta tolerancia a la manipulación por lo que es ampliamente usada como especie modelo en ecología (Potti & Montalvo, 1991).

POBLACIÓN DE ESTUDIO

Los detalles del área de estudio y los protocolos seguidos durante la temporada reproductora están ampliamente descritos en (Camacho, 2018; Jaime Potti, Camacho, Canal, & Martínez-Padilla, 2018). De forma resumida, el área de estudio (ca. 41°4'42" N, 3°25'55" W, 1200-1300m a.s.l.) consta de dos zonas: en primer lugar, un robledal (*Quercus pyrenaica*) localizado en La Hiruela y, un pinar (*Pinus sylvestris*) en la localidad de Colmenar de la Sierra. El pinar cuenta con 81 cajas nido y el robledal consta de 156, que han sido monitorizadas desde su instalación en 1984 y 1988 respectivamente (Camacho, 2018).

El pinar y el robledal del área de estudio se diferencian en la estructura y composición de la vegetación además de en la diversidad de invertebrados. (Camacho, 2018). Ambas zonas están separadas por una franja de 1 km de ancho, constituido por hábitat inadecuado para paseriformes que anidan en cavidades.

La zona del robledal, de unas 9,3 hectáreas, estuvo sometida a explotación forestal que cesó hace 50 años aproximadamente. Es un bosque maduro, con una densa cubierta de suelo y sotobosque de árboles jóvenes de melojo (*Quercus pirenaica*), brezo (*Erica arborea*), jara de hoja de laurel (*Cistus laurifolius*) y majuelo (*Crataegus monogyna*) lo que hace que sea una zona con abundantes las orugas, la principal fuente del alimento del papamoscas cerrojillo (Camacho, 2018).

El pinar, de aproximadamente 4,8 hectáreas, se compone por un monocultivo de pino silvestre (*Pinus sylvestris*), y árboles dispersos de ciprés de Arizona (*Cupressus arizonica*) y pino marítimo (*Pinus pinaster*). También hay una cubierta escasa de arbustos de jara de hoja de laurel (*Cistus laurifolius*) y majuelo (*Crataegus monogyna*), que se distribuyen en áreas abiertas. En esta zona, la abundancia de orugas es pequeña en comparación con el robledal. En este caso, los papamoscas alimentan a las crías con arañas, larvas de coleópteros y saltamontes (Camacho, 2018).

Durante la temporada de cría, las cajas nido se revisan cada 1-3 días para saber la fecha de la puesta, número de huevos (generalmente 5-6), fecha de eclosión y número de pollos que vuelan del nido. Machos y hembras reproductoras se capturan dentro de la caja nido durante la incubación (solo hembras) o mientras ceban a los pollos (machos y hembras), cuando estos tienen 8 días de edad, mediante una trampa que se coloca en la caja nido y que se cierra automáticamente al entrar el adulto a cebar (Friedman, Brasso, and Condon 2008).

Tras la captura, los individuos se marcan con una anilla identificativa de código único (individuos no anillados ya previamente), con una combinación única de anillas de colores (solo machos), y se anota el lugar de captura, así como sus rasgos morfológicos. En concreto, se miden longitud del tarso (con una precisión de 0,01 mm), peso (con una precisión de 0,1 g) y edad. La edad de los individuos se estima en base a los rasgos del plumaje (Potti & Montalvo, 1991b) y/o es conocida dada la alta filopatria de los individuos en la población de estudio (Canal, Serrano, and Potti 2014; J. Potti and Montalvo 1991a).

ANÁLISIS GENÉTICOS

Para los análisis genéticos, se tomaron adultos reproductores (no se muestreó a los pollos) que habían criado una o varias veces a lo largo de su vida en la población de estudio (tantas

muestras por individuo como años criaron en la población). En total, se analizaron 922 muestras repartidas a lo largo de 10 años (de media 2,018 veces; rango 1-8 muestras por individuo).

Tabla 1: tamaño muestral según año para machos y hembras

Año	Hembra	Macho
2005	35	21
2006	57	33
2007	61	42
2008	53	48
2009	70	53
2010	56	62
2011	52	57
2012	60	49
2013	32	39
2014	22	21
Total	498	425

Las muestras de sangre se recolectaron de la vena braquial. El ADN de las muestras de sangre se extrajo con el kit de extracción DNeasy Blood & Tissue Kit (Quiagen). Se realizaron reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar una región del gen citocromo b del ADN mitocondrial de los parásitos *Haemoproteus* y *Plasmodium* (Waldenström et al. 2004). En caso de resultado negativo, se repitió la PCR de la muestra hasta tres veces. Una muestra se consideró no infectada cuando todas sus repeticiones tuvieron resultado negativo. Todas las muestras se sexaron previamente a modo de control de calidad del ADN (y evitar así falsos negativos) mediante amplificación de genes CHD del ADN del huésped (Ellegren 1996). Además, en cada placa de PCR se incluyeron controles negativos (ddH₂O) y positivos (muestras de aves con infección confirmada). Los resultados de las PCR obtenidos se visualizaron en geles de agarosa (2%) teñidos con bromuro de etidio. Las muestras con amplificación positiva se secuenciaron por ambos lados directamente utilizando el kit de secuenciación de ciclos BigDye[®] Terminator v3.1 y los productos de las reacciones de secuenciación se procesaron en un ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Las secuencias se editaron y alinearon mediante el uso del programa BioEdit y Geneious v. 5.6.5 y se identificaron por género, clasificándolos como *Haemoproteus* o *Plasmodium* comparando los datos de la secuencia con los de los parásitos identificados previamente en la base MalAvi. (Bensch, Hellgren, and Pérez-Tris 2009).

VARIABLES CLIMÁTICAS

Los datos climáticos fueron tomados de la estación meteorológica de Colmenar Viejo (-40° 39'N 3° 45'W; <https://opendata.aemet.es/centrodedescargas/inicio>), ya que esta cubría las áreas de estudio durante los años que este duró (2005-2014). La estación meteorológica de Colmenar Viejo se sitúa a 50 kilómetros del área de estudio. Antiguamente, había otra estación meteorológica más cercana, a 15 kilómetros, pero cerró en 1997. Los datos obtenidos de las variables medidas en ambas estaciones meteorológicas durante el periodo que ambas estuvieron activas están correlacionados (datos sin publicar), validando así el uso de los datos de la estación meteorológica de Colmenar Viejo.

Se calcularon como variables climáticas la temperatura y precipitación máximas y mínimas de los meses de mayo y junio, y también los valores medios correspondientes a toda la temporada de cría (abril-junio; en adelante considerada como “primavera”), durante cada año que duró el estudio.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

ANÁLISIS EXPLORATORIOS A NIVEL GENERAL

En primer lugar, se realizaron análisis exploratorios a nivel general (ej. histogramas y diagramas de dispersión) para ver el patrón de las variables y detectar posibles errores y datos influyentes. Posteriormente, se utilizó una base de datos en la que cada individuo aparecía una única vez para explorar posibles correlaciones entre las variables de estudio. Esta base se obtuvo a partir de la base madre (donde cada individuo aparece repetidamente; tantas veces como veces crió a lo largo de su vida), que se ordenó aleatoriamente con el programa Excel para quitar los datos (anillas) duplicados de forma aleatoria respecto al año de muestreo y edad. Tras ello se hicieron correlaciones a nivel individual (Gráficas A.1, A.2 y A.3, ver anexo I), además, se vio la correlación entre las variables climáticas.

MODELO 1: ANÁLISIS A NIVEL INDIVIDUAL

Se realizó un modelo generalizado lineal mixto (GLMM) para comprobar si la infección depende de la calidad del individuo. En este modelo se incluyó como variable dependiente el estado de infección (sí/no; distribución binomial), y como variables independientes sexo, edad

y peso del individuo. Edad y peso se incluyeron como indicadores de calidad individual (Canal et al., 2021; J. Potti & Montalvo, 1991b; y sus referencias). La identidad de los individuos (anilla) se introdujo como factor random ya que muchos de los individuos analizados aparecen repetidamente en la base de datos.

MODELO 2: ANÁLISIS A NIVEL POBLACIONAL

Para analizar si la prevalencia de infección varió en la población a lo largo de los años de estudio en función de las condiciones climáticas se utilizó un GLMM (distribución binomial). En este modelo, la variable respuesta bivariada fue una matriz de dos columnas formadas por el número total de individuos infectados y el número total de individuos sanos en la población, realizada con la función `Cbind` (ver abajo). Como variables independientes se consideraron las variables año, media de la temperatura de mayo, media de la precipitación de mayo. El resto de variables climáticas disponibles no se consideraron en el modelo al estar altamente relacionadas entre ellas (ver Gráfica A.2 y A.3, anexo I).

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa Rstudio (4.0.3). Antes de correr los GLMMs se hicieron análisis exploratorios a nivel general (correlaciones y chi-cuadrado; Gráficas A.1, A.2 y A.3, ver anexo I).

Antes de interpretar ningún resultado se comprobó que los modelos no se desviaban de las asunciones de los GLMMs. Así, se analizaron QQplots, existencia de outliers y puntos influyentes. Además, se analizó la colinealidad entre las variables mediante el uso de la herramienta VIF, con ayuda de la librería `car` (Fox and Weisberg 2011). Ninguna de las variables consideradas tuvo $VIF > 2$, indicando ausencia de colinearidad (Loy 2013). Se usó la función `VIF` (paquete `car`) para modelos de diagnóstico (ver Gráfica A.4, anexo II). La librería `DHARMA` (Hartig 2016) se usó para ver el ajuste de los modelos, y `HLMdiag` versión 0.5.0, en conjunto con `Lmer4` para detectar outliers (Loy 2013). Para construir la matriz en el modelo poblacional se usó la función `Cbind`. La librería `ggplot2` se utilizó para graficar los resultados (Wickham 2009). Los modelos GLMMs se corrieron usando el paquete `Lme4` (Bates et al. 2015) y `LmerTest` (Kuznetsova, Brockhoff, and Christensen 2017). La significancia de los efectos fijos se calculó mediante pruebas chi-cuadrado de Wald tipo II con modelos de máxima verosimilitud, y las estimaciones de los parámetros se calcularon usando la máxima verosimilitud restringida (por sus siglas en inglés, RELM), y la significación con modelos de eventos relacionales (REM) (Zuur, Ieno, and Elphick 2010).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar, se calculó la prevalencia de parásitos sanguíneos (ver anexo I, Tabla A.1). Se obtuvo que un 40,35% de los individuos muestreados (n=922) estaban infectados con malaria aviar.

Estudios previos afirman que existen diversos factores que intervienen en la prevalencia de la malaria aviar. Estos, pueden deberse a diferencias individuales (como el sexo, la edad o la condición corporal), diferencias poblacionales (área de distribución, densidad de cría, tamaño de nidada), o a causas ambientales (humedad y/o temperatura) (Marzal et al. 2016; Bichet et al. 2014; Wood et al. 2007).

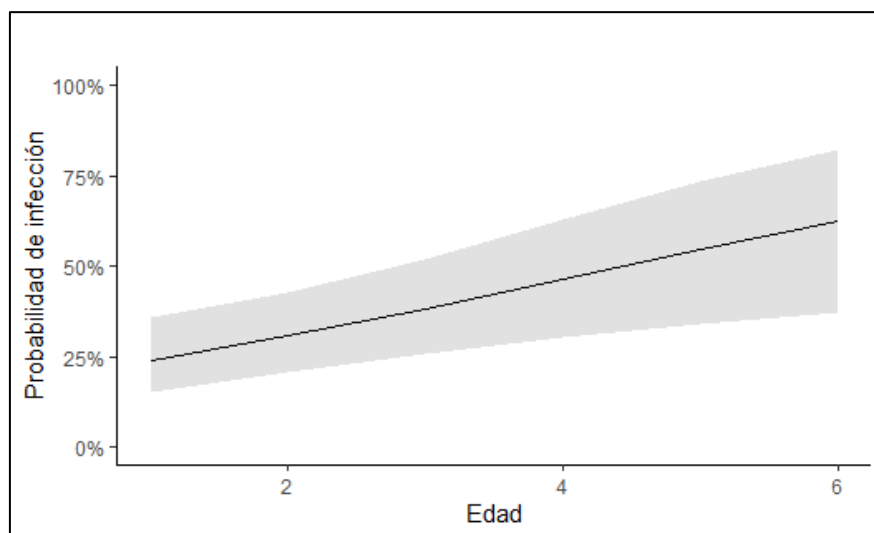
En este trabajo, encontramos, que, a nivel individual, la probabilidad de infección aumenta de manera significativa con la edad de manera similar en ambos sexos, y no varía con otras características individuales como son el peso o la fecha de puesta de huevos (Tabla 2, Gráfico 1).

Tabla 2: resultado del modelo analizando la probabilidad de infección en relación a las características de los individuos. Se obtiene la edad como significativa.

	Estimate	Error estándar	χ^2	Pr(> z)
Intercepto	-3.576	2.797	-	-
Fecha de puesta	0.004	0.014	0.075	0.785
Sexo (macho)	0.567	0.607	0.324	0.569
Edad	0.333	0.114	9.827	0,00172**
Peso	0.15	0.196	0.589	0.443
Sexo(macho): Edad	-0.138	0.165	0.699	0.403

Por un lado, se rechaza la predicción inicial sobre el aumento de la probabilidad de infección en hembras. Esto va en contra de otros estudios que sugieren que la probabilidad de infección por malaria aviar depende del sexo (McCurdy et al. 1998; Sanz et al. 2002; 2001; Atkinson, C. T. 1995), como es el caso del gorrión común (*Passer domesticus*) en Francia, donde se encontró que las hembras sufrían más parasitemia (Bichet et al. 2014) o en McCurdy et al. 1998, donde hallaron, en varias especies de aves, que las hembras tenían mayor probabilidad de ser infectadas. Sin embargo, también podemos encontrar trabajos que fundamentan una mayor probabilidad de infección en machos debido a efectos

comportamentales y hormonales, debido a la inmunosupresión producida por la testosterona (van Oers et al. 2010). Los resultados obtenidos respecto a la edad contrastan con los obtenidos por otros estudios (Sol et al. 2003; van Oers et al. 2010), donde encuentran que la probabilidad de la infección disminuye al aumentar la edad de los individuos. En cambio, nuestros resultados coinciden con las predicciones iniciales y con un grupo mayoritario de estudios (Allander and Bennett 1994; Norris, Anwar, and Readt 1994; Sanz et al. 2001; Carter T. Atkinson et al. 2005) en los que se encuentra que la probabilidad de sufrir malaria aviar aumenta con la edad, como es el caso del avión común (*Delichin urbicum*; Marzal et al. 2016) o del apapane (*Himatione sanguinea*) en Hawaii (Carter T. Atkinson and Samuel 2010), entre otros. Este efecto del aumento de probabilidad de infección con la edad se puede deber a que, al incrementarse los años de vida, los individuos cada vez están más expuestos a los vectores que transmiten la malaria aviar (Greiner and Ellis 1975).



Gráfica 1: Modelo de regresión logístico de la probabilidad de infección según la edad. En gris se representa el intervalo de confianza.

A nivel ambiental, encontramos que la prevalencia aumenta con los años de manera significativa (Tabla 3), pero, no se debe a cambios de temperatura, precipitación, densidad poblacional o hábitat de cría, en contra de lo esperado en las predicciones iniciales.

Tabla 3: resultado del modelo analizando la prevalencia de la infección en relación a las características ambientales. Se utilizan los datos de todos los individuos y se obtiene el año como significativo.

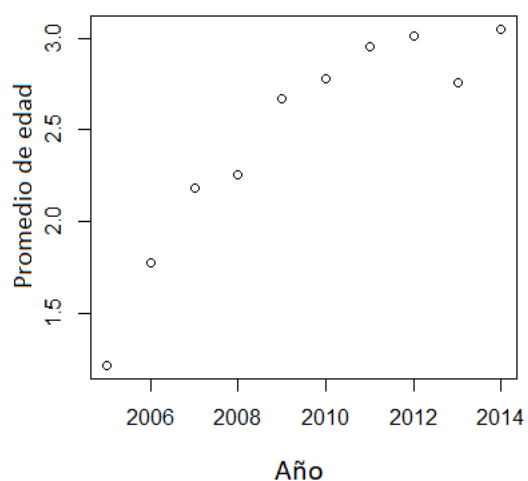
	Estimate	Error estándar	χ^2	Pr(> z)
Intercepto	1.75E+02	5.87E+01	-	-
Año	8.69E-02	2.91E-02	90.424	0,002638 **
Temperatura media de mayo	4.74E-03	4.92E-02	0.0093	0.923211
Precipitación media de mayo	2.66E-03	6.11E-03	0.1899	0.663018
Densidad poblacional	3.88E-04	3.26E-03	0.0142	0.905255

Para descartar que el aumento de prevalencia de malaria a lo largo del periodo de estudio fuera consecuencia de un sesgo creado por individuos muestreados múltiples veces en distintos años (la base de datos utilizada para este trabajo pertenece a un subgrupo de la población de papamoscas cerrojillo, en la que hay individuos que se muestrean repetidamente a lo largo de su vida, y, por consiguiente, la probabilidad de ser infectados aumenta al incrementar su edad) se repitió el modelo anterior, pero usando una base de datos donde cada individuo solo aparecía una única vez (ver materiales y métodos). Al volver a repetir el análisis dejando un único evento reproductivo por individuo, ninguna de las variables consideradas (tampoco año) fue significativa (ver Tabla 4), lo que sugiere que la significación obtenida inicialmente era producto de un *artefacto estadístico*. Para confirmar este hecho, se examinó la edad media del conjunto de los individuos muestreados cada año y se observó que, debido al método de selección de las muestras a analizar (muestrear cada individuo tantas veces como crió), la edad media de los individuos analizados aumentó gradualmente a lo largo del período de estudio (Gráfica 2 y Tabla 5).

Tabla 4: modelo analizando la prevalencia de la infección en relación a las características ambientales. Se utiliza un único evento reproductivo por individuo y la significación en la variable Año obtenida en la Tabla 2 desaparece.

	Estimate	Error estándar	χ^2	Pr(> z)
Intercepto	-69.496	84.230	-	-
Año	0.035	0.042	0.689	0.407
Temperatura media de mayo	-0.063	0.067	0.872	0.351
Precipitación media de mayo	-0.011	0.008	1.790	0.181
Individuos no duplicados	0.013	0.01	1.596	0.206

A la hora de interpretar los resultados de nuestro trabajo, varias consideraciones deben tenerse en cuenta. Existen evidencias de que diferentes cepas haemosporidios que provocan la malaria aviar producen diversos síntomas y pueden diferir en su virulencia (Carter T. Atkinson, Thomas, and Hunter 2008). Asimismo, la prevalencia de estas cepas podría diferir en relación a algunas de las características individuales o ambientales analizadas aquí. Sin embargo, debido a la complejidad analítica, en este trabajo no se han tenido en cuenta las diferencias entre estos microorganismos. Por otro lado, se sabe que en África hay una alta incidencia y transmisión de malaria aviar, pero, sin embargo, también se han encontrado vectores de la enfermedad cerca del área de estudio utilizada para este trabajo (Ferraguti et al. 2013; Martínez-de la Puente et al. 2020). El papamoscas cerrojillo es un ave migratoria que pasa largas temporadas en África, pero se traslada a Europa en la época reproductiva, por tanto, en este trabajo no podemos conocer con exactitud donde ni cuándo se produce la infección en cada individuo.



Gráfica 2: Diagrama de dispersión del promedio de edad de los infectados según el año.

Tabla 5: Media de edad en infectados según año, diferenciados por sexo

Año	Media de edad en infectados	
	Hembras	Machos
2005	1.294	1.095
2006	1.754	1.818
2007	2.213	2.143
2008	2.170	2.354
2009	2.714	2.604
2010	2.768	2.790
2011	3.135	2.789
2012	3.017	3
2013	2.688	2.821
2014	2.818	3.286

Para próximas investigaciones, es interesante indagar más en el origen de la infección, mediante el muestreo a los pollos en sus primeros días de vida, para así obtener más información acerca de las condiciones en las que se producen los contagios y cómo reacciona la enfermedad frente a los distintos parámetros individuales y ambientales, y las variaciones de estos parámetros a escala latitudinal. Esto podría esclarecer la razón de las diferencias, tanto interespecíficas como intraespecíficas, de prevalencia de malaria aviar encontradas en los diversos estudios según el sexo, la edad o el hábitat.

CONCLUSIONES

La población estudiada de papamoscas cerrojillo tiene una alta prevalencia de malaria aviar (40,35%). Encontramos que, a nivel individual, la infección no está relacionada con el sexo o el peso. En cambio, la probabilidad de infección por malaria aumenta con la edad, lo que es consistente con las predicciones basadas en estudios previos. A nivel ambiental, los análisis iniciales sugieren que la prevalencia aumentó que durante el período de estudio. Sin embargo, un examen más detallado indicó que estos resultados eran en realidad un artefacto estadístico. Todas las demás variables de la población no estaban relacionadas con la prevalencia de malaria. Enfatizamos que, para comprender las interacciones huésped-parásito, es esencial conocer los determinantes individuales y ambientales del parasitismo.

BIBLIOGRAFÍA

- Allander, Klas, and Gordon F. Bennett. 1994. "Prevalence and Intensity of Haematozoan Infection in a Population of Great Tits *Parus Major* from Gotland, Sweden." *Journal of Avian Biology* 25 (1): 69. <https://doi.org/10.2307/3677296>.
- Arneberg, P., A. Skorping, B. Grenfell, and A. F. Read. 1998. "Host Densities as Determinants of Abundance in Parasite Communities." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 265 (1403): 1283–89. <https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0431>.
- Atkinson, C. T., K.L. Woods. 1995. "Wildlife Disease and Conservation in Hawaii: Pathogenicity of Avian Malaria (*Plasmodium Relictum*) in Experimentally Infected Iiwi (*Vestiaria Coccinea*)." *Parasitology* 111 (S1): S59–69. <https://doi.org/10.1017/S003118200007582X>.
- Atkinson, C. T., and C. Van Riper. 1991. "Pathogenicity and Epizootiology of Avian Haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon*, and *Haemoproteus*." *Bird-Parasite Interactions*, no. January: 19–48.
- Atkinson, Carter T., Julie K. Lease, Robert J. Dusek, and Michael D. Samuel. 2005. "Prevalence of Pox-like Lesions and Malaria in Forest Bird Communities on Leeward Mauna Loa Volcano, Hawaii." *Condor* 107 (3): 537–46. [https://doi.org/10.1650/0010-5422\(2005\)107\[0537:POPLAM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1650/0010-5422(2005)107[0537:POPLAM]2.0.CO;2).
- Atkinson, Carter T., and Michael D. Samuel. 2010. "Avian Malaria *Plasmodium Relictum* in

- Native Hawaiian Forest Birds: Epizootiology and Demographic Impacts on *Āpapane Himatione Sanguinea*.” *Journal of Avian Biology* 41 (4): 357–66. <https://doi.org/10.1111/j.1600-048X.2009.04915.x>.
- Atkinson, Carter T., Nancy J. Thomas, and D. Bruce Hunter. 2008. *Parasitic Diseases of Wild Birds*. *Parasitic Diseases of Wild Birds*. <https://doi.org/10.1002/9780813804620.ch5>.
- Bates, Douglas, Martin Mächler, Benjamin M. Bolker, and Steven C. Walker. 2015. “Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4.” *Journal of Statistical Software* 67 (1). <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>.
- Bensch, Staffan, Olof Hellgren, and Javier Pérez-Tris. 2009. “MalAvi: A Public Database of Malaria Parasites and Related Haemosporidians in Avian Hosts Based on Mitochondrial Cytochrome b Lineages.” *Molecular Ecology Resources* 9 (5): 1353–58. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02692.x>.
- Bichet, Coraline, Gabriele Sorci, Alexandre Robert, Romain Julliard, Ádám Z. Lendvai, Olivier Chastel, Stephane Garnier, and Claire Loiseau. 2014. “Epidemiology of Plasmodium Relictum Infection in the House Sparrow.” *Journal of Parasitology* 100 (1): 59–65. <https://doi.org/10.1645/12-24.1>.
- Camacho, Carlos. 2017. “Fine-Scale Population Differentiation: Ecological and Evolutionary Mechanisms Involved,” 159.
- Canal, David, Lotte Schlicht, Simone Santoro, Carlos Camacho, Jesús Martínez-Padilla, and Jaime Potti. 2021. “Phenology-Mediated Effects of Phenotype on the Probability of Social Polygyny and Its Fitness Consequences in a Migratory Passerine.” *BMC Ecology and Evolution* 21 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12862-021-01786-w>.
- Canal, David, David Serrano, and Jaime Potti. 2014. “Exploring Heterozygosity-Survival Correlations in a Wild Songbird Population: Contrasting Effects between Juvenile and Adult Stages.” *PLoS ONE* 9 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105020>.
- Ellegren, H. 1996. “First Gene on the Avian W Chromosome (CHD) Provides a Tag for Universal Sexing of Non-Ratite Birds.” *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 263 (1377): 1635–41. <https://doi.org/10.1098/rspb.1996.0239>.
- Ferraguti, Martina, Josué Martínez-de la Puente, Joaquín Muñoz, David Roiz, Santiago Ruiz, Ramón Soriguer, and Jordi Figuerola. 2013. “Avian Plasmodium in Culex and Ochlerotatus

- Mosquitoes from Southern Spain: Effects of Season and Host-Feeding Source on Parasite Dynamics." *PLoS ONE* 8 (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066237>.
- Fox, J., and J Weisberg. 2011. "A Review of: ' An R Companion to Applied Regression , Second Edition, by J. Fox and S. Weisberg.'" *Journal of Biopharmaceutical Statistics* 22 (2): 418–19. <https://doi.org/10.1080/10543406.2012.635980>.
- Friedman, Scott L., Rebecka L. Brasso, and Anne M. Condon. 2008. "An Improved, Simple Nest-Box Trap." *Journal of Field Ornithology* 79 (1): 99–101. <https://doi.org/10.1111/j.1557-9263.2008.00150.x>.
- Garvin, Mary C., Christopher C. Szell, and Frank R. Moore. 2006. "Blood Parasites of Nearctic-Neotropical Migrant Passerine Birds during Spring Trans-Gulf Migration: Impact on Host Body Condition." *Journal of Parasitology* 92 (5): 990–96. <https://doi.org/10.1645/GE-758R.1>.
- Gonzalez-Quevedo, Catalina, Richard G. Davies, and David S. Richardson. 2014. "Predictors of Malaria Infection in a Wild Bird Population: Landscape-Level Analyses Reveal Climatic and Anthropogenic Factors." *Journal of Animal Ecology* 83 (5): 1091–1102. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12214>.
- Greiner, Author, and C Ellis. 1975. "Haemoproteus IN NEBRASKA MOURNING DOVES 1" 11 (2): 150–56.
- Hartig, F. 2016. "DHARMA: Residual Diagnostics for Hierarchical (Multi-Level/Mixed) Regression Models. R Package. 2016."
- Ishtiaq, F., L. Guillaumot, S. M. Clegg, A. B. Phillimore, R. A. Black, I. P.F. Owens, N. I. Mundy, and B. C. Sheldon. 2008. "Avian Haematozoan Parasites and Their Associations with Mosquitoes across Southwest Pacific Islands." *Molecular Ecology* 17 (20): 4545–55. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03935.x>.
- Jones, M. R., Z. A. Cheviron, and M. D. Carling. 2013. "Spatial Patterns of Avian Malaria Prevalence in *Zonotrichia Capensis* on the Western Slope of the Peruvian Andes." *Journal of Parasitology* 99 (5): 903–5. <https://doi.org/10.1645/12-147.1>.
- Kuznetsova, Alexandra, Per B. Brockhoff, and Rune H. B. Christensen. 2017. "LmerTest Package: Tests in Linear Mixed Effects Models ." *Journal of Statistical Software* 82 (13). <https://doi.org/10.18637/jss.v082.i13>.

- Lafferty, Kevin D., and Armand M. Kuris. 1999. "How Environmental Stress Affects the Impacts of Parasites." *Limnology and Oceanography* 44 (3 II): 925–31. https://doi.org/10.4319/lo.1999.44.3_part_2.0925.
- Lapointe, Dennis A., M. Lee Goff, and Carter T. Atkinson. 2010. "Thermal Constraints to the Sporogonic Development and Altitudinal Distribution of Avian Malaria Plasmodium Relictum in Hawai'i." *Journal of Parasitology* 96 (2): 318–24. <https://doi.org/10.1645/GE-2290.1>.
- Loy, Adam. 2013. "Diagnostics for Mixed Linear Models." *Race*.
- Martínez-de la Puente, Josué, Ramón Soriguer, Juan Carlos Senar, Jordi Figuerola, Rubén Bueno-Mari, and Tomás Montalvo. 2020. "Mosquitoes in an Urban Zoo: Identification of Blood Meals, Flight Distances of Engorged Females, and Avian Malaria Infections." *Frontiers in Veterinary Science* 7 (August): 10–15. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00460>.
- Marzal, Alfonso, Javier Balbontín, Maribel Reviriego, Luz García-Longoria, Carmen Relinque, Ignacio G. Hermosell, Sergio Magallanes, Cosme López-Calderón, Florentino de Lope, and Anders Pape Møller. 2016. "A Longitudinal Study of Age-Related Changes in Haemoproteus Infection in a Passerine Bird." *Oikos* 125 (8): 1092–99. <https://doi.org/10.1111/oik.02778>.
- Marzal, Alfonso, Florentino De Lope, Carlos Navarro, and Anders Pape Møller. 2005. "Malarial Parasites Decrease Reproductive Success: An Experimental Study in a Passerine Bird." *Oecologia* 142 (4): 541–45. <https://doi.org/10.1007/s00442-004-1757-2>.
- McCurdy, Dean G., Dave Shutler, Adele Mullie, and Mark R. Forbes. 1998. "Sex-Biased Parasitism of Avian Hosts: Relations to Blood Parasite Taxon and Mating System." *Oikos* 82 (2): 303. <https://doi.org/10.2307/3546970>.
- Norris, K E N, M Anwar, and Andrew F Readt. 1994. "Reproductive Effort Influences the Prevalence of Haematozoan Parasites in Great Tits Author (s): Ken Norris , M . Anwar and Andrew F . Read Published by : British Ecological Society Stable URL : [Http://Www.Jstor.Org/Stable/5226](http://Www.Jstor.Org/Stable/5226) REFERENCES Linked Referen" *Oikos* 63 (3): 601–10.
- Oers, Kees van, David S. Richardson, Stein A. Sæther, and Jan Komdeur. 2010. "Reduced Blood Parasite Prevalence with Age in the Seychelles Warbler: Selective Mortality or

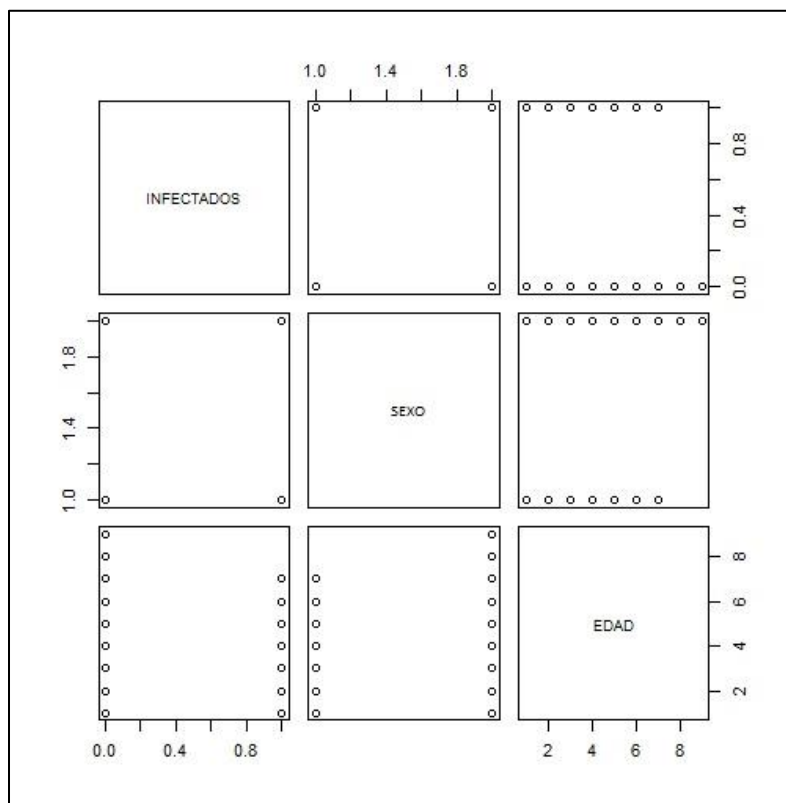
- Suppression of Infection?" *Journal of Ornithology* 151 (1): 69–77.
<https://doi.org/10.1007/s10336-009-0427-x>.
- Paquette, Chelsey, Dany Garant, Jade Savage, Denis Réale, and Patrick Bergeron. 2020. "Individual and Environmental Determinants of Cuterebra Bot Fly Parasitism in the Eastern Chipmunk (*Tamias Striatus*)." *Oecologia* 193 (2): 359–70.
<https://doi.org/10.1007/s00442-020-04685-x>.
- Potti, J., and S. Montalvo. 1991a. "Male Arrival and Female Mate Choice in Pied Flycatchers *Ficedula Hypoleuca* in Central Spain." *Ornis Scandinavica* 22 (1): 45–54.
<https://doi.org/10.2307/3676620>.
- . 1991b. "Return Rate, Age at First Breeding and Natal Dispersal of Pied Flycatchers *Ficedula Hypoleuca* in Central Spain." *Ardea* 79 (3): 419–28.
- Potti, Jaime, Carlos Camacho, David Canal, and Jesús Martínez-Padilla. 2018. "Long-Term Occupancy of Nest Boxes as a Measure of Territory Quality for Pied Flycatchers." *Journal of Field Ornithology* 89 (4): 337–47. <https://doi.org/10.1111/jfo.12266>.
- Sanz, Juan José, Elena Arriero, Juan Moreno, and Santiago Merino. 2001. "Interactions between Hemoparasite Status and Female Age in the Primary Reproductive Output of Pied Flycatchers." *Oecologia* 126 (3): 339–44. <https://doi.org/10.1007/s004420000530>.
- Sanz, Juan José, Juan Moreno, Elena Arriero, and Santiago Merino. 2002. "Reproductive Effort and Blood Parasites of Breeding Pied Flycatchers: The Need to Control for Interannual Variation and Initial Health State." *Oikos* 96 (2): 299–306.
<https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2002.960212.x>.
- Schuurs, A. H.W.M., and H. A.M. Verheul. 1990. "Effects of Gender and Sex Steroids on the Immune Response." *Journal of Steroid Biochemistry* 35 (2): 157–72.
[https://doi.org/10.1016/0022-4731\(90\)90270-3](https://doi.org/10.1016/0022-4731(90)90270-3).
- Sehgal, Ravinder N.M. 2015. "Manifold Habitat Effects on the Prevalence and Diversity of Avian Blood Parasites." *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 4 (3): 421–30. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.09.001>.
- Sol, Daniel, Roger Jovani, and Jordi Torres. 2003. "Parasite Mediated Mortality and Host Immune Response Explain Age-Related Differences in Blood Parasitism in Birds." *Oecologia* 135 (4): 542–47. <https://doi.org/10.1007/s00442-003-1223-6>.

- Waldenström, J., S. Bensch, D. Hasselquist, and Ö Östman. 2004. "A New Nested Polymerase Chain Reaction Method Very Efficient in Detecting Plasmodium and Haemoproteus Infections from Avian Blood." *Journal of Parasitology* 90 (1): 191–94. <https://doi.org/10.1645/GE-3221RN>.
- Wickham, Hadley. 2009. *Elegant Graphics for Data Analysis: Ggplot2. Applied Spatial Data Analysis with R*.
- Wood, Matthew J., Catherine L. Cosgrove, Teddy A. Wilkin, Sarah C.L. Knowles, Karen P. Day, and Ben C. Sheldon. 2007. "Within-Population Variation in Prevalence and Lineage Distribution of Avian Malaria in Blue Tits, *Cyanistes Caeruleus*." *Molecular Ecology* 16 (15): 3263–73. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03362.x>.
- Yaw A. Afrane, Andrew K. Githeko, and Guiyun Yan. 2012. "The Ecology of Anopheles Mosquitoes under Climate Change: Case Studies from the Effects of Environmental Changes in East Africa Highlands." *Bone* 23 (1): 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06432.x>.The.
- Zuur, Alain F., Elena N. Ieno, and Chris S. Elphick. 2010. "A Protocol for Data Exploration to Avoid Common Statistical Problems." *Methods in Ecology and Evolution* 1 (1): 3–14. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210x.2009.00001.x>.

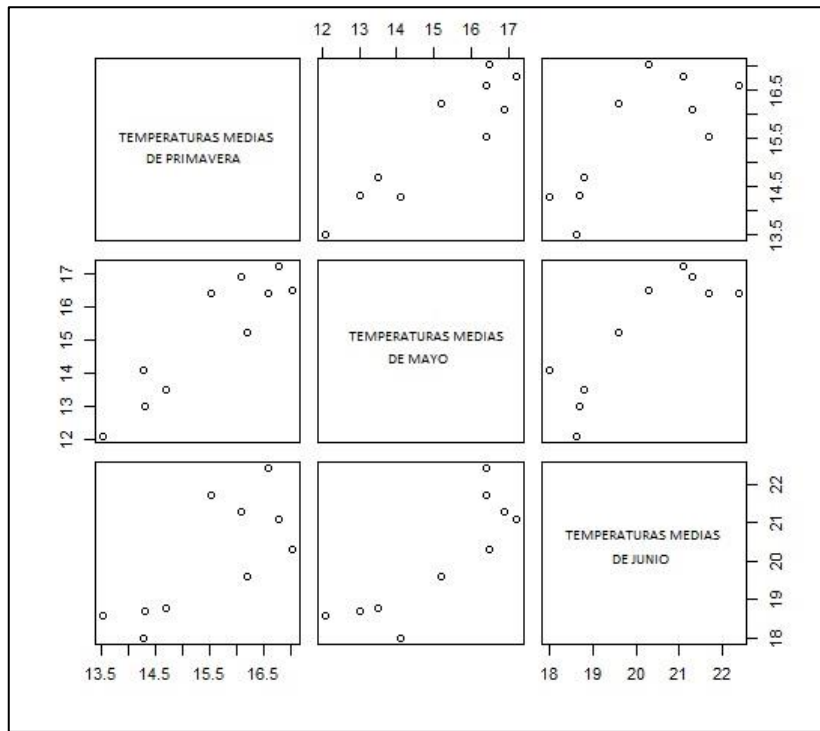
ANEXO I: ANÁLISIS EXPLORATORIOS

PREVALENCIA (%)		
Sexos	Macho	18
	Hembra	22,01
Hábitat	Pinar	16,38
	Robledal	23,97
Edad	Jóvenes	7,7
	Adultos	32,64
Población		40,35

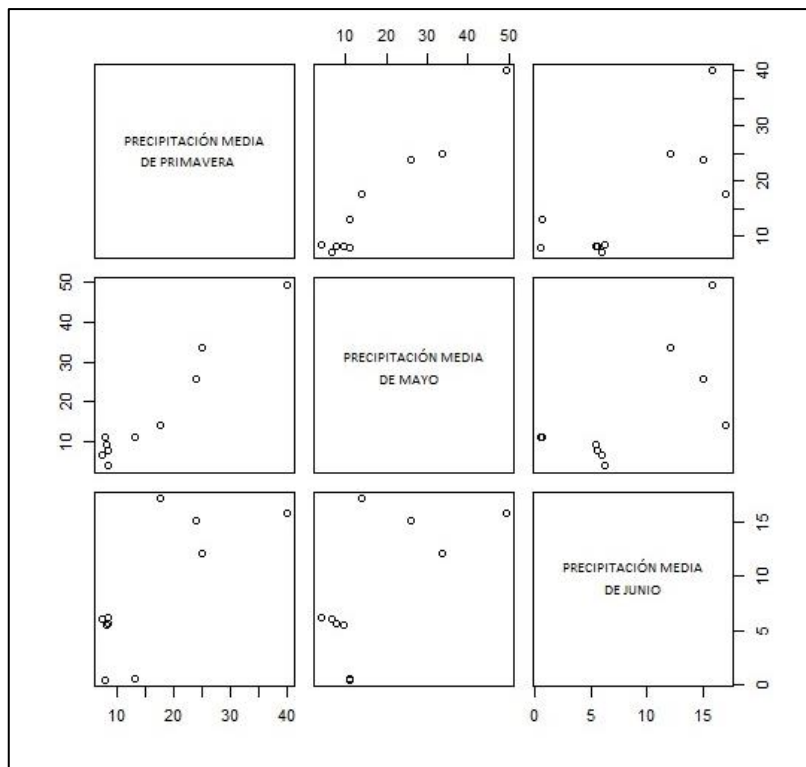
Tabla A.1: Prevalencia calculada según sexo, hábitat y edad. En total un 40% de la población muestreada sufre infección de malaria aviar



Gráfica A.1: Matriz de correlaciones de variables binomiales. Encontramos infectados, sexo y edad.

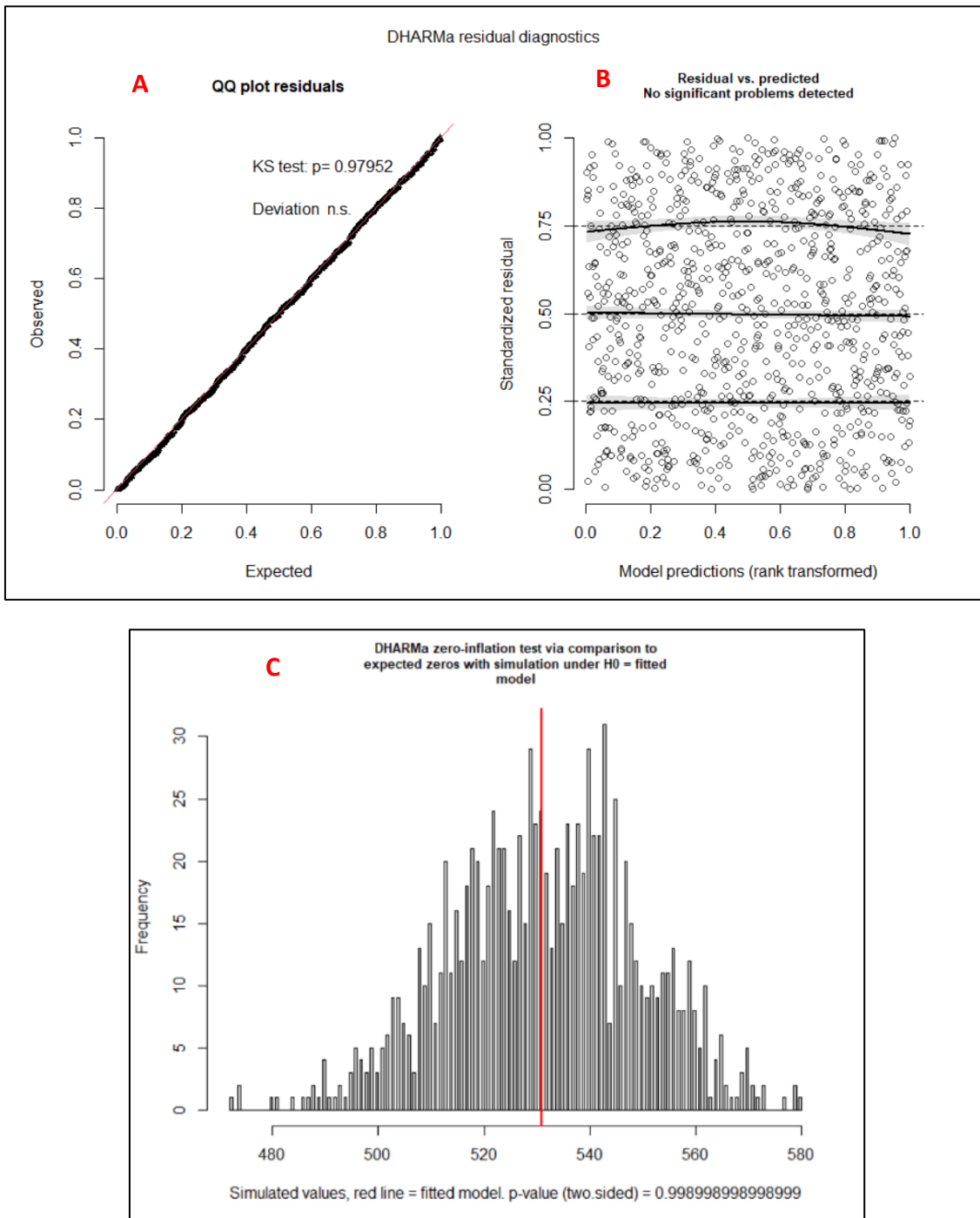


Gráfica A.2: Matriz de correlaciones de las variables correspondientes a la temperatura. Las temperaturas de mayo y junio están altamente correlacionadas. La mayor correlación se obtiene entre la temperatura de mayo y primavera.



Gráfica A.3: Matriz de correlaciones de las variables correspondientes a la precipitación. Las precipitaciones de mayo y junio están altamente correlacionadas. La mayor correlación se obtiene entre la precipitación de mayo y primavera.

ANEXO II: MODELOS DE DIAGNÓSTICO



Gráfica A.4: Modelo de diagnóstico para el modelo GLMM 1. A) Residuos QQ; B) Residuos vs. Valores predichos; C) Test de inflación. El modelo diagnóstico revela que los datos no se desvían de las asunciones.