



El estrés y el sistema inmunológico del gorrión común (*Passer domesticus*) como indicadores ambientales en un gradiente urbano del centro de la península

Javier Pineda Pampliega

Directores: María Teresa Antonio & José Ignacio Aguirre

Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II) y

Departamento de Zoología y Antropología Física

Máster en Biología de la Conservación

Itinerario: Gestión Ecosistémica

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad Complutense de Madrid



RESUMEN

El asentamiento del ser humano sobre un terreno ejerce sobre este un gran efecto, alterando tanto su estructura física como la gran cantidad de relaciones tróficas que previamente existían. El gorrión (*Passer domesticus*) es un ave asociada al ser humano, por ello es tan preocupante el descenso poblacional que está sufriendo esta especie por todo el mundo. Entre los mecanismos adaptativos más importantes se encuentra el sistema inmune; en los últimos años ha comenzado a ganar importancia la Ecoinmunología, disciplina que trata de explicar las variaciones que dicho sistema presenta en función del estado del medio. El objetivo de este trabajo es llevar a cabo la evaluación del sistema inmune para su uso como indicador del estado de distintas poblaciones de gorrión común de zonas más o menos urbanizadas, evaluando asimismo las diferencias en el estado nutricional y en el grado de estrés. Para ello se eligieron 5 zonas de muestreo que siguen un gradiente de urbanización establecido mediante una serie de variables ambientales y el uso de un Análisis de Componentes Principales. En cada uno de los individuos se llevaron a cabo una serie de medidas: para estimar el estado nutricional se evaluó la cantidad de grasa y músculo, así como el hematocrito y la concentración de hemoglobina, albúmina y colesterol. Para estimar el estado del sistema inmune se llevó a cabo un recuento de leucocitos, la cuantificación de las inmunoglobulinas totales y la prueba de la hemólisis-hemaglutinación, indicativa del estado del sistema inmune innato. Finalmente, para estimar el grado de estrés de los individuos se cuantificó la corticosterona en heces (parámetro indicador de estrés a medio plazo) y la relación heterófilos/linfocitos o H/L (parámetro indicador de estrés a largo plazo).

Se han observado variaciones en el estado nutricional, con disminución de la cantidad de colesterol, de hemoglobina y del hematocrito en individuos de poblaciones más urbanas, indicativo de grado de anemia, posiblemente debido a la falta de insectos como fuente de alimento. Respecto al sistema inmune, se ha observado que las inmunoglobulinas totales están disminuidas en zonas urbanas, al igual que la capacidad lítica, mientras que la aglutinación está aumentada. Estos resultados indican que los individuos de zonas urbanas, debido a la mayor prevalencia de enfermedades y densidad de población, presentan una selección favorable hacía una mejor capacidad inmune innata, pero las características del medio afectan al desarrollo del sistema. El valor H/L

es superior en zonas urbanas, indicativo de una mayor presencia de factores estresantes, lo cual se relaciona con la alteración del estado nutricional y del sistema inmune.

La valoración del sistema inmune es una herramienta muy potente para comprender como afectan las distintas variables ambientales a cada individuo, pudiendo emplearse para la evaluación de bioindicadores que a su vez permitan conocer el efecto de la urbanización sobre el medio, proceso que ya está afectando incluso a especies tan resistentes y adaptadas como el gorrión común.

Palabras clave: gorrión común (*Passer domesticus*), declive poblacional, medio urbano, estrés, sistema inmune.

INTRODUCCIÓN

La alteración de zonas naturales por parte del ser humano está ocurriendo de forma acelerada en todo el mundo, modificando la estructura física y los procesos ecológicos de los hábitats donde tiene lugar (Bonier, 2012). En la actualidad, más de la mitad de la población humana vive en ciudades, tendencia que se verá incrementada en los próximos 25 años debido no sólo al aumento de la población, sino también a diversos factores socio-económicos que favorecen el desplazamiento desde las zonas rurales a las urbanas, lo que conlleva un incremento en el número y el tamaño de las ciudades (Stagoll *et al.*, 2010). Actualmente se considera que el desarrollo urbano es la mayor amenaza para la conservación, por lo que es importante conocer cómo responden las especies a este proceso si se desea conservarlas (Stagoll *et al.*, 2010; Bonier, 2012).

La urbanización es un proceso complejo que afecta a todo tipo de seres vivos, siendo las aves uno de los grupos taxonómicos más afectados, produciéndose una disminución de la riqueza de especies y quedando el hábitat dominado por unas pocas, de carácter generalista, pero presentes en alta densidad (Stagoll *et al.*, 2010). La mayor presencia de especies generalistas se debe a que por lo general son menos vulnerables a la alteración del hábitat; se ha relacionado la flexibilidad comportamental, es decir, la habilidad que tienen para modificar sus acciones según el medio, con un mayor tamaño relativo del cerebro y con una mayor facilidad para la explotación de nuevos recursos (Echeverría y Vassallo, 2008). Además, las zonas urbanas se caracterizan por una provisión casi constante de alimento; por ello las especies que pueden aprovechar estas fuentes de alimento serán más abundantes en áreas urbanas que las que tienen dietas alternativas como por ejemplo las insectívoras (Bonier, 2012).

Cada vez existe más conciencia de lo necesario que es establecer pautas conservacionistas en los planes de urbanismo de cara a mitigar o minimizar el daño ecológico causado. Existen diversos estudios que apoyan la teoría de que entre zonas urbanas existen diferencias a la hora de mantener un número de especies, lo que indica que existen mejores y peores planes de urbanismo en lo que a conservación de la flora y la fauna se refiere (Stagoll *et al.*, 2010). Por todo ello, las aves son una magnífica herramienta para la conservación, pudiendo servir como indicadores del efecto que la urbanización ejerce sobre el medio.

El gorrión común (*Passer domesticus*) es un ave única debido tanto a su asociación con el ser humano, con una dependencia total de su presencia, como a su amplia distribución, siendo la especie con mayor distribución geográfica en España (Molina, 2003), y en el mundo (Murgui, 2011). Era lógico esperar que, con la continua expansión del ser humano, el número de individuos de esta especie también aumentase; la realidad es justamente la contraria, especialmente en las zonas más desarrolladas del mundo.

El descenso en la población de gorriones fue ya identificado en el año 1962 en Gran Bretaña, por la British Trust for Ornithology; esta disminución fue más marcada en el ámbito rural, debiéndose principalmente a la intensificación de la agricultura, aunque parece que se ha estabilizado en los últimos años, al contrario que en el caso del medio urbano, donde este fenómeno es cada vez más pronunciado; por ejemplo, la población de gorrión en Londres ha disminuido un 71% entre 1994 y 2002 (De Laet y Summers-Smith, 2007). En los últimos años este descenso ha sido registrado en otros países por todo el mundo, especialmente en Europa (Laet y Summers-Smith 2007; Shaw *et al.*, 2008). En su trabajo del 2008, el grupo de Shaw recopiló información sobre el estado de las poblaciones de gorriones en diversas ciudades, indicando como este descenso está demostrado en ciudades como Dublín, Edimburgo, Hamburgo, Londres, Moscú, Praga y San Petersburgo.

En lo concerniente a nuestro país, los datos del programa SACRE (programa para conocer la tendencia de las aves en primavera) para el periodo 1997-2009 indican que la especie presenta un declive moderado, con una disminución media de un 0.6 % anual (SEO/BirdLife, 2010). La tendencia poblacional a la baja descrita para el ámbito nacional parece quedar confirmada por estudios realizados en el ámbito local. En Sagunto (Valencia) Gil-Delgado *et al.*, (2002) constataron entre 1975 y 2001 una disminución de la población estudiada en una parcela de naranjal de 16 Ha, observando

cómo, de las 114 parejas reproductoras observadas en 1975 tan solo quedan 6 en 2001. También en Valencia se censaron mensualmente las poblaciones en 22 parques urbanos entre 1998 y 2008, constatando una disminución poblacional del 70 % en 10 años, equivalente a un descenso medio anual del 15% (Murgui y Macias, 2010). En Valladolid, Balmori y Hallberg, (2007) censaron mensualmente 30 puntos de muestreo entre 2002 y 2006, registrando una reducción poblacional del 5 % anual. Nuestro propio grupo ha descrito un descenso en el número de capturas de gorrión común entre 1995 y 2009 en la estación de anillamiento del Parque del Oeste, en la ciudad de Madrid; además, dichos animales presentaban elevación en marcadores hematológicos del estrés y cierto grado de anemia (datos sin publicar).

Respecto a su estatus de conservación, la Categoría Mundial IUCN la engloba como Preocupación Menor (LC), debido a su amplia distribución geográfica, a su población total aún abundante y al hecho de que el declive poblacional observado no parece suficientemente severo como para poner en riesgo a la población mundial en las próximas décadas (BirdLife International, 2011). Aun así, es cierto que en otros ámbitos geográficos, debido a la cada vez mayor evidencia de que la población estaba disminuyendo, su estatus cambia y es incluido entre las especies de interés para la conservación tanto en algunos países europeos como en Europa en general (BirdLife, 2004). En España no está incluida en los catálogos de especies amenazadas o de interés, ni a nivel nacional ni en ninguna de las comunidades autónomas.

Las causas que han llevado al declive constituyen un vivo debate aún abierto, sin que se haya podido dar una respuesta totalmente satisfactoria. En su trabajo del 2010, Murgui y Macias sugieren varios factores como determinantes del declive poblacional observado en la ciudad de Valencia, los cuales pueden ser extrapolados a otras zonas urbanas. Por un lado, la disminución de la población de gorriones ha coincidido con una fuerte expansión de la ciudad y la pérdida concomitante de zonas verdes (parques y jardines) y zonas sin construir (solares), lugares positivamente seleccionados por la especie donde encuentra recursos tróficos de origen tanto vegetal como animal (Murgui, 2009). Por otra parte, en los últimos años ha aumentado el número de vehículos en las ciudades, una alta presencia de estos puede también contribuir a la mortandad no natural por atropello; de hecho, en España, los atropellos de gorriones constituyen el 10% del total de los atropellos a vertebrados y el 24% de las aves atropelladas (CODA, 1993). Respecto a la edificación, cada vez hay más construcciones modernas, con un menor número de oquedades y espacios que permitan la nidificación (Shaw *et al.*, 2008).

Tampoco hay que olvidar la interacción con otras especies: por una parte, las palomas pueden competir con los gorriones por el alimento, dificultando el acceso a este; por otra parte, aunque se pensaba que en las zonas urbanas el número de depredadores era menor que en zonas rurales (Gering y Blari, 1999), se ha comprobado que esto no es así, debido a la presencia de mascotas, especialmente de gatos (Shaw *et al.*, 2008). Algunos autores incluso plantean la posibilidad de que las ondas electromagnéticas emitidas por las antenas de telefonía pueda ser uno de los factores clave en el descenso poblacional de esta especie (Balmori y Hallberg, 2007). Finalmente, quizá uno de los aspectos más importantes pero que aún no se le ha prestado la debida atención es la presencia de contaminantes en el medio (Koivula y Eeva, 2010), presentes en mayor medida en el medio urbano por una alta concentración de vehículos a motor y de industria con respecto al medio rural.

Por tanto, se debería evaluar cómo algunos de estos factores están afectando a los individuos para encontrar una posible explicación a este descenso poblacional. Uno de los enfoques más actuales es, además del clásico análisis fisiológico, la evaluación del sistema inmune, uno de los mecanismos de defensa evolutivos más importantes, habiéndose corroborado en aves que su mantenimiento está relacionado con el éxito reproductivo y la supervivencia (Parejo y Silva, 2009).

Se tiene mucha información sobre cada uno de los aspectos que componen el sistema inmune, pero muy poca sobre cómo puede ser modificado por las condiciones del medio; para suplir esta carencia nace la ecoinmunología, cuyo objetivo es tratar de explicar las variaciones naturales que ocurren en el sistema inmune, especialmente para detallar cómo y por qué los factores bióticos y abióticos alteran este sistema en individuos que habitan en el medio natural. El paradigma central de la ecoinmunología es que los distintos tipos de respuesta inmune varían en su coste y beneficio; cabe esperar que los individuos equilibren estos de distinta manera según el momento de su vida y la presión selectiva del entorno (Davison *et al.*, 2008).

El sistema inmune comprende una serie de mecanismos de barrera que, aunque son independientes entre sí, se encuentran interrelacionadas, dividiéndose en innato y adquirido. La parte innata proporciona una protección inicial frente a agentes externos, carece de memoria y una respuesta fuerte (tal como una respuesta inflamatoria sistémica) es muy costosa en términos de nutrientes, energía y comportamiento (Bonier, 2012). Por su parte, el sistema adquirido tiene como función llevar a cabo una respuesta más adaptada y específica a patógenos presentados previamente; este tipo de inmunidad,

mediada por inmunoglobulinas (también denominadas anticuerpos), no es costosa, pero un correcto desarrollo requiere tiempo y nutrientes suficientes para producir un repertorio adecuado de linfocitos B que reconozcan una amplia variedad antígenos. (Bonier, 2012). A su vez, tanto la parte innata como la adquirida presenta componentes celulares (los distintos tipos de leucocitos) y humorales (la inmunoglobulinas y el complemento) (Davison *et al.*, 2008).

El estrés ambiental también capaz de causar diversas alteraciones fisiológicas en todos los vertebrados; en aves, la primera respuesta ante el estrés es rápida, causando un aumento de la presión arterial, de la frecuencia respiratoria, del tono muscular y de la liberación de glucocorticoides (Ruiz *et al.*, 2002). El glucocorticoide más importante en aves es la corticosterona, también llamada hormona del estrés; el aumento de su concentración en sangre tras un estrés agudo ocurre en minutos, y su vida media en sangre es breve, desapareciendo una vez que se elimina el factor estresante (Vleck *et al.*, 2000). Sin embargo, si el factor estresante persiste se originan una serie de cambios a largo plazo relacionados con el estrés crónico; concretamente en aves esta respuesta se caracteriza por un aumento en el número de heterófilos y una disminución en el número de linfocitos, lo cual nos relaciona directamente el estrés crónico asociado al medio con la respuesta inmunitaria de los individuos (Ruiz *et al.*, 2002). Existen además muchas evidencias, basadas en estudios experimentales y epidemiológicos, que demuestran que el estrés es capaz de disminuir la respuesta inmune (Raberg *et al.*, 1998), conociéndose la capacidad inmunosupresora de la corticosterona (Bonier, 2012). Hay que señalar que estos niveles mantenidos de hormona circulante causan que esta termine acumulándose en heces y, posteriormente, en plumas (Ruiz *et al.*, 2002).

Como podemos comprobar, el estrés ambiental afecta al estado del sistema inmune, por lo que su estudio puede aportar información muy interesante sobre el medio en el que se desenvuelve el individuo. Anteriormente se ha comentado que uno de los posibles factores estresantes es la contaminación; se sabe que muchos de los compuestos presentes en la atmósfera afectan al sistema inmune de forma directa (a nivel de la producción y el funcionamiento de los leucocitos, de los anticuerpos o de las citoquinas) o indirecta, a través de alteraciones en el sistema endocrino (Martin *et al.*, 2010); un motivo más por el cual el estudio del sistema inmune puede resultar interesante.

Por todo ello, parece que el estudio de las distintas poblaciones de aves, en particular de aquellas acostumbradas a vivir en entornos urbanos y que ahora se ven en

regresión, puede aportar información esencial sobre efectos que el proceso de urbanización tiene sobre los distintos organismos, conocimiento clave si se desea conservar la biodiversidad y la fauna de las zonas alteradas. Dentro de este tipo de estudios la ecoinmunología genera una gran cantidad de información sobre las adaptaciones que tienen que tomar los individuos para sobrevivir, relacionadas con el estrés crónico que causa su interacción tan estrecha con el ser humano, incluida la contaminación, problema al que todos los seres vivos nos enfrentamos día a día.

El objetivo de este trabajo es determinar el estado nutricional, del sistema inmune y la respuesta ante factores estresantes de poblaciones de gorrión común a lo largo de un gradiente de urbanización y determinar en qué medida estos valores pueden relacionarse con la expansión urbanística que estamos viviendo en el mundo actual.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de las muestras y caracterización del hábitat

Para la obtención de muestras biológicas y la medición de variables ambientales se han seleccionado cinco localidades de estudio: Nuevo Baztán (40°21'55.91" N; 3°14'35.46" O), Illescas (40°07'27.00" N; 3°50'57.14" O), El Escorial (40°35'06.30" N; 4°07'46.26"), Fuenlabrada (40°17'01.94" N; 3°48'01.18") y Madrid (concretamente en el Museo Nacional de Ciencias Naturales) (40°26'30.04" N; 3°41'24.54"). Se han escogido una serie de variables ambientales para caracterizar cada una de las localidades, referidas tanto a la **presencia humana** (densidad de habitantes y superficie urbanizada) como a la **presencia de contaminantes en la atmósfera**: partículas PM 2,5, partículas PM 10, monóxido de carbono (CO), dióxido de nitrógeno (NO₂), dióxido de azufre (SO₂) y ozono (O³). La información utilizada es de libre acceso; los datos referentes a la presencia humana fueron obtenidos del Instituto de Estadística, mientras que los valores de contaminantes son los registrados por las estaciones de la Red de Calidad del Aire de la Comunidad de Madrid.

Utilizando estas variables se ha asignado a cada localidad un “grado de urbanización”, siendo este el valor del PC1 resultante tras realizar un Análisis de Componentes Principales (ACP) de las variables ambientales antes citadas.

El gradiente va de localidades menos urbanizadas (Nuevo Baztán) a más urbanizadas (Madrid) según el orden citado en el párrafo anterior, explicando esta nueva variable aproximadamente el 50% de la variación (**Tabla 1**).

Todos los muestreos fueron realizados entre octubre del 2011 y febrero del 2012; la elección de este periodo se basa en tres aspectos: el primero es que los individuos ya no se encuentran en periodo reproductor (Murgui, 2011); el segundo es que aún pueden distinguirse los individuos adultos de los nacidos en la primavera precedente en base al grado de pneumatización craneal que, para esta especie, no se completa hasta el mes de febrero (Svensson, 1996) y, finalmente, porque aunque algunos individuos sean pollos nacidos en el 2011, su sistema inmune está prácticamente desarrollado, no presentando diferencias con el de adultos nacidos en años anteriores (Davison *et al.*, 2008).

Los individuos fueron capturados empleando redes japonesas y se individualizaron mediante una anilla metálica con código alfanumérico, identificándose como pertenecientes a la especie *Passer domesticus*, siendo además sexados y datados en base a la pneumatización craneal. Para determinar la condición física del ave se comprobó la cantidad de músculo y grasa, asignándole un valor según el esquema propuesto por el Manual del Anillador (Pinilla, 2000). Para calcular el índice corporal se utilizaron los residuos de una regresión de la longitud del tarso frente al peso (Liker *et al.*, 2008).

De cada una de las aves se extrajo una muestra de sangre de aproximadamente 0,2 ml mediante venopunción de la vena yugular empleando agujas desechables (25G) y

Localidad	Índice de urbanización (PC1)
Madrid	4,458
Fuenlabrada	-0,323
Illescas	-1,026
El Escorial	-1,060
Nuevo Baztán	-2,048

Tabla 1: Grado de urbanización de las localidades de estudio como valor del PC1; los valores más altos indican un mayor grado de urbanización.

Localidad	Número de individuos		
	Total	Hembras	Machos
Madrid	16	6	10
Fuenlabrada	20	7	13
Illescas	22	13	9
El Escorial	17	10	7
Nuevo Baztán	20	9	11

Tabla 2: Número de individuos analizados en cada localidad.

jeringuillas de plástico, traspasando la muestra a tubos heparinizados. Todas las muestras se mantuvieron en hielo y se transportaron al laboratorio donde se procesaron.

En fresco, se determinó la cantidad de hemoglobina mediante el método de la cianometahemoglobina y el porcentaje de hematocrito mediante microcentrifugación en capilares. La hemoglobina es una hemoproteína localizada en el interior de los eritrocitos, siendo responsable del transporte de oxígeno desde los órganos respiratorios hasta los tejidos; por su parte, el hematocrito es lo que se denomina “fracción celular” de la sangre, es decir, es el porcentaje de los glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas que hay en esta. Una vez determinados estos parámetros, la sangre fue centrifugada para su separación en fracción celular y plasma; ambas fracciones se mantuvieron a -80°C hasta su utilización.

Determinación del estado nutricional

La composición de la sangre es un reflejo del estado fisiológico del animal, aportando información sobre su estado de salud y su nutrición; en este aspecto, dos de los componentes analizados más habitualmente, junto con el hematocrito y la hemoglobina, son la albumina y el colesterol (Gavet y Wakeley, 1986).

La albúmina es una de las proteínas plasmáticas más importantes; de síntesis hepática, participa en la nutrición, el mantenimiento de la presión oncótica y el transporte de sustancias diversas como el calcio, ácidos grasos, etc. Se cuantificó usando un kit de la casa comercial Spinreact, basado en el protocolo de Rodkey (1956).

Por su parte el colesterol es una sustancia de naturaleza grasa, presente en todas las células del organismo, siendo el hígado quien lo produce normalmente para formar las membranas y producir ciertas hormonas. La cuantificación se realizó mediante un kit de Spinreact basado en el protocolo de Meattini *et al.*, (1978).

Estado del sistema inmune y respuesta ante factores estresantes

1. Recuento leucocitario.

En el momento de la extracción de la muestra de sangre se realizó un frotis sanguíneo que posteriormente fue fijado con metanol. En dicho frotis se llevó a cabo el conteo de los diferentes tipos de leucocitos mediante microscopía óptica empleando el Método de Natt y Herrick (1952), donde el violeta de metilo 2B tiñe todas las células con diferentes tonos de azul. Usando el objetivo de 1000 X y con aceite de inmersión se seleccionaron al azar distintos campos que no solapasen, hasta que el número total de

células identificadas fuese de 100. Los eosinófilos, heterófilos, basófilos, linfocitos y monocitos fueron identificados de acuerdo a los criterios establecidos por Hawkey y Dennett (1989). Esta evaluación permitió el cálculo de la relación heterófilos/linfocitos (H:L), un valor que se utiliza como índice del estrés crónico del individuo (Vleck *et al.*, 2000).

2. Cuantificación de la corticosterona en heces

La corticosterona, también llamada “hormona del estrés”, es un glucocorticoide secretado por la corteza de la glándula adrenal en aves ante factores estresantes. Su cuantificación puede ser llevada a cabo en muestras de distinta naturaleza, principalmente en plasma, plumas y heces en función del lapso temporal transcurrido entre la exposición al elemento estresante y la respuesta del organismo. El estudio en plumas aporta información sobre el estrés que ha sufrido el individuo a muy largo plazo (Bortolotti *et al.*, 2008), en este trabajo se intentó cuantificar la corticosterona en este tipo de muestra pero no se obtuvo el resultado deseado debido a su bajo peso, ya que el protocolo fue puesto a punto en aves de mucho mayor tamaño. La concentración de corticosterona en plasma es un reflejo del estrés inmediato, con lo que su nivel se ve muy alterado por la manipulación, su retención y por la propia extracción de la muestra; además estos niveles varían de forma natural a lo largo del tiempo, con lo que en el mismo día dos muestras del mismo animal puede variar en gran medida (Touma y Palme, 2005). Para resolver estos inconvenientes se están desarrollando técnicas para la cuantificación de esta hormona en heces, reflejo de una exposición a los agentes estresores a medio plazo (Chávez-Zichinelli *et al.*, 2010).

Para su cuantificación se utilizó un kit comercial de la casa Arbor Assays, basado en la técnica del ELISA. El primer paso es realizar la extracción de la corticosterona de las heces mediante etanol; una vez extraída, esta se añade en la placa multipocillo suministrada en el kit, donde, mediante el uso de anticuerpos anti-corticosterona conjugados con peroxidasa, el sustrato TMB dará una coloración medible a 450 nm, con una relación directa entre la absorbancia de este producto coloreado y la concentración de corticosterona, ya que previamente se realizó una recta de calibrado.

3. Test de hemólisis-hemaglutinación

Este test, desarrollado por Matson *et al.*, (2005) permite hacer una evaluación del estado del sistema inmune innato, basándose en la cantidad de complemento y de inmunoglobulinas innatos. Para llevarlo a cabo se realiza un banco de diluciones seriado en una placa de 96 pocillos (8 filas por 12 columnas), añadiendo posteriormente una suspensión al 1% de eritrocitos de conejo. Tras la incubación puede observarse, de izquierda a derecha, hemólisis, hemaglutinación o falta de efecto. La lisis se debe a la interacción de los anticuerpos innatos con el complemento, cuando la cantidad de complemento es baja, el anticuerpo se une a los eritrocitos y los precipitan, pero no se lisan, de ahí la hemaglutinación. En este punto se le asigna un valor a cada muestra, siendo el negativo del logaritmo en base 2 (\log_2) de la última dilución que exhibió cada comportamiento, teniendo cada muestra un valor para hemólisis y otro para hemaglutinación. Estos valores fueron asignados por cuatro observadores de forma independiente para cada uno de los dos efectos.

4. Cuantificación de las inmunoglobulinas totales

Como ya se ha comentado la respuesta del sistema inmune puede dividirse en celular y humoral. Debido a que el principal componente de la respuesta humoral son las inmunoglobulinas, una estimación clara de esta parte del sistema inmune es la cuantificación total de dichos anticuerpos en plasma, tanto los innatos como los adquiridos (estos últimos presentes en mayor proporción). En el trabajo de Martínez *et al.*, (2003) se demostró la posibilidad de emplear un ELISA directo para su cuantificación. Para ello se diluye el plasma en proporción 1/4000 y se incuba durante 18 horas a 4°C en placas multipocillo, tras lo cual las inmunoglobulinas habrán quedado adheridas al fondo. Se adiciona entonces el anticuerpo anti-inmunoglobulinas de ave conjugada con peroxidasa; finalmente queda añadir el sustrato de la enzima, ortofenildietilamina (OPD), cuantificando la absorbancia resultante a 492 nm.

Análisis estadístico

Tras comprobar la distribución normal de los datos mediante el test de Kolmogorov-Smirnoff se realizaron una serie de Modelos Generales Lineales (GLM) para analizar si existen diferencias entre las poblaciones de cada una de las localidades de estudio ($p > 0,05$). En estos análisis se emplearon como variables respuesta la cantidad de albúmina y de colesterol, cada tipo celular del recuento leucocitario, la concentración

de corticosterona y de inmunoglobulinas y los valores de hemólisis y hemaglutinación; siendo las localidades el factor fijo y el sexo y el índice corporal las covariables. En los casos en los cuales el análisis ha indicado diferencias significativas entre localidades se realizó un análisis post hoc usando el estadístico LSD, indicando entre qué localidades hay diferencias con un valor $p < 0,05$. Tanto en las tablas como en las gráficas posteriores, se emplearan letras para indicar respecto a qué localidad presenta ese valor diferencias significativas; expresando “a” diferencias respecto a Nuevo Baztán, “b” respecto a El Escorial, “c” respecto a Illescas, “d” respecto a Fuenlabrada y “e” respecto a Madrid. Para todos los análisis se empleó el programa comercial STATISTICA[®].

RESULTADOS

Caracterización del hábitat

Mediante un Análisis de Componentes Principales (ACP) empleando las variables ambientales densidad de habitantes, superficie urbanizada, partículas PM 2,5, partículas PM 10, CO, NO₂, SO₂, O³ y Benceno se ha obtenido un PC1 que indica que existe el siguiente gradiente de urbanización respecto a cada una de las localidades de muestreo:

+ Madrid > Fuenlabrada > Illescas > El Escorial > Nuevo Baztán –

Observando la **Figura 1**, se observa como Fuenlabrada y el Madrid presentan una mayor densidad de habitantes y una mayor superficie urbanizada que el resto. Por otra parte, en la **Figura 2** se observa como la presencia total de contaminantes es en general muy similar en todas las localidades, aunque entre las proporciones de uno y otro tipo es donde se pueden observar variaciones.

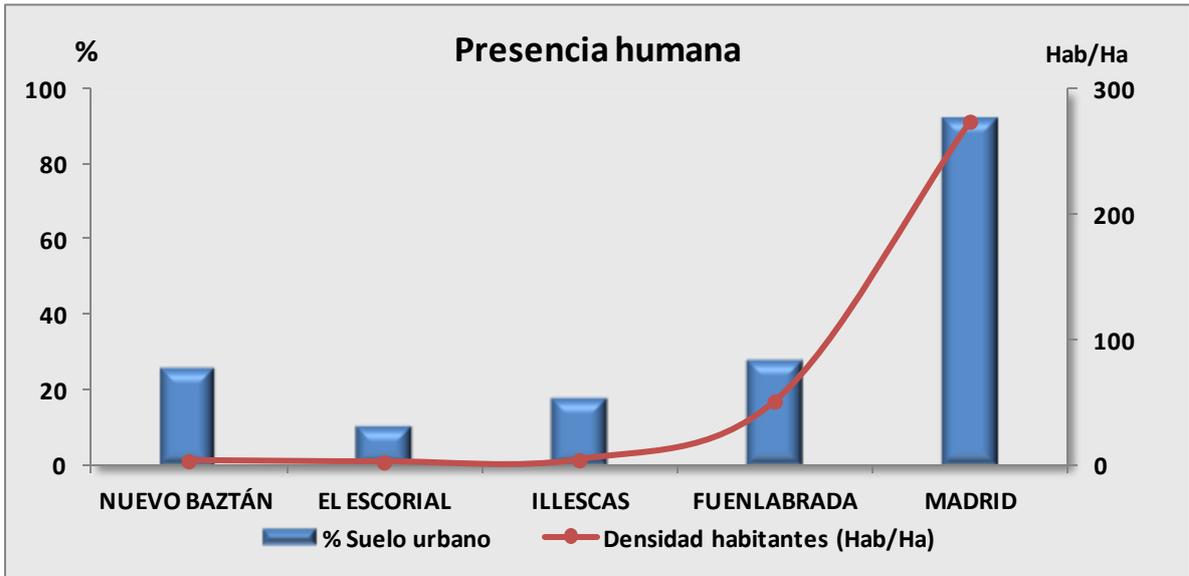


Figura 1: Presencia humana; % de Suelo urbano (columna izquierda) y Densidad de habitantes (Hab/Ha), por localidades. Media \pm Error Estándar.

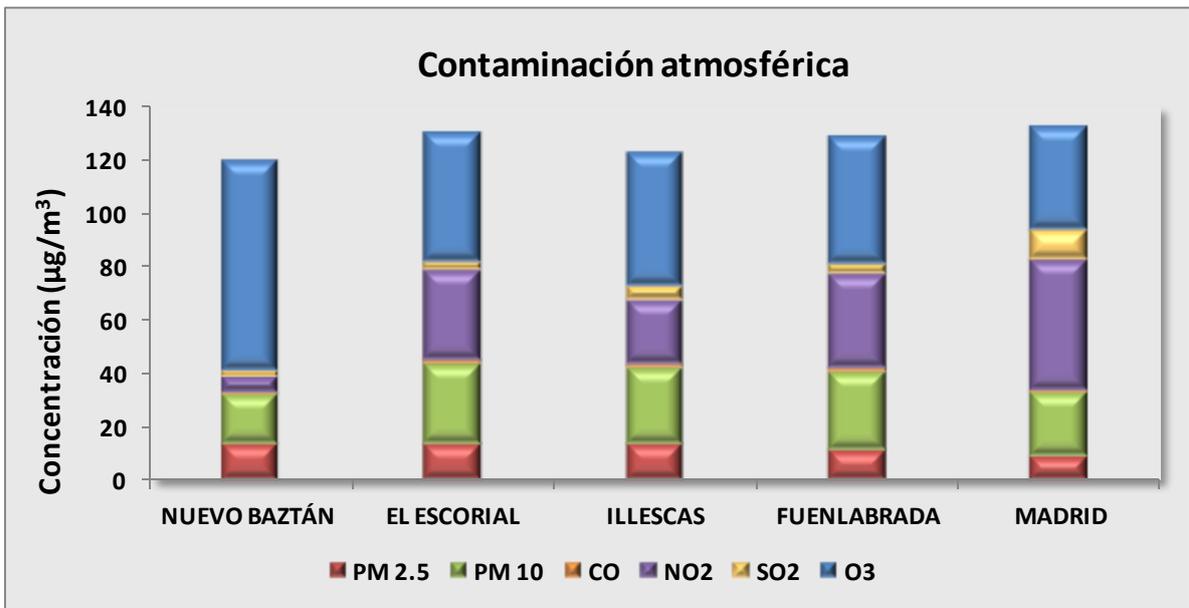


Figura 2: Contaminación atmosférica; concentración media de partículas y gases contaminantes ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) por localidades. Media \pm Error Estándar.

Determinación del estado nutricional

Variables	Localidades				
	Nuevo Baztán	El Escorial	Illescas	Fuenlabrada	Madrid
Grasa	1 ± 0,00	1,35 ± 0,61	1 ± 0,31	1,25 ± 0,64	1,06 ± 0,68
Musculo	1,08 ± 0,29	1 ± 0,31	1,07 ± 0,52	1,1 ± 0,45	0,97 ± 0,34
Hemoglobina	166 ± 26 ^d	175 ± 29 ^d	177 ± 27 ^d	131 ± 32	177 ± 25 ^d
Hematocrito	50 ± 4,2 ^d	48 ± 4,3	49 ± 4,3	47 ± 5,2	50 ± 3,3 ^d
Albúmina	12,26 ± 3	12,33 ± 2,61	11,09 ± 2,27	12,08 ± 2,05	11,29 ± 2,19
Colesterol	1,65 ± 0,42 ^d	1,59 ± 0,45 ^d	1,62 ± 0,33 ^d	1,33 ± 0,25	1,77 ± 0,37 ^d

Tabla 3: Cuadro resumen del **estado nutricional**. Los datos se muestran media ± desviación estándar. La grasa acumulada se expresa en escala de 0 a 8; la cantidad de músculo en escala de 0 a 3; la hemoglobina en mg/ml sangre; el hematocrito en porcentaje; albúmina y colesterol en mg/ml plasma. a ≠ Nuevo Baztán; b ≠ El Escorial; c ≠ Illescas; d ≠ Fuenlabrada y e ≠ Madrid con un nivel de significación $\alpha = 0.05$.

No se han observado diferencias significativas en la cantidad de grasa o músculo de los individuos entre localidades, valores tomados como medida de la condición corporal (**Tabla 3**).

Respecto al estudio sanguíneo, se han encontrado diferencias significativas respecto a la cantidad de hemoglobina y al hematocrito entre localidades (**Figura 3**). Los individuos de Fuenlabrada presentan una menor concentración de hemoglobina que los del resto de localidades; por otra parte, su hematocrito es menor que el de las poblaciones de Nuevo Baztán y Madrid. Señalar que, como se esperaba, el hematocrito es más alto en machos respecto a las hembras.

Los últimos valores referentes al estado nutricional son la concentración de albúmina y colesterol en sangre. Mientras que en el caso de la albúmina no se observan diferencias entre localidades, la cantidad de colesterol en los individuos de Fuenlabrada está significativamente disminuida respecto al resto de poblaciones (**Figura 4**).

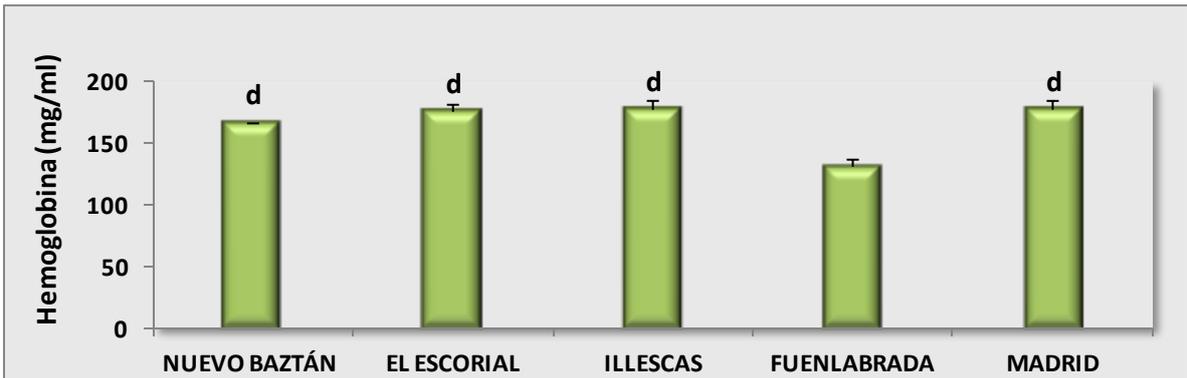
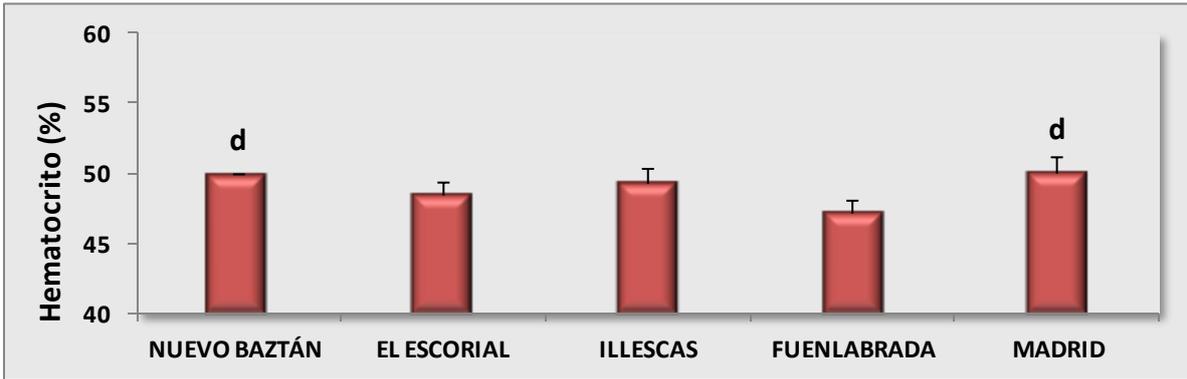


Figura 3: Concentración de hemoglobina (mg/ml de sangre) y hematocrito (%). Media \pm Error Estándar. a \neq Nuevo Baztán; b \neq El Escorial; c \neq Illescas; d \neq Fuenlabrada y e \neq Madrid con un nivel de significación $\alpha = 0.05$.

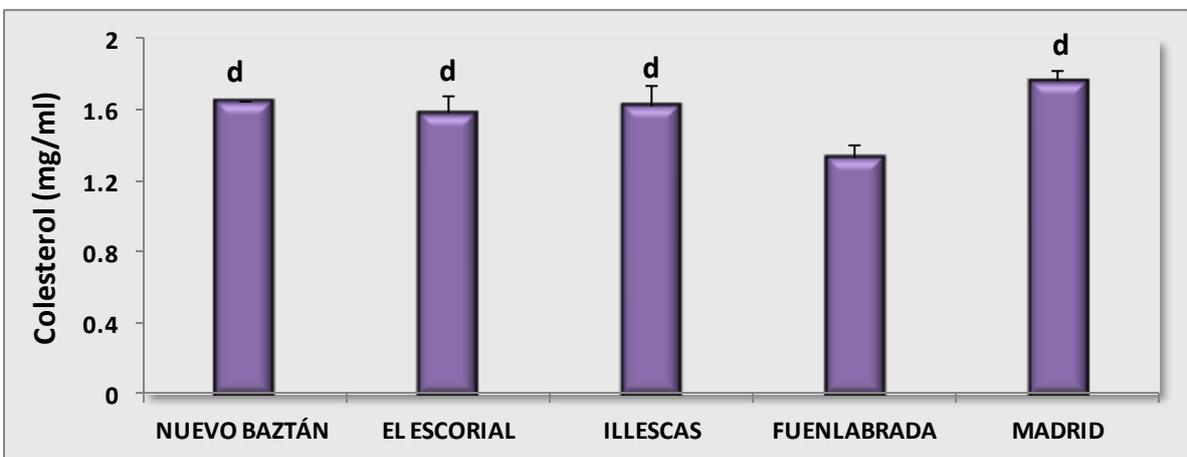


Figura 4: Concentración en plasma de colesterol (mg/ml). Media \pm Error Estándar. a \neq Nuevo Baztán; b \neq El Escorial; c \neq Illescas; d \neq Fuenlabrada y e \neq Madrid con un nivel de significación $\alpha = 0.05$.

Estado del sistema inmune y respuesta ante factores estresantes

Variables	Localidades				
	Nuevo Baztán	El Escorial	Illescas	Fuenlabrada	Madrid
Linfocitos	50,58 ± 2,93 ^d	52,1 ± 2,25 ^d	49,2 ± 3,06 ^{bd}	47,39 ± 3,3 ^b	49,18 ± 2,2 ^{bd}
Heterófilos	40,96 ± 4,1 ^{de}	39,6 ± 1,69 ^{de}	40,33 ± 3,11 ^{de}	44,25 ± 2,02	43,24 ± 1,77
Monocitos	2,82 ± 1,09	3,87 ± 1,41	4,19 ± 2,05	3,83 ± 1,33	3,35 ± 1,28
Basófilos	0,84 ± 0,87	0,65 ± 0,76	0,73 ± 0,81	0,41 ± 0,61	0,56 ± 0,71
Eosinófilos	4,81 ± 2,71	3,78 ± 1,75	5,5 ± 2,91	4,13 ± 2,42	3,67 ± 0,92
Lisis	3,62 ± 1,09	2,22 ± 1,35 ^{ac}	4,6 ± 1,09	2,73 ± 1,38 ^{ac}	2,72 ± 1,32 ^{ac}
Aglutinación	7,92 ± 2	10,88 ± 0,28 ^{ac}	8,83 ± 0,98	10,65 ± 0,45 ^{ac}	10,97 ± 0,09 ^{ac}
Corticosterona	3967 ± 1271	4876 ± 2633	6284 ± 3089	2849 ± 1838 ^c	1074 ± 803 ^c
Igs	0,157 ± 0,021	0,173 ± 0,02	0,18 ± 0,032	0,149 ± 0,019	0,161 ± 0,026
Ratio H/L	0,81 ± 0,12	0,76 ± 0,05	0,82 ± 0,08	0,94 ± 0,1 ^b	0,88 ± 0,07 ^b

Tabla 4: Cuadro resumen del estado del sistema inmune y de la respuesta ante el estrés. Los datos se muestran media ± desviación estándar. Linfocitos, heterófilos, monocitos, basófilos y eosinófilos se expresan como porcentaje; lisis y aglutinación en escala de 0 a 11; corticosterona en heces en pM; inmunoglobulinas (Igs) como densidad óptica (D.O.) a 492 nm. a ≠ Nuevo Baztán; b ≠ El Escorial; c ≠ Illescas; d ≠ Fuenlabrada y e ≠ Madrid con un nivel de significación $\alpha = 0.05$.

1. Recuento leucocitario

Se ha observado un mayor número de heterófilos en los individuos de Fuenlabrada y de Madrid con respecto a los de las otras localidades. El número de linfocitos está disminuido en los individuos de Fuenlabrada respecto al resto de poblaciones, por su parte los individuos de El Escorial presentan una mayor cantidad de linfocitos que los de Illescas y Madrid (**Figura 5**).

Se han encontrado variaciones en la relación heterófilos/linfocitos (H/L) entre localidades; concretamente está aumentada en las poblaciones de Fuenlabrada y Madrid respecto a la de El Escorial, mostrando un mayor estrés crónico (**Figura 6**).

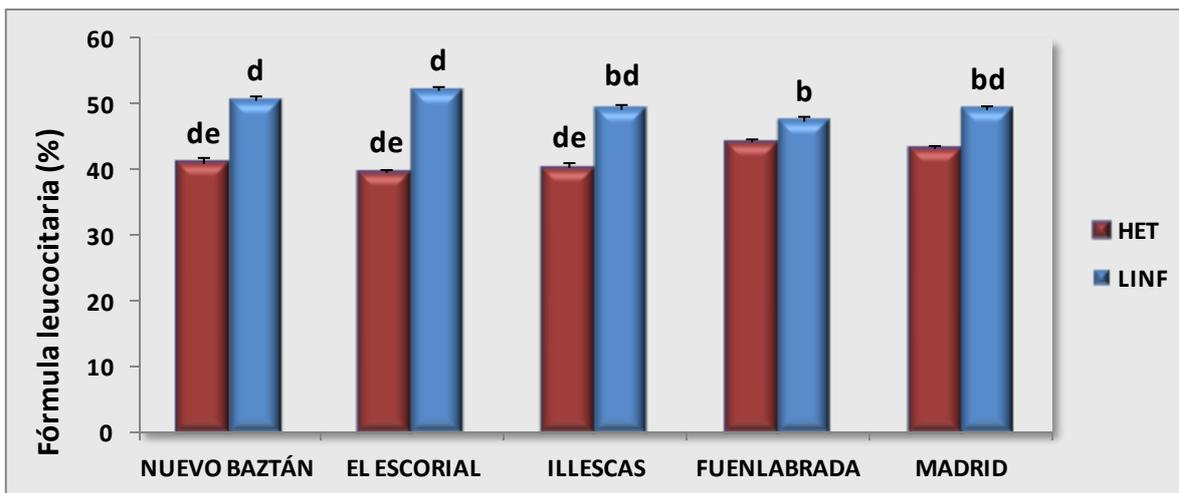


Figura 5: Porcentaje de heterófilos (HET) y linfocitos (LINF). Media \pm Error Estándar. a \neq Nuevo Baztán; b \neq El Escorial; c \neq Illescas; d \neq Fuenlabrada y e \neq Madrid con un nivel de significación $\alpha = 0.05$.

2. Cuantificación de la corticosterona en heces

Las heces de los individuos de Illescas presentan una mayor concentración que las recogidas en Nuevo Baztán, Fuenlabrada y Madrid (**Figura 6**).

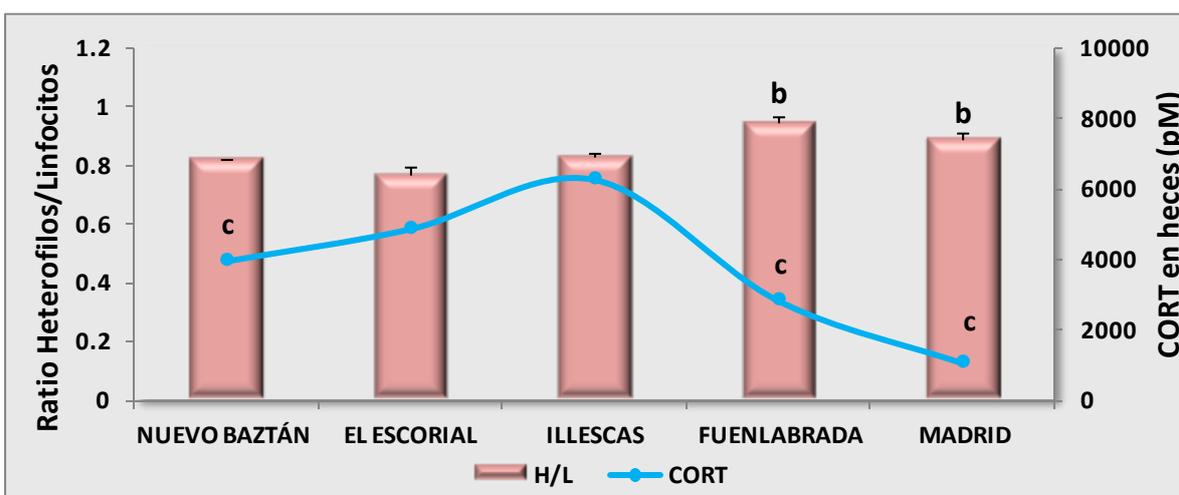


Figura 6: Respuesta ante factores estresantes. En barras se representa la relación heterófilos/linfocitos (H/L); en la línea, la concentración de corticosterona en heces (pM). Media \pm Error Estándar. a \neq Nuevo Baztán; b \neq El Escorial; c \neq Illescas; d \neq Fuenlabrada y e \neq Madrid con un nivel de significación $\alpha = 0.05$.

3. Test de hemólisis-hemaglutinación

Los valores de lisis son mayores en individuos de Nuevo Baztán e Illescas, es decir, presentan una mayor cantidad de complemento; además también se han encontrado diferencias entre sexos, con valores más bajos en las hembras. Por otro lado, en la aglutinación se observa exactamente el fenómeno contrario, valores menores en las poblaciones de Illescas y Nuevo Baztán, respecto al resto, indicando una menor cantidad de inmunoglobulinas (**Figura 7**).

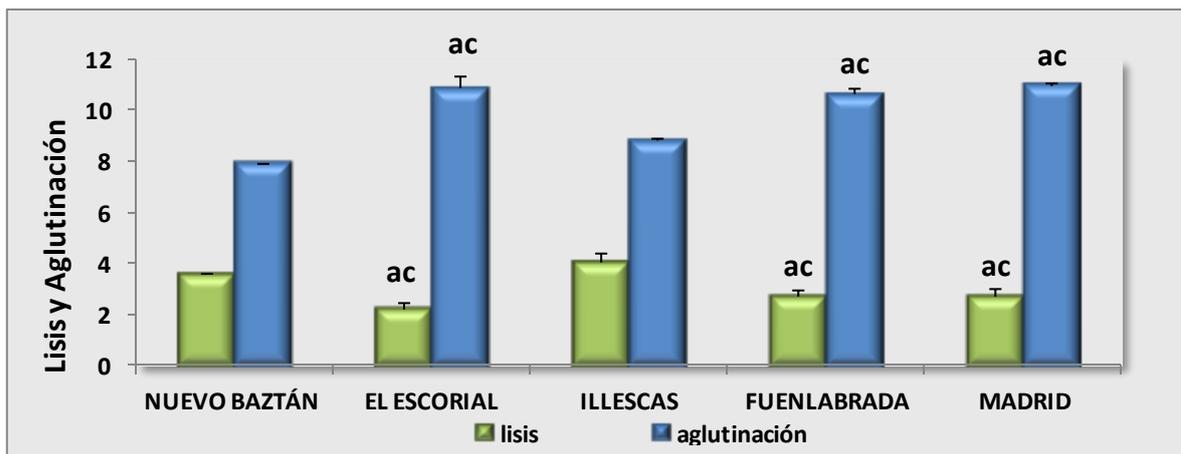


Figura 7: En barras se representan las medidas de lisis y aglutinación según Matson *et al.*, (2005); en la línea, la concentración de inmunoglobulinas totales (D.O. 492 nm). Media \pm Error Estándar. a \neq Nuevo Baztán; b \neq El Escorial; c \neq Illescas; d \neq Fuenlabrada y e \neq Madrid con un nivel de significación $\alpha = 0.05$.

4. Cuantificación de las inmunoglobulinas totales

Los individuos de Fuenlabrada presentan una menor concentración de inmunoglobulinas que los de El Escorial e Illescas; por su parte, los individuos con una mayor concentración son los de Illescas, difiriendo significativamente de los de Madrid y Nuevo Baztán (**Figuras 8**).

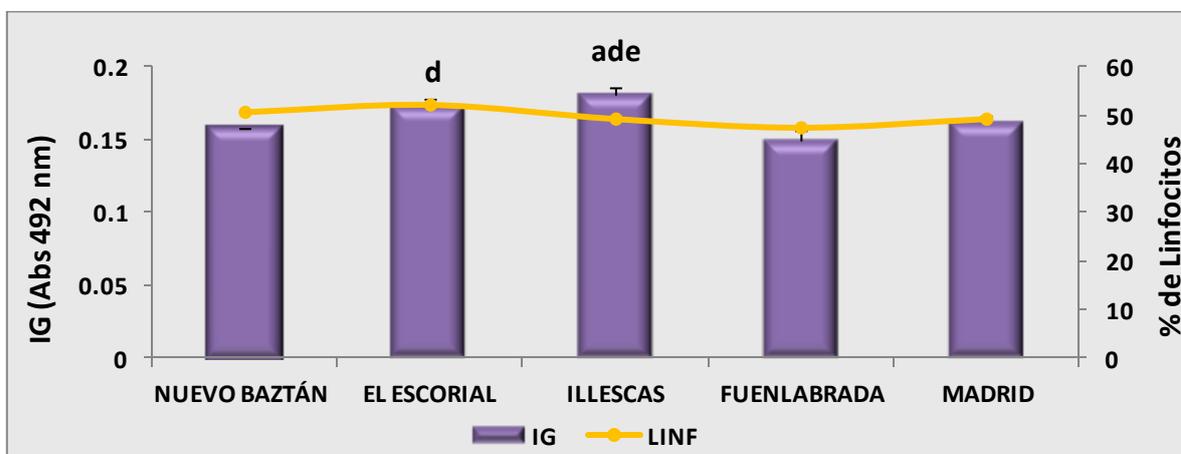


Figura 8: En barras se representan la concentración de inmunoglobulinas totales (D.O. 492 nm); en la línea la cantidad de linfocitos. Media \pm Error Estándar. a \neq Nuevo Baztán; b \neq El Escorial; c \neq Illescas; d \neq Fuenlabrada y e \neq Madrid con un nivel de significación $\alpha = 0.05$.

DISCUSIÓN

Caracterización del hábitat

Es fácil comprender que existen múltiples diferencias entre un medio urbano y uno rural, tanto para el ser humano como para las diversas especies animales y vegetales. En su trabajo del 2010, Møller estableció cuales son los 6 factores que diferencian estos dos tipos de hábitats. Por regla general, los medios urbanos tienen una

mayor temperatura (1) y una mayor concentración de CO₂ y de otros contaminantes (2); como consecuencia de la mayor temperatura, las áreas urbanas tienen una temporada de crecimiento mayor (3); como resultado de la mayor temperatura y mayor concentración de CO₂ también existe un mayor productividad primaria, y por tanto mayor cantidad de alimento (4), y como consecuencia, las áreas urbanas tienen mayores densidades poblacionales (5). Finalmente, la una mayor proximidad al ser humano es otro factor diferenciador del medio urbano (6).

A simple vista podría parecer que el medio urbano es más apacible y menos estresante, y es cierto en parte para las especies generalistas, capaces de alimentarse de los restos de la actividad humana (Echeverría y Vassallo 2008), pero se ha comprobado que sí que existen factores estresantes pero de distinto tipo, tales como una mayor tasa de depredación por parte de animales domésticos, sobre todo gatos; una mayor propagación de enfermedades por la alta densidad poblacional (Ditchkoff *et al.*, 2006); otros factores de carácter físico como niveles más altos de ruido o una iluminación excesiva, etc. (Fokidis *et al.*, 2008). La contaminación es un aspecto muy importante; parece bastante claro que las zonas más urbanizadas están más contaminadas debido a una mayor densidad de vehículos y de industrias (Kekkonen *et al.*, 2012), los cuales emiten sustancias que se sabe afectan a la reproducción, al sistema inmune y a la supervivencia en general (Ditchkoff *et al.*, 2006). En su trabajo del 2004, Chandler y su grupo observaron cómo los gorriones de medios urbanos en Estados Unidos presentan una mayor concentración de plomo en sus tejidos que los de medios rurales; estos resultados son similares a los observados por Kekkonen y su grupo en Finlandia (2012) con distintos metales pesados acumulados en el hígado.

Mediante el uso de un Análisis de Componentes Principales (ACP), empleando las variables ambientales ya citadas, se ha podido establecer un gradiente de urbanización para las localidades de estudio. Hay que tener en cuenta que los datos empleados no son todo lo buenos que podría desearse, debido a las diferentes fuentes de origen y formas de medición, pero en nuestro caso nos han permitido hacer una aproximación sobre el índice de urbanización de las localidades, si bien es cierto que muy grosera, válida para un estudio de carácter preliminar como es el caso. Para futuros trabajos lo ideal sería contar con mediciones directas de contaminantes en los puntos de muestreo, junto con una caracterización del hábitat más circunscrita a la zona de toma de muestras; la ventaja de esta aproximación es la de obtener una idea general que permita realizar trabajos posteriores a otras escalas, escogiendo puntos de muestreo que

permitan establecer gradientes más sutiles, con claras diferencias entre un medio urbano y uno rural.

Determinación del estado nutricional

La composición de la sangre es un fiel reflejo del estado fisiológico de los animales, lo que permite su uso como indicador del estado de los individuos (Gavett y Wakeley, 1986). Algunos de los parámetros más utilizados de forma generalizada son la concentración de hemoglobina, de albúmina, de colesterol y el hematocrito.

Se ha observado una disminución de la hemoglobina y el hematocrito en los individuos de Fuenlabrada, lo cual es indicativo de los animales de esta población padecen anemia.

El colesterol es un lípido con un importante papel estructural, siendo uno de los componentes esenciales de las membranas plasmáticas. En aves, al contrario que en humanos, el principal problema del colesterol es su carencia, no su exceso. Al igual que en los parámetros anteriores, los individuos de Fuenlabrada tienen una menor concentración de colesterol en sangre.

El gorrión es omnívoro y oportunista; durante su vida adulta es esencialmente granívoro; sin embargo, durante la época reproductora los adultos alimentan a los pollos con gran variedad de insectos; incluso en volantones y jóvenes gran parte de la dieta son insectos, fuente de colesterol clave para estas aves (Murgui, 2011). Desde hace años se ha documentado la reducción en el número de insectos en las zonas urbanas, por dos motivos esenciales. Por una parte, hay una disminución de las zonas ajardinadas donde habitan: dichas zonas no crecen a igual ritmo que las zonas urbanizadas, por lo que su proporción tiende a ser menor; además cada vez más los jardines privados, normalmente usados por las aves, son pavimentados; finalmente, en países como Francia e Inglaterra hay una tendencia al uso de solares abandonados para la edificación (Shaw *et al.*, 2008). El otro motivo para la disminución de los insectos es la presencia de contaminantes; los combustibles sin plomo portan en su fórmula MTBE (Metil tert-butil éter), cuya combustión produce sustancias con capacidad insecticida (Dandapat *et al.*, 2010); además, muchos metales pesados tienen un efecto nocivo sobre los insectos (Kekkonen *et al.*, 2012). Se ha comprobado que la productividad (medida como el número de pollos que llegan a volar) es menor en zonas urbanas debido al hambre de los pollos cuando su alimentación tiene más productos de origen vegetal y hormigas que, por ejemplo, arañas; además la supervivencia está muy relacionada con el peso de la

nidad (Kekkonen *et al.*, 2012). Por ello, es posible que esta falta de insectos pudiera ser la causante de la bajada en la cantidad de colesterol de los individuos.

Respecto a la anemia detectada, el colesterol es un elemento clave para la estabilidad de las membranas; su falta puede afectar a la estabilidad de los eritrocitos, facilitando su rotura. Otra posible explicación es una alta presencia de monóxido de carbono en la atmósfera, el cual es capaz de generar anemias en los seres vivos (Sicolo *et al.*, 2009) ya que provoca su transformación en carboxihemoglobina, un complejo afuncional para el transporte de oxígeno; de todas las zonas de estudio es en Fuenlabrada donde su concentración es mayor (**Figura 2**).

Señalar además que, como se esperaba, tanto la hemoglobina como el hematocrito presenta niveles más altos en machos respecto en hembras, esto puede deberse al efecto activador que tiene la testosterona sobre la δ -aminolevulínico-sintasa, enzima limitante en la síntesis del grupo hemo (Gorshein y Gardner, 1970)

Determinación del estado del sistema inmune y de la respuesta ante el estrés.

Actualmente, está ampliamente demostrado mediante estudios experimentales que el estrés crónico es capaz de generar efectos negativos sobre la fisiología de los individuos causando hiperglucemia, pérdida de masa muscular o, lo que más nos interesa, inmunosupresión (Chávez-Zichinelli *et al.*, 2010).

La corticosterona es el principal glucocorticoide en aves, cuya liberación está muy condicionada por el estrés. Su medida en plasma es difícil ya que su liberación es muy rápida y el protocolo para que la muestra no se vea alterada por el estrés que ocasiona la manipulación es muy costoso. Por ello, una alternativa es la cuantificación en heces, ya que permite la integración del estado de estrés de los individuos antes de su manipulación (Chávez-Zichinelli *et al.*, 2010).

Por otra parte, las aves, al encontrarse ante situaciones de estrés, sufren cambios en los componentes celulares de la sangre, siendo la principal variación heterofilia y linfopenia, es decir, un aumento de heterófilos y una disminución de los linfocitos. La relación heterófilos/linfocitos (H/L) está considerada como un parámetro eficiente para evaluar el estrés en las aves, siendo mayor esta relación a medida que se eleve la intensidad del estrés, pero no indica mayor o menor grado de susceptibilidad a enfermedades (Tejeda *et al.*, 1997).

Los niveles de corticosterona puede ser un indicador más sensible de los factores de estrés a corto plazo, tales como la privación de alimentos, las inclemencias del

tiempo, o las interacciones negativas. Por su parte, la relación H/L puede ser un indicador más persistente de la tensión asociada con una lesión o con los ciclos reproductivos y los cambios de estación, es decir, son indicativos de un estrés más generalizado, más relacionado con la zona donde habitan que con situaciones particulares.

En nuestro trabajo se ha observado, por una parte, una elevación de la cantidad de corticosterona en heces en Illescas (zona rural) frente a Madrid (urbana) y Nuevo Baztán (rural) (**Figura 6**). Por otra parte, la relación H/L está claramente elevada en Fuenlabrada y Madrid (urbanos) frente a El Escorial (rural) (**Figura 6**).

Como hemos dicho, la corticosterona en heces y la relación H/L refleja un estrés a medio y largo plazo respectivamente. Las diferencias encontradas en el caso de la corticosterona no parecen claras, sencillamente podrían deberse a una situación en particular de los animales de esta zona tal como un incremento en el número de personas que pasean por la zona de muestreo, mayor frecuencia de ruidos, etc.; además, este resultado está de acuerdo con el obtenido por Chávez-Zichinelli *et al.*, (2010) donde no encontraron diferencias en la corticosterona en heces de gorrión entre zonas más o menos urbanizadas. Por el contrario, las diferencias en la relación H/L son bastante razonables; recordemos que un aumento es indicativo de estrés crónico, es decir, está aumentado en zonas donde, de forma constante, los animales están sometidos a un mayor estrés, siendo en este caso mayor en zonas urbanas que en zonas más rurales.

Parece existir una relación clara entre el nivel socioeconómico de una zona y la tendencia poblacional de la especie, siendo esta más marcada en zonas de mayor estatus, explicándose esta diferencia desde distintos puntos (Shaw *et al.*, 2008). El primero, ya citado en el apartado del estado nutricional, indica que en las zonas de mayor poder adquisitivo los jardines tienen a ser pavimentados, así como los solares tienden a desaparecer por la construcción de nuevas estructuras, disminuyendo el número de lugares para la alimentación (Shaw *et al.*, 2008). Otro punto clave además de la alimentación es el alojamiento; en las nuevas edificaciones apenas existen estructuras que permitan la nidificación, con formas más lisas, menos oquedades (Wotton *et al.*, 2002). Una vez establecido, los individuos deben sobreponerse tanto de agresiones internas como externas; la mayor densidad poblacional favorece la transmisión de enfermedades (Ditchkoff *et al.*, 2006), así como la presencia de gatos en las zonas urbanas son un gran problema para las aves por su gran capacidad de caza (Woods *et*

al., 2003). Finalmente, no podemos olvidar la importancia de la presencia de contaminantes en la atmósfera, derivada de la actividad industrial y de la alta densidad de vehículos de las zonas más desarrolladas, con un mayor uso del transporte privado (Kekkonen *et al.*, 2012).

Centrándonos ahora en el apartado de la inmunología, también se han observado diferencias en la prueba de la hemólisis-hemaglutinación, en el recuento leucocitario y en la cuantificación de inmunoglobulinas totales.

La primera es una medida de la inmunidad innata; los gorriones son considerados una especie de vida rápida, por lo tanto invierten más en este tipo de inmunidad que en la adquirida (Neve *et al.*, 2010). La inmunidad innata consta de dos componentes humorales interrelacionados: las inmunoglobulinas innatas y el complemento (Matson *et al.*, 2005). En esta prueba, la hemólisis refleja la interacción entre el complemento y las inmunoglobulinas innatas, mientras que la hemaglutinación es reflejo de la actuación solo de las inmunoglobulinas (Matson *et al.*, 2005).

Se observa como los valores de lisis son mayores en Nuevo Baztán e Illescas, ambas zonas rurales, lo que indica que presentan una mayor cantidad de complemento. Se han encontrado asimismo diferencias entre sexos; por regla general los machos tienen más complemento, atribuido este hecho al efecto de las hormonas sexuales y al mayor gasto energético que supone para las hembras la puesta, debiendo priorizar su gasto energético (Parejo y Silva, 2009). Este resultado podría tener relación con la llamada “hipótesis de la tarjeta de crédito” de Shochat (2004); dicha teoría indica, por una parte, que al existir abundancia de alimento las aves mantienen un peso bajo porque si necesitan alimento saben que lo tendrán disponible (en palabras del autor, viven del crédito de futuros viajes para alimentarse); además, existe la tendencia de tener un mayor número de descendientes pero de “peor calidad”, ya que así hay mayor probabilidad de que alguno sobreviva, lo cual, unido a la baja alimentación que les aportan los padres, hace que estos presenten un estado general peor, reflejado por ejemplo en su sistema inmune.

Por el contrario, la aglutinación está elevada en zonas más urbanizadas, indicando una mayor cantidad de anticuerpos innatos. Una posible explicación puede ser que, ya que en las zonas urbanas existe una mayor prevalencia de enfermedades y parasitosis (Evans, 2009), y una mayor posibilidad de transmisión por la mayor densidad de individuos (Ditchkoff *et al.*, 2006) están siendo seleccionados favorablemente individuos que en su acervo genético portan la capacidad de tener una

mayor cantidad (y posiblemente variedad) de inmunoglobulinas, lo que les permitirá defenderse de las infecciones con mayor eficacia.

Observando ahora la cuantificación de inmunoglobulinas totales, se observa como en las zonas más urbanizadas su concentración es menor; este fenómeno está mucho más marcado en Fuenlabrada, donde además coincide que se encuentra el porcentaje más bajo de linfocitos (**Figura 8**). Esto sucede era de esperar ya que son los linfocitos los encargados de la producción de las inmunoglobulinas, en concreto los linfocitos B (Davison *et al.*, 2008). Se observa además una mayor cantidad de inmunoglobulinas en Illescas frente a otra zona rural como es Nuevo Baztán, una posible explicación es que en la zona de captura los individuos se encuentran muy relacionados con palomas, portadoras de gran variedad de microorganismos, con lo que por la facilidad de transmisión están más expuestos a patógenos y pueden haber sintetizado una mayor cantidad de inmunoglobulinas.

Los resultados de inmunoglobulinas innatas (aglutinación) e inmunoglobulinas totales pueden parecer contradictorios, ya que mientras que las primeras están elevadas en zonas urbanas las totales están disminuidas. El método seguido para la cuantificación de inmunoglobulinas en aves abarca las de tipo Y (mayoritarias), las M (innatas) y las A (Chávez-Zichinelli *et al.*, 2010); por ello es probable que este cambio se deba a que la cantidad relativa de M es pequeña con respecto al total; los individuos presentan una mayor capacidad inmune al nacer pero las condiciones del medio urbano afectan a su sistema inmune causando un descenso global de sus defensas.

Hasta este momento hemos barajado la hipótesis de que el estrés es el único factor que está afectando al sistema inmune; en los últimos años han aparecido evidencias que demuestran que los contaminantes ambientales pueden alterar la fisiología de las aves en general (Driver *et al.*, 2003). El efecto tóxico de muchas de estas sustancias suele manifestarse primero en el sistema inmune, ya que tiene efecto a concentraciones muy por debajo de las necesarias para manifestarse a otros niveles, causando daño directo mediante muerte celular y fallos en la producción de citoquinas e inmunoglobulinas, y otros indirectos a través de su efecto en el sistema endocrino (Martin *et al.*, 2010). La presencia de metales pesados es cada vez mayor en la atmósfera debido a los procesos industriales; este tipo de contaminantes son muy persistentes, siendo uno de sus efectos la inmunosupresión en aves (Swaileh y Sansur, 2006). El petróleo se encuentra entre los productos químicos que han sido implicados en la disfunción del sistema inmune en las aves: en pruebas de laboratorio en aves

acuáticas se ha demostrado que reduce la capacidad fagocítica y citotóxica de los monocitos y heterófilos, disminuye los mecanismos de defensa mediados por anticuerpos y disminuye el número de linfocitos; por otra parte, en pruebas de campo se ha observado una alta incidencia de enfermedades virales, micóticas y bacterianas en gran variedad de aves marinas que se recuperan tras vertidos de petróleo (Driver *et al.*, 2003). Además, el que estos contaminantes penetran en los gorriones es un hecho, ya que en su trabajo Dhananjayan *et al.*, (2011) demostró la presencia de pesticidas organoclorados en tejidos y huevos de gorrión común.

Como hemos podido observar, los gorriones de las zonas más urbanizadas presentan un peor estado nutricional e inmunológico y un mayor grado de estrés. El sistema inmune es uno de los mecanismos adaptativos más importantes y su estudio en animales silvestres permite conocer más sobre el medio en el cual desarrolla su vida cada individuo; por ello el estudio del sistema inmune en gorriones, especie muy adaptada al entorno urbano, pero ahora en regresión, es una poderosa herramienta para conocer como estamos modificando el medio, y como esta alteración afecta a los seres vivos, conocimiento clave a la hora de diseñar cualquier plan de conservación.

Este trabajo trata de ser un paso previo, un trabajo preliminar donde se ha intentado desarrollar técnicas basadas en la valoración del sistema inmune como indicativo del estado general de los gorriones. Trabajos posteriores se centrarán en el uso de estas mismas técnicas pero con un diseño de muestreo que permita establecer gradientes más sutiles, con claras diferencias entre un medio rural y uno urbano.

CONCLUSIONES

- ✓ Es posible establecer gradientes de urbanización entre localidades basados en valores de contaminación y demográficos.
- ✓ Las poblaciones de gorriones presentes en zonas con mayor grado de urbanización están sometidas a un mayor efecto de factores estresantes, reflejado en el aumento de la relación H/L.
- ✓ Las aves de zonas urbanas tienen una mayor prevalencia de anemia, reflejada en la disminución de la cantidad de hemoglobina y hematocrito.
- ✓ El estado nutricional de las poblaciones urbanas es peor que el de las rurales, tal y como refleja la menor cantidad de colesterol que presentan.
- ✓ La capacidad inmune está disminuida en individuos urbanos, haciéndoles más susceptibles a padecer enfermedades.

- ✓ Se puede decir que los gorriones de zonas rurales gozan de un mejor estado general que los de zonas urbanas; aunque existen muchas teorías son necesarios futuros estudios que aclaren que factor o factores estresantes están afectando a esta especie tan adaptada llegando a causar su descenso poblacional.
- ✓ La evaluación de la capacidad inmune es una herramienta muy potente para conocer como es el medio en el que vive un individuo, aportando una gran cantidad de información imposible de obtener de otra forma.
- ✓ El proceso de urbanización es irreversible, por tanto, es necesario comprender como afecta a los seres vivos de forma que se puedan establecer estrategias y patrones que eviten su desaparición total o parcial.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer el tiempo y esfuerzo dedicado por mis tutores, María Teresa Antonio y José Ignacio Aguirre. A este último además que me haya mostrado lo fantástico que es el trabajo de campo, en general, y el anillamiento científico, en particular.

A la gente del Museo Nacional de Ciencias Naturales, Fuenlabrada, Illescas, El Escorial y Nuevo Baztán por la ayuda prestada a la hora de llevar a cabo los muestreos.

Muchas gracias también a toda la gente del Departamento de Zoología y Antropología Física, ya que este año ha sido como mi segunda casa, no solo por todo tiempo pasado allí, sino por cómo me han hecho sentir. No es el único departamento al que estoy agradecido, ya que sin la ayuda de Bioquímica, Ecología, Microbiología y por supuesto Fisiología Animal II la mitad de los análisis no hubiesen podido realizarse.

A mis compañeros del Máster en Biología de la Conservación, por la de horas que hemos pasado juntos, y las que aún nos quedan.

A Amparo, por su confianza, su ánimo, su apoyo, y porque los fines de semana en el laboratorio yo solo se me hubiesen hecho mucho más duros.

Este trabajo ha sido financiado en parte por el programa de Financiación de Grupos de Investigación Santander-UCM 2011 (GR35/10-A-910577).

BIBLIOGRAFIA

- ✓ Balmori, A. & Hallberg, Ö. 2007. The Urban Decline of the House Sparrow (*Passer domesticus*): A Possible Link with Electromagnetic Radiation. *Electromagnetic Biology and Medicine* 26, 141-151.
- ✓ BirdLife International 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.1. Disponible en: <http://www.iucnredlist.org>
- ✓ BirdLife. 2004. *Birds in the European Union: a status assessment*. BirdLife International, Wageningen.
- ✓ Bonier, F. 2012. Hormones in the city: endocrine ecology of urban birds. *Hormones and Behavior* 61, 763-722.
- ✓ Bortolotti, G.R.; Marchant, T.A.; Blas, J. & German, T. 2008. Corticosterone in feathers is a long-term, integrated measure of avian stress physiology. *Functional Ecology* 22, 494-500.
- ✓ Chandler, R.B.; Strong, A.M. & Kaufman, C.C. 2004. Elevated lead levels in urban house sparrows: a threat to sharp-shinned hawks and merlins? *Journal of Raptor Research* 38, 62-68.

- ✓ Chávez-Zichinelli, C.A.; MacGregor-Fors, I.; Talamás, P.; Valdéz, R.; Romano, M.C. & Schondube, J.E. 2010. Stress responses of the House Sparrow (*Passer domesticus*) to different urban land uses. *Landscape and Urban Planning* 98, 183-189.
- ✓ CODA. (1993). Millones de animales mueren atropellados cada año en las carreteras españolas. *Quercus* 83, 12-19.
- ✓ Dandapat, A.; Banerjee, D. & Chakraborty, D. 2010. The case of the disappearing House Sparrow (*Passer domesticus indicus*). *Veterinary World* 3, 97-100.
- ✓ Davison, F.; Kaspers, B. & Schat, K.A. 2008. *Avian Immunology*. Elsevier, Great Britain.
- ✓ De Laet, J. & Summers-Smith, J.D. 2007. The status of the urban house sparrow *Passer domesticus* in north-western Europe: a review. *Journal of Ornithology* 148, S275-S278.
- ✓ De Neve, L.; Ibañez-Alamo, J.D. & M. Soler. 2010. Age-and sex-related morphological and physiological differences influence escape capacity in House Sparrows (*Passer domesticus*). *Canadian Journal of Zoology* 88, 1021-1031.
- ✓ Dhananjayan, V.; Muralidharan, S. & Ranapratap, S. 2011. Organochlorine pesticide residues in eggs and tissues of House Sparrow, *Passer domesticus*, from Tamil Nadu, India. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 87, 684-688.
- ✓ Ditchkoff, S.S.; Saalfeld, S.T. & Gibson, C.J. 2006. Animal behavior in urban ecosystems: modifications due to human-induced stress. *Urban Ecosystems*, 9: 5-12.
- ✓ Driver, C.; Jarrell, A.; Ollero, J.; Tiler, B.; Fulton, R.; Dennis, G.; Balbach, H.E. & Reinbold, K. 2004. Effects of fog oil smoke on immune responses in the House Sparrow (*Passer domesticus*) and Red-winged Blackbird (*Agelaius phoeniceus*). 32 páginas. US Army Corps of Engineers, Engineer Research and Development Center.
- ✓ Echeverría, A.I. & Vassallo, A.I. 2008. Novelty responses in a bird assemblage inhabiting an urban area. *Ethology* 114, 616-624.
- ✓ Evans, K.L.; Gaston, K.J.; Sharp, S.P.; McGowan, A.; Simeoni, M. & Hatchwell, B.J. 2009. Effects of urbanization on disease prevalence and age structure in blackbird *Turdus merula* populations. *Oikos* 118, 774-782.
- ✓ Fokidis, H.B.; Greiner, E.C. & Deviche, P. 2008. Interspecific variation in avian blood parasites and hematology associated with urbanization in a desert habitat. *Journal of Avian Biology* 39, 300-310.
- ✓ Gavett, A.P. & Wakeley, J.S. 1986. Blood constituents and their relation to diet in urban and rural house sparrows. *The Condor* 88, 279-284.
- ✓ Gering, J.C. & Blari, R.B. 1999. Predation on artificial bird nests along an urban gradient: predatory risk or relaxation in urban environments? *Ecography* 22, 532-541.
- ✓ Gil-Delgado, J.; Vives-Ferrándiz, C. & Tapiero, A. 2002. Tendencia decreciente de una población de Gorrión Común *Passer domesticus* en los naranjales del Este de España. *Ardeola* 49, 195-210.
- ✓ Gorshein, D. & Gardner, F.H. 1970. Erythropoietic activity of steroid metabolites in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 3, 564-568.
- ✓ Hawkey, C.M. & Dennett, T.B. 1989. *A color atlas of comparative veterinary hematology: normal and abnormal blood cells in mammals, birds and reptiles*. Wolfe Publishing Ltd, London.
- ✓ Kekkonen, J.; Hanski, I.K.; Väisänen, A. & Brommer, J.E. 2012. Levels of heavy metals in House Sparrows (*Passer domesticus*) from urban and rural habitats of southern Finland. *Ornis Fennica* 89, 91-98.
- ✓ Koivula, M.J. & Eeva, T. 2010. Metal-related oxidative stress in birds. *Environmental Pollution* 158, 2359-2370.
- ✓ Liker, A.; Papp, Z.; Bókony, V. & Lendvai, Á.Z. 2008. Lean birds in the city: body size and condition of house sparrows along the urbanization gradient. *Journal of Animal Ecology* 77, 789-795.
- ✓ Martin, L.B.; Hopkins, W.A.; Mydlarz, L.D. & Rohr, J.R. 2010. The effects of anthropogenic global changes on immune functions and disease resistance. *Annals of the New York academy of sciences* 1995, 129-148.

- ✓ Martínez, J.; Tomás, G.; Merino, S.; Arriero, E. & Moreno, J. 2003. Detection of serum immunoglobulin's in wild birds by direct ELISA: a methodological study to validate the technique in different species using antichickens antibodies. *Functional Ecology* 17, 700-706.
- ✓ Matson, K.D.; Ricklefs, R.E. & Klasing, K.C. 2005. A hemolysis-hemagglutination assay for characterizing constitutive innate humoral immunity in wild and domestic birds. *Developmental and Comparative Immunology* 29, 275-286.
- ✓ Meattini, F.; Prencipe, L.; Bardelli, F.; Giannini, G. & Tarli, P. 1978. The 4-hydroxybenzoate/4-aminophenazone chromogenic system used in the enzymatic determination of serum cholesterol. *Clinical Chemistry* 24, 2161-5.
- ✓ Molina, B. 2003. Gorrión Común *Passer domesticus*. En: Martí, R., del Moral, J. (Eds.): *Atlas de las aves reproductoras de España*, pp. 560-561. Dirección General de Conservación de la Naturaleza-Sociedad Española de Ornitología, Madrid.
- ✓ Møller, A.P.; Erritzøe, J. & Karadas, F. 2010. Levels of antioxidants in rural and urban birds and their consequences. *Oecologia* 163, 35-45.
- ✓ Murgui, E. & Macías, A. 2010. Population trends of the House Sparrow *Passer domesticus* in Valencia (Spain) from 1998 to 2008. *Bird Study* 57, 281-288.
- ✓ Murgui, E. 2009. Seasonal patterns of habitat selection of the House Sparrow *Passer domesticus* in the urban landscape of Valencia (Spain). *Journal of Ornithology* 150, 85-94.
- ✓ Murgui, E. 2011. Gorrión común – *Passer domesticus*. En: Salvador, A. & Morales, M.B. (Eds.): *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. <http://www.vertebradosibericos.org/>
- ✓ Natt, M.P. & Herrick, C.A. 1952. A new diluent for counting erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poultry Science* 31, 735-738.
- ✓ Parejo, D. & Silva, N. 2009. Immunity and fitness in a wild population of Eurasian kestrels *Falco tinnunculus*. *Naturwissenschaften* 96, 1193-1202.
- ✓ Pinilla, J. (Coord.). 2000. *Manual para el anillamiento científico de aves*. Seo/BirdLife y DGCN-MIMAM, Madrid, España.
- ✓ Raberg, L.; Grahn, M.; Hasselquist, D. & Svensson, E. 1998. On the adaptive significance of stress-induced immunosuppression. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 265, 1637-1641.
- ✓ Rodkey, F.L. 1956. Direct spectrophotometric determination of albumin in human serum. *Clinical Chemistry* 11, 478-87.
- ✓ Ruiz, G.; Rosenmann, M.; Novoa, F.F. & Sabat, P. 2002. Hematological parameters and stress index in rufous-collared sparrows dwelling in urban environments. *The Condor* 104, 162-166.
- ✓ SEO/BirdLife. 2010. *Estado de Conservación de las Aves en España 2010*. SEO/BirdLife, Madrid.
- ✓ Shaw, L.; Chamberlain, D. & Evans, M. 2008. The House Sparrow *Passer domesticus* in urban areas: reviewing a possible link between post-decline distribution and human socioeconomic status. *Journal of Ornithology* 149, 293-299.
- ✓ Shochat, E. 2004. Credit or debit? Resource input changes population dynamics of city-slicker birds. *Oikos* 106, 622-626.
- ✓ Siculo, M.; Tringali, M.; Orsi, F. & Santagostino, A. 2009. Porphyrin pattern and methemoglobin levels in *Columba livia* applied to assess toxicological risk by air pollution in urban areas. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 57, 732-740.
- ✓ Stagoll, K.; Manning, A.D.; Knight, E.; Fischer, J. & Lindenmayer, D.B. 2010. *Landscape and Urban Planning*, 98, 13-25.
- ✓ Svensson, L. 1996. *Guía para la identificación de los passeriformes europeos*. Sociedad Española de Ornitología, Madrid.
- ✓ Swaileh, K.M. & Sansur, R. 2005. Monitoring urban heavy metal pollution using the House Sparrow (*Passer domesticus*). *Journal of Environmental Monitoring* 8, 209-213.

- ✓ Tejada, A.; Téllez, G. & Galindo, F. 1997. Técnicas de medición de estrés en aves. *Veterinaria México* 28, 345-351.
- ✓ Touma, C. & Palme, R. 2005. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of validation. *Annals of New York Academy of Sciences* 1046, 54-74.
- ✓ Vleck, C.M.; Verticalini, N.; Vleck, D. & Bucher, T.L. 2000. Stress, corticosterone, and heterophil to lymphocyte ratios in free-living Adeline penguins. *The Condor* 102, 392-400.
- ✓ Woods, M.; McDonald, R.A.; Harris, S. 2003. Predation by domestic cats *Felis catus* in Great Britain. *Mammal Review* 33, 174-188.
- ✓ Wotton, S.R.; Field, R.; Langston, R.H.W.; Gibbons, D.W. 2002. Homes for birds: the use of houses for nesting by birds in the UK. *British Birds* 95, 586-592.