



Facultad de Ciencias Campus JGM  
Dpto. Ciencias Ecológicas  
Laboratorio de Ecología Evolutiva del Comportamiento

# **Factores ecológicos y ambientales relacionados con la distribución de malaria aviar en el chincol (*Zonotrichia capensis*) a lo largo de Chile.**

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los  
requisitos para optar al grado de  
Magíster en Ciencias Biológicas

Autor  
**Lucas Hussing Vidal**  
Mayo, 2020

Director de Tesis: Dr. Rodrigo Vásquez  
Co-director de Tesis: Dr. Juan Rivero de Aguilar

*Mira profundamente en la naturaleza  
y entonces comprenderás todo mejor.*

Albert Einstein

## RESUMEN BIOGRÁFICO



Lucas Hussing Vidal es Graduado en Biología por la Universidad de Murcia (España) y Educador e Intérprete Medioambiental por el Instituto Superior de Medio Ambiente (España). Interesado en la conservación biológica y la interacción ecológica. En 2016 se desplaza a Chile para continuar su formación a través del Magíster en Ciencias Biológicas (Universidad de Chile), donde entra a formar parte del Laboratorio de Ecología Evolutiva del Comportamiento (LEC) a cargo del Dr. Rodrigo Vásquez.

## AGRADECIMIENTOS

Ante todo, agradecer a mi tutor de tesis, el Dr. Rodrigo Vásquez, por aceptarme en su laboratorio y permitirme formar parte de su equipo de investigación, fomentando la comunicación y cooperación entre sus estudiantes. Gracias por la confianza depositada, dedicación y conocimientos. A mi co-tutor de tesis, el Dr. Juan Rivero de Aguilar, por su dedicación y pasión a la hora de transmitir sus conocimientos. Gracias por todas las horas dedicadas a mis dudas e inquietudes. Además, la obtención de las muestras pudo realizarse gracias al financiamiento de los proyectos FONDECYT 3170211 a cargo del Dr. Juan Rivero de Aguilar y AFB-170008-CONICYT-Chile, dirigido por el Dr. Rodrigo Vásquez.

A mis compañeros de laboratorio (convertidos ya en grandes amigos): Pablo Lamilla, Javier Bustos, Bárbara Toro, Sebastián Maya, Bárbara Bachmann, Jorge Mella, Carlos Valeris, Karina Romero, Daniel Benítez, Romina Flores, Pablo Cornejo, Juan David Arévalo, Gabriela Sudel y Martje Birker. Gracias por acogerme con tanto cariño. Habéis hecho de mi estancia en Chile una experiencia inolvidable. Os deseo lo mejor.

Gracias por supuesto a René, Jocelyn, Pancha y Penny por abrirme las puertas de su casa y dejarme formar parte de su familia durante mis dos años en Chile. Hicieron que esos miles de kilómetros que me separaban de mi familia pesaran mucho menos.

A mi mejor amigo, Miguel Abellán, por estar cuando ha tenido que estar y apoyarme a seguir mi camino. Tus ánimos y tirones de oreja siempre han ayudado.

Y por último, pero sólo para poder extenderme cómodamente, a mi familia. Gracias papá por apoyarme siempre en cualquier decisión tomada, por ser ejemplo de perseverancia, resiliencia, cariño y optimismo. Me has ofrecido lecciones y herramientas de vida con las que afrontar cualquier situación que se presente. Gracias también a mis hermanos Matías, Tomás y Lucía. No os hacéis idea de cuanto os admiro y de lo que aprendo de vosotros día tras día. La vida no pudo recompensarme con una familia mejor. Os quiero. Y a ti, mamá, por hacer de mí la persona que soy hoy...

## ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS .....	i
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ii
RESUMEN.....	iv
SUMMARY .....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS .....	5
2.1.    Objetivo general .....	5
2.2.    Objetivos específicos .....	5
3. HIPÓTESIS.....	6
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	7
4.1.    Área de estudio.....	7
4.2.    Colección de datos y preparación de muestras. ....	7
4.3.    Prevalencia de infección e identificación de parásitos sanguíneos hemosporidios. ....	8
4.4.    Caracterización de variables abióticas y bióticas. ....	8
4.5.    Análisis estadístico.....	9
5. RESULTADOS .....	11
5.1.    Prevalencia de infección e identificación de hemosporidios aviares.....	11
5.2.    Diversidad de parásitos sanguíneos hemosporidios. ....	13
5.3.    Relación del estado de infección por hemosporidios con las variables abióticas y bióticas.....	16
5.4.    Relación del estado de infección por <i>Haemoproteus</i> spp. con las variables abióticas y bióticas.....	18
5.5.    Relación del estado de infección por <i>Leucocytozoon</i> spp. con las variables abióticas y bióticas.....	20
6. DISCUSIÓN.....	23
6.1.    Prevalencia y distribución de hemosporidios aviares. ....	23
6.2.    Diversidad de hemosporidios aviares.....	29
7. BIBLIOGRAFÍA.....	33

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.-</b> Localidades muestreadas, incluyendo número de individuos de chincol muestreados por localidad, infección por género de hemosporidio, infecciones mixtas, porcentajes de infección y especie de hemosporidio identificada. ....	12
<b>Tabla 2.-</b> Selección del mejor modelo para explicar las infecciones por hemosporidios en el chincol ( <i>Z. capensis</i> ). ....	17
<b>Tabla 3.-</b> Modelos seleccionados para explicar las infecciones por <i>Haemoproteus</i> spp. en el chincol ( <i>Z. capensis</i> ). ....	19
<b>Tabla 4.-</b> Modelos seleccionados para explicar las infecciones por <i>Leucocytozoon</i> spp. en el chincol ( <i>Z. capensis</i> ). ....	21

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.-** Haemoproteus coatneyi parasitando eritrocitos. A, B) Gametocito en desarrollo; C) Macrogametocito maduro y gametocito en desarrollo; D) Macrogametocito completamente desarrollado. Las flechas gruesas rellenas señalan los macrogametocitos; las flechas gruesas sin relleno señalan los gametocitos en desarrollo; y las flechas finas identifican los gránulos de pigmentos (hemozoína) del interior del parásito. .... 13
- Figura 2.-** Haemoproteus erythrogravidus parasitando eritrocitos. A) Macrogametocito completamente desarrollado; B) Microgametocito completamente desarrollado. Las flechas gruesas rellenas identifican las protuberancias causadas en la membrana de los eritrocitos. Las flechas finas identifican los gránulos de pigmentos (hemozoína) del interior del parásito. .... 14
- Figura 3.-** Haemoproteus tartakovskyi parasitando eritrocitos. A, B) Macrogametocitos completamente desarrollados; C) Microgametocito completamente desarrollado. Las flechas finas identifican los gránulos de pigmentos (hemozoína) del interior del parásito. N – Núcleo de los eritrocitos desplazados lateralmente por el hemosporidio. .... 14
- Figura 4.-** Haemoproteus sp. 1 A, B) Macrogametocitos completamente desarrollados; C) Microgametocito completamente desarrollado. .... 15
- Figura 5.-** Leucocytozoon majoris parasitando una célula sanguínea. La flecha gruesa identifica al parásito. N – Núcleo del eritrocito deformado y desplazado lateralmente. Nótese la ausencia de hemozoína en el interior del parásito. .... 15
- Figura 6.-** Relación entre el estado de infección (media±error estándar) por hemosporidios y la ecorregión (D.A.= Desierto de Atacama, P.S.C.= Puna Seca Centroandina, M.Ch.= Matorral Chileno, B.T.V.= Bosque Templado Valdiviano, B.S.M.= Bosque Subpolar Magallánico). Los errores estándar se muestran en la escala de la función de vínculo logit. .... 17
- Figura 7.-** Relación entre el estado de infección (media±error estándar) por Haemoproteus spp. y la ecorregión (D.A.= Desierto de Atacama, P.S.C.= Puna Seca Centroandina, M.Ch.= Matorral Chileno, B.T.V.= Bosque Templado Valdiviano, B.S.M.=

Bosque Subpolar Magallánico). Los errores estándar se muestran en la escala de la función de vínculo logit. .... 19

**Figura 8.-** Relación entre el estado de infección (media±error estándar) por *Leucocytozoon* spp. con la ecorregión. (D.A.= Desierto de Atacama, P.S.C.= Puna Seca Centroandina, M.Ch.= Matorral Chileno, B.T.V.= Bosque Templado Valdiviano, B.S.M.= Bosque Subpolar Magallánico. Los errores estándar se muestran en la escala de la función de vínculo logit. .... 21

**Figura 9.-** Relación entre el estado de infección por *Leucocytozoon* spp. y la elevación del sitio de estudio (m s.n.m.). .... 22

## RESUMEN

La malaria aviar es una enfermedad causada por parásitos sanguíneos pertenecientes a los géneros protozoarios *Plasmodium*, *Haemoproteus* y *Leucocytozoon*. La transmisión comienza con la picadura de moscas y/o mosquitos hematófagos específicos para cada género de hemosporidio. Una vez en el interior del hospedador, los parásitos infectan órganos y células sanguíneas, produciendo la enfermedad. Numerosos estudios han evaluado los factores asociados a la transmisión y prevalencia de estas infecciones. Si bien estos estudios son relativamente abundantes en la región Holoártica no lo son tanto en el Neotrópico, y aún menos en la región austral de este último, región caracterizada por la distintiva diversidad de especies de aves y ecosistemas. Estas regiones biogeográficas son, por lo tanto, zonas de gran interés para el estudio de la evolución y la dinámica de transmisión de la malaria aviar, así como para la descripción de nuevas especies de parásitos.

En esta tesis se evaluó la prevalencia de las infecciones producidas por estos tres géneros de hemosporidios en el chincol (*Zonotrichia capensis* en Chile), y su relación con diferentes variables tanto bióticas como abióticas. Se observó que la prevalencia de las infecciones tanto por hemosporidios en general, como para los géneros *Haemoproteus* y *Leucocytozoon*, se encuentra relacionada principalmente con la ecorregión y con el aumento de la elevación con respecto al nivel del mar. No se detectó infecciones por *Plasmodium* spp. en el chincol a lo largo de Chile.

Se confirmó por primera vez a través de observación morfológica la presencia de *Haemoproteus coatneyi*, *Haemoproteus erythrogravidus* y *Leucocytozoon majoris* parasitando al chincol en Chile. Además, se detectó la presencia de la morfoespecie *Haemoproteus tartakovsky* por primera vez en el Neotrópico, al menos bajo microscopía óptica. Finalmente, una cuarta morfoespecie de *Haemoproteus* (*Haemoproteus* sp. 1) aún no descrita fue documentada en este trabajo.

## SUMMARY

Avian malaria is a disease caused by protozoan parasites belonging to the *Plasmodium*, *Haemoproteus* and *Leucocytozoon* genera. Transmission of the parasite to the host occurs through a specific vector for each genus of hemosporidia, which includes blood-sucking flies and mosquitoes. Once inside the host, the parasite travels to a target organ for its development before moving to the bloodstream, where it infects erythrocytes and from where it will be transferred to the vector to continue its life cycle. Numerous studies have evaluated what factors determine the prevalence of these infections and their effects on hosts. Although these studies are relatively abundant in the Holarctic region, they are not so abundant in the Neotropic region, where studies have only been carried out in natural populations of hosts for only a few years. The great diversity of birds associated with this biogeographic region make it an area of great interest to assess how the parasite-host dynamics have evolved and to describe new morphospecies of hemosporidia.

In this work, the prevalence of infections by these three genera of hemosporidia in the chincol (*Zonotrichia capensis*) in Chile was evaluated through different variables, both biotic and abiotic. It was observed that the prevalence of infections by both hemosporidia in general, and for the genera *Haemoproteus* and *Leucocytozoon*, was mainly related to the ecoregion and to the increase in elevation with respect to sea level. It was not detected *Plasmodium* spp. infections in the chincol throughout Chile.

Finally, it was confirmed for the first time through morphological observation the presence of *Haemoproteus coatneyi*, *Haemoproteus erythrogravidus* and *Leucocytozoon majoris* parasitizing the chincol in Chile. Furthermore, it was detected the presence of the morphospecies *Haemoproteus tartakovsky* for the first time in the Neotropic region, at least under light microscopy. A fourth morphospecies of *Haemoproteus* (*Haemoproteus* (*P.*) sp. 1) has been documented in this work, although it could not be identified at the species level through its morphological observation.

## 1. INTRODUCCIÓN

El parasitismo es la interacción ecológica entre dos organismos en donde uno (el parásito), obtiene recursos a costa del otro (hospedador). Esta interacción está presente en todos los ecosistemas y es de gran importancia pues afecta las estructuras y dinámicas poblacionales (Smith & Smith, 2007). La relación entre los parásitos y sus hospedadores resulta en procesos de estrecha relación y de coevolución que se mantienen a lo largo del tiempo (Smith & Smith, 2007). Como resultado los parásitos ejercen una fuerte presión evolutiva en las poblaciones de vertebrados, incluidas las aves. Estas últimas, debido a su ubiquidad y amplia distribución y al amplio rango de parásitos que las infectan constituyen modelos adecuados a la hora de estudiar las relaciones parásito-hospedador y las implicaciones tanto ecológicas como evolutivas dentro de esta relación (Ricklefs *et al.*, 2004, Bensch *et al.*, 2009, Rivero & Gandon, 2018).

Entre los parásitos que infectan a las aves, la malaria es una enfermedad que se detecta comúnmente en las aves silvestres. Esta enfermedad es producida por parásitos hemosporidios pertenecientes a los géneros *Plasmodium*, *Haemoproteus* y *Leucocytozoon* (Filo Apicomplexa). Los tres géneros conforman un grupo taxonómicamente diverso (Levine, 1988; Atkinson & Van Riper, 1991; Barbosa & Palacios, 2009) y con una distribución cosmopolita, habiéndose detectado desde las regiones tropicales y templadas (Levine, 1988) hasta la Antártica (Valkiūnas, 2005; Clark *et al.*, 2014). Si bien tradicionalmente el término malaria aviar se ha relacionado con los parásitos del género *Plasmodium*, actualmente hace referencia a las infecciones causadas por cualquiera de estos tres géneros (Pérez-Tris *et al.*, 2005; Martinsen *et al.*, 2007). Estos géneros están evolutivamente relacionados y comparten características que los diferencian de otros endoparásitos sanguíneos (Levine, 1985). Sin embargo, difieren en su morfología, ciclo vital y vectores que los transmiten (Valkiūnas, 2005). Mientras que *Plasmodium* es transmitido por especies de mosquitos de la familia Culicidae, *Haemoproteus* tiene como vector moscas de la familia Hippoboscoidea y Ceratopogonidae (Santiago-Alarcón *et al.*, 2012; Sehgal, 2015). En el caso de

*Leucocytozoon*, este es transmitido a través de moscas de la familia Simuliidae (Santiago-Alarcón *et al.*, 2012; Sehgal, 2015).

La malaria aviar suele producir enfermedades crónicas asintomáticas cuyos efectos son difíciles de detectar (Atkinson & Van Riper, 1991; Valkiūnas, 2005). Aún así, su patogenicidad es demostrada por la extinción de varias especies de aves (LaPointe *et al.*, 2010) y por los efectos negativos que produce en el hospedero. La patología varía según la especie de parásito y el hospedador (Matta & Rodríguez, 2001). Entre los efectos directos que estos parásitos causan a los hospedadores podemos destacar la anemia severa y la hemólisis intravascular (Matta & Rodríguez, 2011), dificultad para mantener una adecuada termorregulación (Atkinson & Van Riper, 1991) o inflamaciones del hígado y el bazo (Valkiūnas, 2005). Es por ello por lo que la malaria aviar se ha relacionado con procesos de selección sexual (Hamilton y Zuk, 1982) ya que la infección parasitaria puede traducirse en unos elevados costos para la reproducción y afectar, por lo tanto, a la evolución de los rasgos de historia de vida de las aves (Moller, 1997). Determinados rasgos conductuales como la migración (Atkinson & Van Riper, 1991) o la demanda energética durante la reproducción (véase Merino *et al.*, 2000) pueden producir un incremento de la parasitemia (o número de parásitos en sangre), consecuencia de la disminución en la actividad del sistema inmunitario. Un ejemplo de esto puede observarse a partir de los estudios de Ricklefs (1992) donde se relaciona la prevalencia de infección con los periodos de incubación. Es por esto último que es relevante citar a Valkiūnas (2005): “el impacto de los hemosporidios sobre sus hospedadores es extremadamente diverso y complejo, quedando claro que ninguno de los grupos de hemosporidios es neutro para sus hospedadores”.

La interacción entre los parásitos y sus hospedadores resulta en relaciones que varían en la especificidad y prevalencia de infección. Ciertas aves parecen ser más susceptibles a ser parasitadas que otras (Atkinson 2008 a). Por ejemplo, el Orden de los Paseriformes es el que presenta mayor número de especies parasitadas por hemosporidios (Atkinson & Van Riper, 1991) y con mayor diversidad de dichos parásitos (Valkiūnas, 2005). Entre los factores relacionados con la prevalencia de infección encontramos los gradientes latitudinales y altitudinales (Merino *et al.*, 2008, LaPointe *et al.*, 2010 y Doussang *et al.*,

2019), el tipo de hábitat (Sehgal, 2011; González-Quevedo *et al.*, 2014) o la diversidad de aves. En regiones tropicales, consideradas *hotspot* para dicha diversidad de hospedadores, se ha observado una gran diversidad de linajes hemosporidios, lo cuál podría explicarse por la mayor productividad de dichos ecosistemas (Phillips *et al.*, 1994). Para que la infección tenga lugar, el parásito debe encontrarse en la fase del ciclo biológico adecuada, el hospedador debe ser susceptible, el vector debe estar presente (y ser competente) y el ambiente ha de ser el adecuado (Sehgal, 2015).

La morfología y clasificación de los hemosporidios se estudia actualmente mediante la aplicación conjunta de técnicas microscópicas y moleculares basadas en la amplificación de ADN del parásito mediante PCR (*Polimerase Chain Reaction*). Las técnicas moleculares son una herramienta excelente para ampliar nuestro conocimiento acerca de la diversidad genética de hemosporidios y facilitan la detección e identificación de las especies parasitarias, sin embargo no deberían hacernos descartar el uso tradicional de la observación microscópica. Posiblemente el inconveniente más importante a destacar en el uso de la PCR sea el hecho de que, bajo infecciones mixtas (es decir, el hospedador aparece infectado por más de una especie diferente de hemosporidio), la PCR actúa de manera selectiva, ampliando ciertos linajes de parásitos y no detectando otros que podrían estar parasitando al hospedador (Zehtindjiev *et al.*, 2012). Además, con el uso exclusivo de la PCR es imposible detectar las diferentes etapas del ciclo de vida del parásito (Valkiūnas, 2005). Es por ello por lo que el uso de la técnica de microscopía aún sigue siendo una herramienta esencial para aumentar nuestro conocimiento sobre la diversidad de hemosporidios (Clark *et al.*, 2014). La microscopía óptica permite la identificación morfológica de los parásitos, las diferentes etapas del ciclo de vida del parásito (Valkiūnas, 2005), además de la detección de infecciones mixtas (infecciones debidas a más de un parásito). La aplicación de estas dos técnicas ha permitido la descripción de nuevos linajes de parásitos hemosporidios (Perkins & Schall, 2002; Santiago-Alarcón *et al.*, 2012). Como asegura Sehgal (2015), el uso de técnicas de microscopía, junto con el enfoque molecular, es el medio más seguro para confirmar las infecciones de parásitos sanguíneos, siendo la primera la aproximación que permite una caracterización morfológica de las especies de estudio.

En esta tesis, se estudiaron los parásitos de la malaria aviar que infectan al chincol *Zonotrichia capensis* en Chile, además de los factores relacionados con la prevalencia y distribución de estos parásitos. En Chile, el chincol es un passeriforme ampliamente distribuido desde el norte de Chile hasta la región de Magallanes y ocupa una gran diversidad de hábitats, desde zonas desérticas, pasando por zonas costeras y regiones andinas, hasta bosques y estepas patagónicas (Cueve *et al.*, 2016). El hecho de ocupar un amplio rango geográfico y una amplia diversidad de hábitats lo convierten en un buen modelo para estudiar como se ven afectados la prevalencia de las infecciones y la diversidad de hemosporidios tanto por factores bióticos como abióticos. Además, utilizando la clasificación morfológica por medio de microscopía óptica, identificamos la diversidad de hemosporidios asociada a este hospedador a lo largo de Chile.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo general**

Evaluar la diversidad, prevalencia y distribución de las infecciones por parásitos de la malaria aviar en el chincol a lo largo de Chile y los factores bióticos y abióticos relacionados con la infección.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Determinar la distribución, prevalencia y diversidad de las infecciones por malaria aviar de *Plasmodium* spp., *Haemoproteus* spp. y *Leucocytozoon* spp. en el chincol a lo largo de Chile.
- Evaluar el efecto de variables abióticas (latitud y elevación) y bióticas (ecorregión, diversidad de aves y estado reproductivo) en la distribución, prevalencia y diversidad de los parásitos de la malaria aviar.

### 3. HIPÓTESIS

La distribución, prevalencia y diversidad de las infecciones por parásitos de la malaria aviar (*Plasmodium* spp., *Haemoproteus* spp., y *Leucocytozoon* spp.) en el chicol estará negativamente relacionada con una mayor latitud y elevación debido, principalmente, a las condiciones ambientales que limitan el desarrollo de los vectores hemosporidios. Además, otros factores como el tipo de hábitat (favorables para el desarrollo de los vectores de la malaria aviar), una menor diversidad de especies hospedadoras o el estado reproductor del hospedador, se relacionarán con una mayor prevalencia de infección.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Área de estudio.**

El área de estudio comprendió desde el Norte Grande de Chile hasta la Región de Magallanes, cubriendo un rango latitudinal desde los 18° S hasta los 55° S y un rango altitudinal desde los 0 hasta los 3500 m s.n.m. (tabla 1). El muestreo se realizó entre abril de 2017 y julio de 2018 e incluyó un total de 12 localidades situadas en la Región de Arica y Parinacota, Región de Tarapacá, Región de Antofagasta, Región de Valparaíso, Región Metropolitana de Santiago y Región de Magallanes. Este muestreo formó parte de un proyecto mayor que pretende estudiar los efectos de la malaria aviar sobre la ecología del chincol.

### **4.2. Colección de datos y preparación de muestras.**

Un total de 108 individuos fueron capturados mediante redes de niebla siguiendo los procedimientos descritos en Pinilla (2000). Los muestreos se llevaron a cabo entre las 9:00 AM y las 6:00 PM. Cada individuo fue marcado con un anillo metálico alfanumérico individual para evitar duplicaciones en los muestreos. Para la preparación de los frotis, se obtuvo una muestra de sangre (10-20 microlitros) procedente de la vena braquial de los individuos, mediante punción con una aguja (23G) y utilizando microcapilares con heparina como anticoagulante. Posteriormente, una gota de sangre fue colocada en un portaobjetos y se procedió a su extensión utilizando los métodos descritos por Santiago-Alarcón & Carbó-Ramírez (2015). Tras cada jornada de muestreo, las muestras fueron fijadas en etanol 96%. Una vez en el laboratorio, se procedió a la tinción de los frotis con Giemsa, siguiendo los procedimientos descritos por Santiago-Alarcón & Carbó-Ramírez (2015).

#### **4.3. Prevalencia de infección e identificación de parásitos sanguíneos hemosporidios.**

La detección e identificación de los parásitos se llevó a cabo mediante la observación al microscopio óptico (Motic BA310) de los frotis sanguíneos. La prevalencia de infección se determinó como el número de individuos infectados por una especie de parásito determinada entre el número total de individuos observados (Margolis *et al.*, 1982). La prevalencia se calculó tanto para todo el conjunto de individuos como para cada localidad de muestreo. Para determinar el estado de infección de un individuo (infectado/no infectado), se siguió un procedimiento estandarizado que consistió en la observación, durante 30 minutos, de cada frotis con un aumento de 10x (véase Santiago-Alarcón & Carbó-Ramírez, 2015). De esta manera, pueden observarse tanto los hemosporidios de pequeño tamaño (*Plasmodium* spp. y *Haemoproteus* spp.) como los de mayor tamaño (*Leucocytozoon* spp.).

La determinación taxonómica y la diversidad de las especies se realizó con el aumento de 100x en aceite de inmersión y siguiendo la clave dicotómica de Valkiūnas (2005) junto con descripciones recientes de parásitos de malaria aviar en la región Neotropical (González *et al.*, 2015; Mantilla *et al.*, 2016; Lotta *et al.*, 2016, Cadena *et al.*, 2018). De cada parásito se obtuvieron varias fotografías al microscopio óptico.

#### **4.4. Caracterización de variables abióticas y bióticas.**

Las variables seleccionadas en este estudio incluyeron tanto variables abióticas como bióticas relacionadas con las infecciones por malaria aviar, ya sea por su efecto sobre la distribución y actividad de los mosquitos, sobre el parásito y/o sobre el propio hospedador. Las variables abióticas seleccionadas fueron: latitud, elevación y estación del año. Para cada individuo muestreado, se obtuvieron mediante geolocalización GPS valores de latitud, longitud y elevación. Las variables bióticas incluyeron la ecorregión, diversidad de aves y el estado reproductor. La ecorregión asociada a cada punto de muestreo se obtuvo a través de los datos provistos por Olson *et al.* (2001). La diversidad de aves, asociada a una ecorregión determinada, se obtuvo a través de los datos

provistos por Jenkins *et al.* (2013). Toda la información sobre las ecorregiones y la diversidad de aves asociada a estas está disponible, a través de distintas capas de información espacial, en la plataforma online Data Basin, una herramienta para la creación de mapas espaciales y análisis científico ofrecido por el Conservation Biology Institute (Oregón, EE.UU).

El estado reproductor se determinó mediante la observación de la protuberancia cloacal en machos, y del parche de incubación en hembras. En las aves, la cloaca es una estructura compartida tanto por el sistema excretor como reproductor. En los machos de chicol, cuando estos se encuentran en periodo reproductivo, la cloaca aumenta de tamaño adquiriendo forma de protuberancia bulbosa (Mason, 1938). En las hembras, el parche de incubación es el área libre de plumas y altamente vascularizada que ayuda a calentar los huevos durante la incubación, apareciendo durante dicho periodo de incubación y desapareciendo gradualmente una vez eclosionados los huevos. El estado de desarrollo de dicha placa se determinó utilizando el código numérico propuesto por Pinilla (2000). Cada individuo se asignó a las categorías “reproductor” o “no reproductor” en función de si presentaban alguna de las dos estructuras.

#### **4.5. Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los datos se realizó en R versión 3.6.1 (R Core Development Team, 2019). La relación entre las variables dependientes (infección total por hemosporidios e infección por cada género *Plasmodium*, *Haemoproteus* o *Leucocytozoon*) y las variables independientes (latitud, elevación, ecorregión, diversidad de aves, estado reproductivo y estación del año) fue estudiada mediante modelos lineales generalizados (GLM por sus siglas en inglés) con una distribución de errores tipo binomial y función de vínculo logit (Zuur *et al.*, 2007). Las variables dependientes de infección fueron introducidas como variables binarias (infectado/no infectado). La correlación entre las variables se evaluó mediante un análisis de multicolinealidad utilizando el factor de inflación de la varianza (VIF), eliminando de los análisis aquellas variables con  $VIF > 5$  (Fox, 2016). Posteriormente se llevó a cabo una selección de modelos mediante el criterio de información de Akaike corregido para muestras

reducidas (AICc). Este análisis selecciona los mejores modelos ( $\Delta AICc < 2$ ) de entre todos los modelos posibles (Burnham & Anderson, 2004). La inferencia de estos modelos se basó en sus pesos ( $W_i$ ), donde  $W_i$  representa la probabilidad relativa de cada modelo (Tellería, 2018). Por último, se obtuvo la importancia de cada variable según la suma de los pesos de los modelos en los que habían participado ( $\Sigma W_i$ ).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Prevalencia de infección e identificación de hemosporidios aviares.

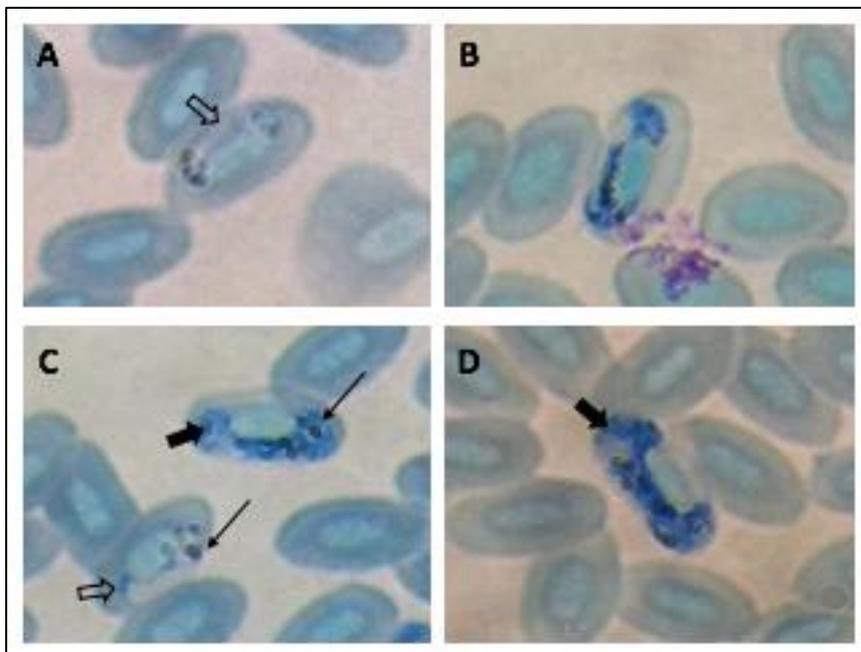
Considerando todos los géneros en conjunto, la prevalencia de infección fue del 28.03%. De los 108 individuos estudiados, 30 presentaban infección por alguno de los 3 géneros (Tabla 1). La prevalencia de infección para el género *Haemoproteus* fue del 13.08% (n=14), para el género *Leucocytozoon* fue del 13.08% (n=14), y para el género *Plasmodium* del 0% (Tabla 1). La prevalencia de infecciones mixtas (más de una especie de un mismo género) fue del 1.86% (n=2). La identificación morfológica resultó en cuatro morfoespecies de *Haemoproteus* (Figuras 1 a 4) y una morfoespecie de *Leucocytozoon* (Tabla 1, Figura 5).

**Tabla 1.-** Localidades muestreadas, incluyendo número de individuos de chincol muestreados por localidad, infección por género de hemosporidio, infecciones mixtas, porcentajes de infección y especie de hemosporidio identificada.

Localidad	Individuos infectados/examinados	<i>Plasmodium spp.</i>	<i>Haemoproteus spp.</i>	<i>Leucocytozoon spp.</i>	Infecciones mixtas	Especie de hemosporidio
Putre	1/10 (10%)	-	+	-	-	<i>H. erythrogravidus</i>
Arica	0/2 (0%)	-	-	-	-	
Codpa	0/5 (0%)	-	-	-	-	
Pica	0/6 (0%)	-	-	-	-	
San Pedro de Atacama	0/3 (0%)	-	-	-	-	
Carretera al Portillo	0/1 (0%)	-	-	-	-	
Farellones	2/5 (40%)	-	+	+	-	<i>Haemoproteus sp. 1, Leucocytozoon majoris.</i>
Plaza del Puma y Valle Nevado	1/1 (100%)	-	-	+	-	<i>Leucocytozoon majoris.</i>
P.N. San Carlos de Apoquimbo	4/6 (66.6%)	-	+	-	-	<i>H. tartakovskiyi, H. coatneyi, Haemoproteus sp. 1</i>
Quebrada de la Plata	6/23 (26.08%)	-	+	-	-	<i>H. erythrogravidus, H. coatneyi, Haemoproteus sp. 1</i>
El Yeso	0/7 (0%)	-	-	-	-	
Puerto Natales	3/10 (30%)	-	+	+	-	<i>H. coatneyi, Leucocytozoon majoris.</i>
Isla Navarino	13/28 (46.42%)	-	+	+	+	<i>H. coatneyi, H. tartakovskiyi, Leucocytozoon majoris</i>
Parque Estrecho de Magallanes	0/1 (0%)	0	0	0	0	
<b>Total</b>	<b>30/108 (28.03%)</b>	<b>0 (0%)</b>	<b>14 (13.08%)</b>	<b>14 (13.08%)</b>	<b>2 (1.86%)</b>	

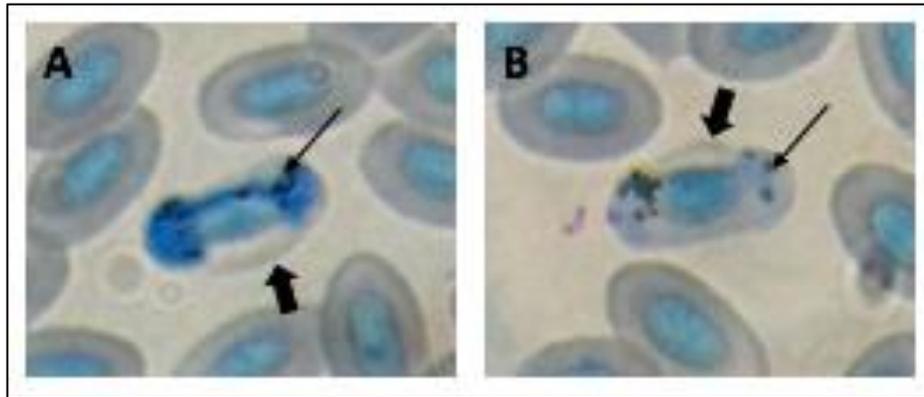
## 5.2. Diversidad de parásitos sanguíneos hemosporidios.

La observación al microscopio de los frotis sanguíneos resultó en la identificación de dos géneros de hemosporidios aviares parasitando al chicol: *Haemoproteus* y *Leucocytozoon*. No se observó *Plasmodium* en ningún individuo muestreado. Dentro del género *Haemoproteus*, se identificaron 4 morfoespecies diferentes: *Haemoproteus (Parahaemoproteus) coatneyi* (Burry-Caines & Bennet, 1992) (Figura 1), *Haemoproteus (Parahaemoproteus) erythrogravidus* (Mantilla et al., 2016) (Figura 2) y *Haemoproteus (Parahaemoproteus) tartakovskiyi* (Valkiūnas, 1986) (Figura 3). La cuarta morfoespecie de *Haemoproteus* fue identificada como *Haemoproteus* sp. 1 (Cadena-Ortiz et al. 2018) (Figura 4), ésta aún no descrita. Para el género *Leucocytozoon* únicamente se identificó una morfoespecie, la cual correspondió a *Leucocytozoon majoris* (Laveran, 1902) (Figura 5). Para el género *Haemoproteus*, se observaron diferentes estadios de desarrollo de los gametocitos infectando eritrocitos. Además, se pudo diferenciar también tanto microgametocitos como macrogametocitos (figura 1), a través de las diferencias morfológicas que provocan el dimorfismo sexual en las especies de este género.

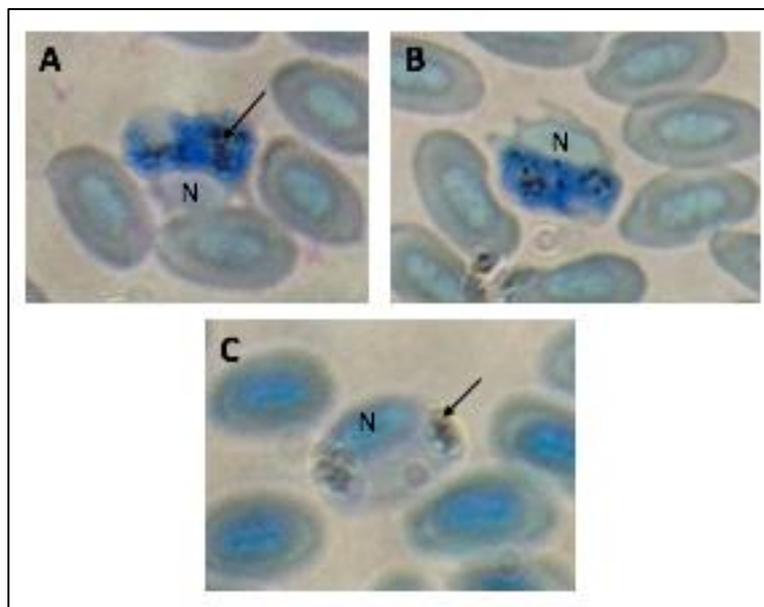


**Figura 1.-** *Haemoproteus coatneyi* parasitando eritrocitos. A, B) Gametocito en desarrollo; C) Macrogametocito maduro y gametocito en desarrollo; D) Macrogametocito completamente desarrollado. Las flechas gruesas rellenas señalan los macrogametocitos; las flechas gruesas sin relleno señalan los gametocitos en desarrollo;

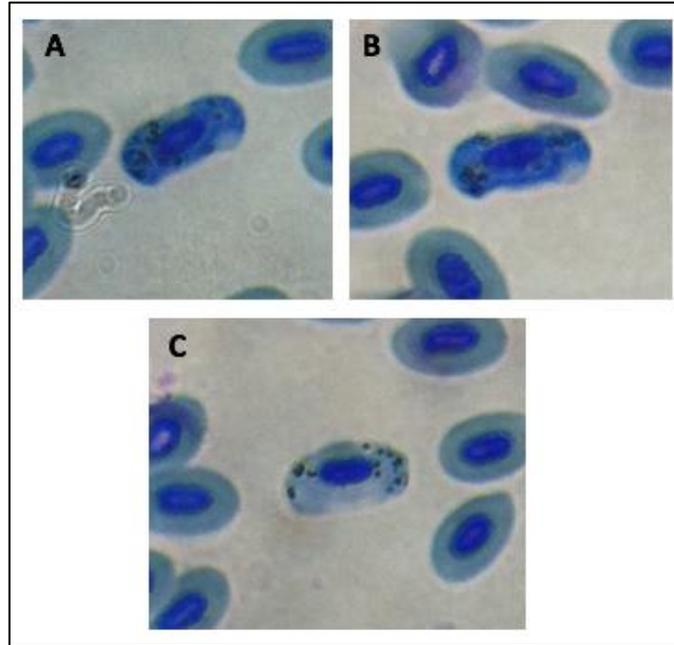
y las flechas finas identifican los gránulos de pigmentos (hemozoína) del interior del parásito.



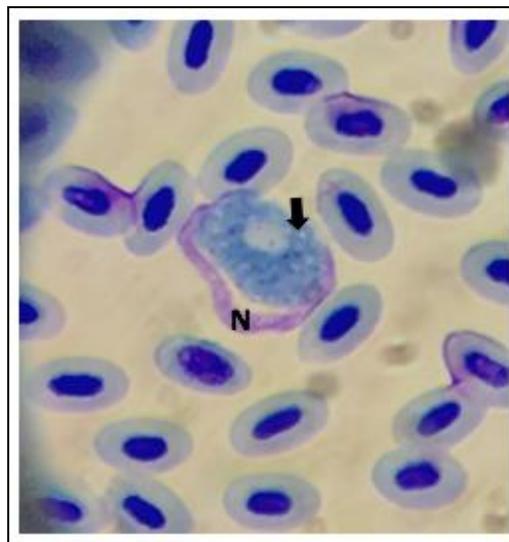
**Figura 2.-** *Haemoproteus erythrogravidus* parasitando eritrocitos. A) Macrogametocito completamente desarrollado; B) Microgametocito completamente desarrollado. Las flechas gruesas rellenas identifican las protuberancias causadas en la membrana de los eritrocitos. Las flechas finas identifican los gránulos de pigmentos (hemozoína) del interior del parásito.



**Figura 3.-** *Haemoproteus tartakovskyi* parasitando eritrocitos. A, B) Macrogametocitos completamente desarrollados; C) Microgametocito completamente desarrollado. Las flechas finas identifican los gránulos de pigmentos (hemozoína) del interior del parásito. N – Núcleo de los eritrocitos desplazados lateralmente por el hemosporidio.



**Figura 4.-** *Haemoproteus sp. 1* A, B) Macrogametocitos completamente desarrollados; C) Microgametocito completamente desarrollado.



**Figura 5.-** *Leucocytozoon majoris* parasitando una célula sanguínea. La flecha gruesa identifica al parásito. N – Núcleo del eritrocito deformado y desplazado lateralmente. Nótese la ausencia de hemozoína en el interior del parásito.

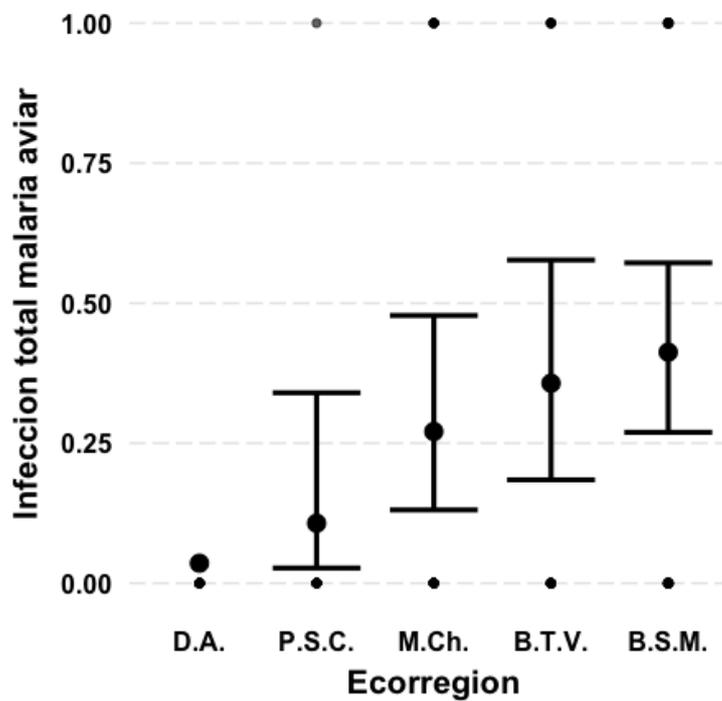
### **5.3. Relación del estado de infección por hemosporidios con las variables abióticas y bióticas.**

El modelo inicial incluyó todas las variables explicativas: latitud, elevación, ecorregión, diversidad de aves, estado reproductivo y estación del año. El análisis de multicolinealidad detectó que la diversidad de aves y la latitud estuvieron altamente correlacionadas, por lo que se eliminaron del modelo en orden secuencial. El modelo resultante quedó conformado con el estado de infección por hemosporidios como variable respuesta y la elevación, ecorregión, estado reproductivo y la estación del año como variables explicativas ( $d^2 = 16.61$ ). La selección de modelos resultó en un modelo final el cual retuvo la ecorregión como la variable explicativa con mayor relevancia para inferir las infecciones por hemosporidios en el chincol (Tabla 2). La prevalencia de infección por hemosporidios aumentó conforme nos desplazamos hacia ecorregiones más australes, siendo las ecorregiones del Bosque Templado Valdiviano y Bosque Subpolar Magallánico las que mayor prevalencia presentaron (Figura 6).

**Tabla 2.-** Selección del mejor modelo para explicar las infecciones por hemsporidios en el chincol (*Z. capensis*).

MODELO	1	IMPORTANCIA ( $\Sigma W_i$ )
INTERCEPTO	-17.5700	
ECORREGIÓN	+	1
AICc	122.7	
$\Delta AICc$	0.00	
Wi	0.431	
Devianza (%)	12.12	

Wi = peso del modelo correspondiente (probabilidad relativa de cada modelo);  $\Sigma W_i$  = importancia de cada variable en función de la suma de los pesos de los modelos en los que ha participado.



**Figura 6.-** Relación entre el estado de infección (media  $\pm$  error estándar) por hemsporidios y la ecorregión (D.A.= Desierto de Atacama, P.S.C.= Puna Seca Centroandina, M.Ch.= Matorral Chileno, B.T.V.= Bosque Templado Valdiviano, B.S.M.= Bosque Subpolar Magallánico). Los errores estándar se muestran en la escala de la función de vínculo logit.

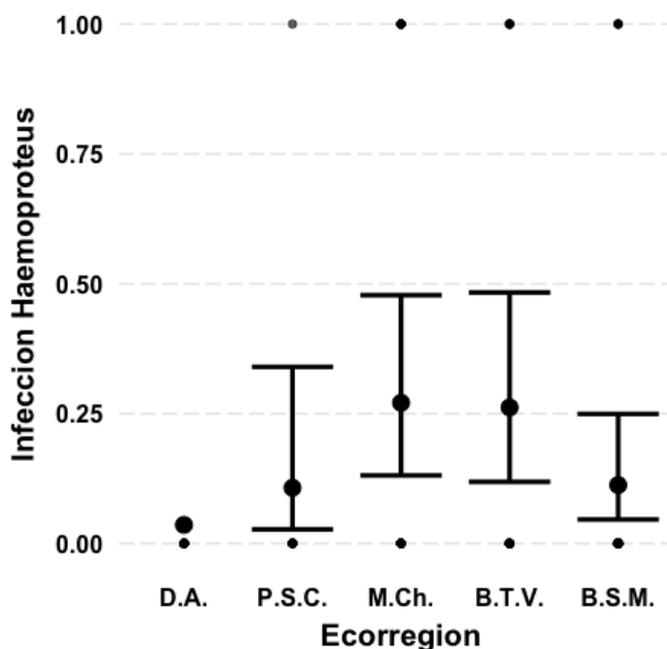
#### 5.4. Relación del estado de infección por *Haemoproteus* spp. con las variables abióticas y bióticas.

El modelo inicial incluyó todas las variables explicativas: latitud, elevación, ecorregión, diversidad de aves, estado reproductivo y estación del año. A partir de este modelo inicial, el análisis de multicolinealidad eliminó la diversidad de aves y la latitud. De esta forma, el modelo final quedó conformado con el estado de infección por *Haemoproteus* spp. como variable respuesta y la elevación, ecorregión, estado reproductivo y la estación del año como variables explicativas ( $d^2 = 17.69$ ). La selección de modelos resultó en 6 modelos que cumplieron el criterio de  $\Delta AICc < 2$  (Tabla 3). La ecorregión ( $\Sigma W_i = 0.60$ ) resultó la variable explicativa con mayor relevancia para inferir las infecciones por *Haemoproteus* spp. en el chincol, seguida de la elevación ( $\Sigma W_i = 0.31$ ) la estación del año ( $\Sigma W_i = 0.16$ ) y el estado reproductivo ( $\Sigma W_i = 0.11$ ). El modelo que mejor explica la variabilidad observada fue el modelo 1 ( $W_i = 0.164$ ), que incluyó únicamente la ecorregión como variable explicativa (Tabla 3). La prevalencia de las infecciones por *Haemoproteus* spp. mostró ser mayor en las ecorregiones del matorral chileno y el bosque templado Valdiviano, y disminuyen conforme nos desplazamos hacia el norte de Chile (ecorregiones del desierto de Atacama y puna seca centroandina) y hacia la Región de Magallanes (ecorregión del bosque subpolar magallánico) (Figura 7).

**Tabla 3.-** Modelos seleccionados para explicar las infecciones por *Haemoproteus* spp. en el chincol (*Z. capensis*).

INFECCIÓN POR <i>HAEMOPROTEUS</i>							
MODELO	1	2	3	4	5	6	
INTERCEPTO	-18.570	-17.240	-1.749	-19.340	-1.344	-1.566	IMPORTANCIA ( $\Sigma W_i$ )
ECORREGIÓN	+	+	-	+	-	-	0.60
ELEVACIÓN	-	-0.001	-	-	-	-0.0001	0.31
ESTACIÓN DEL AÑO	-	-	-	+	-	-	0.16
ESTADO REPRODUCTIVO	-	-	-	-	+	-	0.11
AICc	92.3	92.4	92.6	93.1	93.7	92.2	
$\Delta$ AICc	0.00	0.06	0.32	0.75	1.37	1.86	
$W_i$	0.164	0.159	0.140	0.112	0.083	0.065	
Devianza (%)	9.79	12.2	-	16.54	1.13	0.59	

$W_i$  = peso del modelo correspondiente (probabilidad relativa de cada modelo); " $\Sigma W_i$ " = importancia de cada variable en función de la suma de los pesos de los modelos en los que ha participado.



**Figura 7.-** Relación entre el estado de infección (media  $\pm$  error estándar) por *Haemoproteus* spp. y la ecorregión (D.A.= Desierto de Atacama, P.S.C.= Puna Seca Centroandina, M.Ch.= Matorral Chileno, B.T.V.= Bosque Templado Valdiviano, B.S.M.= Bosque Subpolar Magallánico). Los errores estándar se muestran en la escala de la función de vínculo logit.

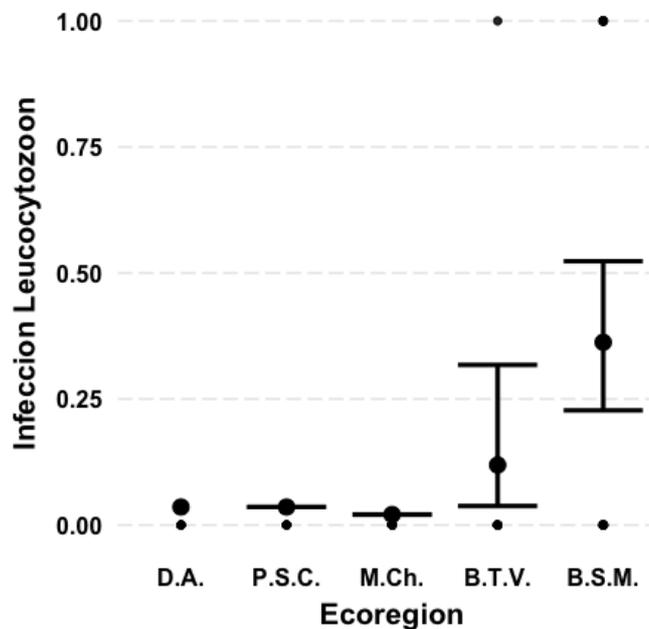
### 5.5. Relación del estado de infección por *Leucocytozoon* spp. con las variables abióticas y bióticas.

El modelo inicial incluyó todas las variables explicativas de latitud, elevación, ecorregión, diversidad de especies de aves, estado reproductivo y estación del año. A partir de este modelo inicial, el análisis de multicolinealidad detectó que la diversidad de especies de aves, la estación del año y la latitud estaban altamente correlacionadas por lo que fueron eliminadas del modelo. El modelo final quedó conformado con el estado de infección por *Leucocytozoon* spp. como variable respuesta y la elevación, ecorregión y el estado reproductivo como variables explicativas ( $d^2 = 34.36$ ). Tras la selección de modelos por AICc, de todas las combinaciones posibles, sólo tres modelos cumplieron el criterio de  $\Delta AICc < 2$  (Tabla 4). La ecorregión ( $\Sigma W_i = 1$ ) la elevación ( $\Sigma W_i = 0.74$ ) y el estado reproductivo ( $\Sigma W_i = 0.25$ ) se consideraron como las variables explicativas con mayor relevancia para inferir las infecciones por *Leucocytozoon* spp. en el chincol. El mejor modelo para explicar la variabilidad observada fue el modelo 1, que incluyó la ecorregión y la elevación como variables explicativas ( $W_i = 0.427$ ) (tabla 4). La prevalencia de las infecciones por *Leucocytozoon* spp. fue mayor en las ecorregiones australes. Concretamente, la ecorregión del bosque subpolar magallánico resulta ser la ecorregión con mayor prevalencia de infección (Figura 8). Además, la prevalencia de infección por este hemosporidio aumenta conforme nos desplazamos hacia elevaciones altas (Figura 9).

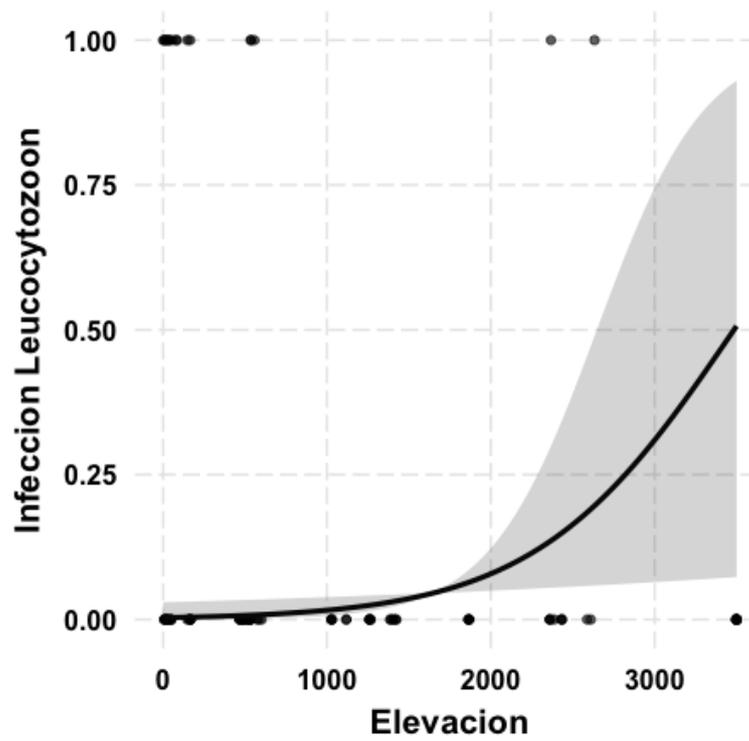
**Tabla 4.-** Modelos seleccionados para explicar las infecciones por *Leucocytozoon* spp. en el chincol (*Z. capensis*).

INFECCIÓN POR <i>LEUCOCYTOZOON</i>				
MODELO	1	2	3	IMPORTANCIA ( $\Sigma W_i$ )
INTERCEPTO	-22.660	-19.570	-23.590	
ECORREGIÓN	+	+	+	1
ELEVACIÓN	0.002	-	0.002	0.74
ESTADO REPRODUCTIVO	-	-	+	0.25
AICc	73.2	74.5	74.6	
$\Delta AICc$	0.00	1.33	1.41	
$W_i$	0.427	0.220	0.211	
Devianza (%)	33.39	29.45	34.36	

$W_i$  = peso del modelo correspondiente (probabilidad relativa de cada modelo);  $\Sigma W_i$  = importancia de cada variable en función de la suma de los pesos de los modelos en los que ha participado.



**Figura 8.-** Relación entre el estado de infección (media  $\pm$  error estándar) por *Leucocytozoon* spp. con la ecorregión. (D.A.= Desierto de Atacama, P.S.C.= Puna Seca Centroandina, M.Ch.= Matorral Chileno, B.T.V.= Bosque Templado Valdiviano, B.S.M.= Bosque Subpolar Magallánico. Los errores estándar se muestran en la escala de la función de vínculo logit.



**Figura 9.-** Relación entre el estado de infección por *Leucocytozoon* spp. y la elevación del sitio de estudio (m s.n.m.).

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1. Prevalencia y distribución de hemosporidios aviares.

En este estudio se evaluó la distribución, prevalencia y diversidad de parásitos de la malaria aviar (*Plasmodium*, *Haemoproteus*, y *Leucocytozoon*) en el chincol a lo largo de Chile. Como resultado se observó que la prevalencia de las infecciones se relacionó principalmente con la ecorregión. En este trabajo, se utilizó la ecorregión como medida para categorizar el tipo de hábitat y determinar su relación con la prevalencia de infección por hemosporidios. La ecorregión está asociada a una diversidad de fauna y flora determinada (Olson *et al.*, 2001) y su inclusión en los modelos es relevante para entender las interacciones parásito-hospedador ya que puede afectar la distribución de los vectores de la malaria (Rubio-Palis & Zimmerman, 1997). Cuando se consideró la prevalencia de infección en conjunto, esta aumentó hacia el sur, siendo las ecorregiones australes las que presentaron una mayor prevalencia. Sin embargo, cuando se estudió cada género por separado, la prevalencia por el género *Leucocytozoon* también fue mayor en las ecorregiones del sur de Chile (11.11% para el bosque templado valdiviano y 35.89% para el bosque subpolar magallánico), pero la prevalencia de infección de *Haemoproteus* spp. fue mayor en el centro de Chile (ecorregión de matorral chileno, con un 26.08%) y en el sur intermedio de Chile (ecorregión del bosque templado Valdiviano, con un 27.77%). En el caso de *Plasmodium* spp. no se detectó ningún individuo infectado. La ausencia de *Plasmodium* spp. en las muestras estudiadas puede deberse a varios factores, como la ausencia de vectores adecuados o la menor detectabilidad de *Plasmodium* spp. frente al resto de parásitos hemosporidios (Valkiūnas, 2005). La detección de *Plasmodium* spp. en frotis sanguíneos suele ser menor que para *Haemoproteus* spp. y *Leucocytozoon* spp. (Atkinson, C.T.; 2008b), siendo *Haemoproteus* spp. el hemoparásito más común dentro de las aves silvestres (Atkinson, C.T.; 2008a). Por otro lado, la coevolución de los hemosporidios con sus hospedadores también influiría en los niveles de prevalencia. Se ha observado que el género *Plasmodium* suele ser más generalista que las especies del género *Haemoproteus* (Moens & Pérez-Tris, 2016), lo que podría llevar a encontrar menos infecciones por hemosporidios en una

especie determinada de hospedador cuanto mayor sea la diversidad de especies hospedadoras en el ambiente. Doussang *et al.* (2019) observaron mayor porcentaje de prevalencia de infección por *Haemoproteus* spp. que por *Plasmodium* spp. en el chincol a lo largo de América del sur, concluyendo que la prevalencia de infección estaba muy marcada en función del género de hemosporidio.

El resultado de este trabajo, en su conjunto, coincide con los observados por Doussang *et al.* (2019), donde también se observó una mayor prevalencia de infección por *Haemoproteus* spp. en la región central de Chile, y con los de Merino *et al.* (2008) donde también observaron un patrón similar en las prevalencias de *Haemoproteus* spp. y *Plasmodium* spp. desde el centro de Chile hasta la región austral en varias especies de passeriformes. En el caso de *Leucocytozoon* spp., la prevalencia aumenta conforme nos desplazamos hacia el sur y aparece infectando comúnmente a aves en la región austral (Merino *et al.*, 2008) siendo, por tanto, un parásito característico de las aves australes. Se ha sugerido que la presencia de *Leucocytozoon* spp. estaría condicionada a la presencia de corrientes de agua o ríos (Valkiūnas, 2005; Merino *et al.*, 2008), las cuáles constituyen zonas donde sus vectores (dípteros simúlidos) encuentran las condiciones apropiadas para su desarrollo (Adler *et al.*, 2004). Los resultados de este trabajo apoyan esta hipótesis, en donde la presencia de estos cuerpos de agua sería un factor principal que explicaría las infecciones por *Leucocytozoon* spp. en la región austral. De este modo, las infecciones por este género de hemosporidio estarían muy limitadas por el ambiente y, además, por factores abióticos favorables de temperatura, humedad y precipitación (Forrester, D.J. & Greiner, E.C., 2008). Las ecorregiones del bosque templado valdiviano y bosque subpolar magallánico reúnen estas condiciones ambientales, pues se caracterizan por presentar un clima oceánico con precipitaciones a lo largo de todo el año y con condiciones de alta humedad y baja temperatura propiciadas por los vientos provenientes del océano Pacífico y el efecto de corrientes oceánicas como la corriente de Humboldt (para el bosque templado valdiviano) y la corriente circumpolar atlántica (para el bosque subpolar magallánico).

En cuanto al norte de Chile (ecorregiones del desierto de Atacama y Puna seca centroandina) son escasos los estudios que evalúen las infecciones por hemosporidios

en el chincol en estas regiones (Doussang *et al.* 2019, Martínez *et al.* 2016). Doussang *et al.* (2019) detectaron infecciones en el chincol por *Haemoproteus* spp. y *Plasmodium* spp. en la región del norte de Chile, pero no incluyeron al género *Leucocytozoon* spp. Sin embargo, Martínez *et al.* (2016) detectaron el parásito, pero no infectando al chincol sino al comesebo de los tamarugales (*Conirostrum tamarugense*), por lo que se detecta la presencia de *Leucocytozoon* spp. en la región. Por otro lado, Merino *et al.* (2008) estudiaron la prevalencia por hemosporidios en varias especies de aves en Chile, abarcando un rango latitudinal desde la región central hasta la región Magallánica. En este trabajo de tesis, se amplió por lo tanto el rango de estudio para los tres géneros de hemosporidios en el chincol hasta el Norte Grande descartando, hasta el momento, la presencia de *Leucocytozoon* spp. más al norte del desierto de Atacama, al menos en los individuos muestreados y en la época del año en la que se realizó el muestreo en esa región (invierno). A través de este estudio se sugiere que la ausencia de *Leucocytozoon* spp. en las ecorregiones del desierto de Atacama y de la Puna seca centroandina podría deberse a las limitaciones que un ambiente tan extremo tendría sobre los ciclos vitales de los vectores. Proyectos futuros deberían recoger datos en más localizaciones de la zona y durante todo el año para comprender mejor acerca de la distribución y prevalencia de estos hemosporidios en regiones con condiciones ambientales y ecológicas tan características.

Otra variable que resultó relevante tras la selección de los mejores modelos, aunque con menor importancia, fue la elevación. La prevalencia de infección, tanto en conjunto como para el género *Haemoproteus*, disminuyeron conforme aumentó la elevación. Sin embargo, las infecciones por *Leucocytozoon* spp. aumentaron con la elevación (Figura 9). Dicho aumento trae consigo una disminución de la temperatura e incluso un aumento de las precipitaciones en algunas regiones de alta montaña. LaPointe (2010) y Jones *et al.* (2013) detectaron diferencias en la prevalencia de hemosporidios a lo largo de un gradiente altitudinal en Perú y Hawái. Esto lo atribuyeron al efecto que las condiciones más extremas de estos ambientes de mayor altitud con respecto a los de menor altitud tienen en el desarrollo tanto del parásito como de sus vectores. Doussang *et al.* (2019) también observaron una limitación en la prevalencia de *Haemoproteus* spp. en el chincol a lo largo de Sudamérica, aunque en su estudio dicha prevalencia aumentó

hasta los 2200 m s.n.m. a partir del cual comenzó a disminuir. En el caso de *Leucocytozoon* spp., estudios anteriores han observado cómo la prevalencia de este género es mayor a altitudes altas (Imura *et al.*, 2012; van Rooyen *et al.*, 2013), lo cuál se ha atribuido a la capacidad de *Leucocytozoon* spp. de llevar a cabo sus ciclos vitales a bajas temperaturas (Valkiūnas, 2005) y puede ser la razón de que en este estudio se hayan encontrado algunos individuos infectados por este género en la zona de Farellones y del embalse El Yeso, dos localidades de alta montaña en la región central de Chile. Otro ejemplo que apoya el efecto positivo de las bajas temperaturas en la prevalencia de las infecciones por *Leucocytozoon* spp. puede verse en el trabajo de Hollmén *et al.* (1998) donde se estudia la prevalencia de este género de hemosporidio en individuos de ganso emperador (*Chen canagica*) en Alaska. Si bien el género *Leucocytozoon* podría estar menos limitado por las condiciones bajas de temperatura que el género *Haemoproteus*, los resultados obtenidos en este estudio pueden atribuirse al efecto que el conjunto de condiciones ambientales ofrecido por los hábitats australes de Chile tienen sobre la abundancia y distribución de sus vectores. Aunque los hábitats del sur donde tuvo lugar este estudio no se encuentran a altitudes altas, sí que comparten condiciones de temperatura, humedad y/o precipitación, lo que favorece el desarrollo de los vectores simúlidos, necesarios para completar el ciclo vital de *Leucocytozoon* spp.

El estado reproductivo de los hospedadores apareció, junto con la ecorregión y la elevación, como la tercera variable explicativa a tener en cuenta entre el conjunto de modelos seleccionados, tanto para el estudio de las prevalencias de infección por *Haemoproteus* spp. como por *Leucocytozoon* spp. El elevado gasto energético derivado de mantener conductas territoriales, ornamentos o condiciones físicas que reflejen un estado de salud adecuado, incubación de los huevos o el mantenimiento de las crías, lleva a los progenitores a un estrés fisiológico que puede afectar al sistema inmunológico (Sheldon & Verhulst, 1996). Se ha observado que, durante el periodo de reproducción, las defensas inmunológicas de los individuos pueden debilitarse (Siikamäki *et al.*, 1997; Merino *et al.*, 2000). En este caso, el sistema inmunológico no tendría la suficiente capacidad para controlar la infección (Westerdahl *et al.* 2011) y los hemosporidios encontrarían mayor probabilidad de salir a la sangre y ser transmitidos por sus vectores.

La transmisión suele coincidir con la actividad de los vectores, la cual depende de las condiciones ambientales de temperatura, humedad, y otras variables adecuadas, que permiten el desarrollo de sus ciclos vitales. Cuevas *et al.* (2020) atribuyen los altos porcentajes de prevalencia por hemosporidios encontrados en el rayadito (*Aphrastura spinicauda*) a que los datos fueron obtenidos durante la época reproductiva.

Otro factor importante ha tener en cuenta a la hora de estudiar tanto la distribución como la prevalencia de las infecciones por hemosporidios son los vectores. Existen pocos datos que ilustren la relación entre los vectores y las aves infectadas por hemosporidios en sistemas naturales, especialmente en la región Neotropical (Valkiūnas, 2005), siendo los estudios de LaPointe *et al.* (2010) llevados a cabo en las islas Hawái uno de los ejemplos más representativos acerca del efecto de las condiciones ambientales sobre el desarrollo de los vectores hemosporidios. La hipótesis del gradiente latitudinal de diversidad (LDG, por sus siglas en español) sostiene que existe un aumento en la diversidad de especies conforme nos desplazamos hacia la región del ecuador. Esta idea se aplicaría también a las poblaciones de vectores dípteros de la malaria aviar y podría explicar como tanto la riqueza parasitaria como la abundancia y diversidad de sus vectores aumenta conforme nos desplazamos hacia latitudes más bajas (Nunn *et al.*, 2005). Merino *et al.* (2008) atribuyeron en su estudio la ausencia de una relación significativa entre latitud y riqueza de parásitos a las barreras geográficas a las que está sometido Chile, y podría ser la razón por la que nuestros resultados no siguieron la idea central del LDG. Futuros estudios sobre hemosporidios en Chile deberían incluir las poblaciones de vectores en sus muestreos para aumentar el conocimiento acerca de los patrones de distribución y la relación entre hemosporidios y sus vectores.

De este modo, los resultados obtenidos en este estudio apoyan en parte la hipótesis planteada. Si bien en nuestra hipótesis la latitud y la diversidad de aves se consideró importante a la hora de explicar la distribución y prevalencia de las infecciones por parásitos hemosporidios, estas fueron eliminadas de los modelos debido a su elevada correlación con el resto de las variables independientes, por lo que no pudo observarse su efecto sobre las variables dependientes. Sin embargo, el tipo de hábitat (ecorregión),

el cuál sí fue incluido en los modelos seleccionados, podría utilizarse para observar el efecto latitudinal sobre estas variables. En este trabajo se planteó la hipótesis de que la distribución y prevalencia de las infecciones, tanto de hemosporidios en general como para cada uno de los tres géneros estudiados, disminuiría conforme nos desplazamos hacia latitudes más australes. Para el caso de las infecciones por *Haemoproteus* la hipótesis se cumple en parte, puesto que estas fueron mayores en las regiones centrales y disminuyeron conforme nos desplazamos hacia ecorregiones más ecuatoriales y australes. Esta disminución en la presencia de las infecciones por hemosporidios en las ecorregiones correspondientes a latitudes más bajas puede deberse al fuerte aislamiento geográfico al que está sometido Chile. El desierto de Atacama y las regiones de alta montaña de la cordillera de los Andes podrían ser ambientes igual de extremos para el desarrollo de los vectores que las regiones australes de mayor latitud. Para el caso del género *Leucocytozoon* la hipótesis no se cumplió, observándose un aumento de la prevalencia de dichas infecciones conforme nos desplazamos hacia latitudes mayores. Como se menciona anteriormente, esto podría explicarse debido a las condiciones favorables que estos ambientes tienen sobre el desarrollo de los vectores simúlidos de los que depende *Leucocytozoon* para su transmisión.

En cuanto a la elevación, la hipótesis no se cumplió puesto que sólo fue seleccionada en el modelo que explicaría la distribución y prevalencia de las infecciones por el género *Leucocytozoon*, aumentando dicha prevalencia conforme nos desplazamos hacia elevaciones mayores. Como se menciona anteriormente, esto podría explicarse debido a las condiciones similares de baja temperatura que tendrían dichas elevaciones con respecto a ecorregiones australes y que son una condición favorable para el desarrollo de los vectores simúlidos.

Por último, y tal como se plantea en la hipótesis, el estado reproductivo sí apareció como una variable a tener en cuenta a la hora de explicar la prevalencia y distribución de las infecciones por los hemosporidios del género *Haemoproteus* y *Leucocytozoon*, aunque su peso sobre el conjunto de modelos seleccionados para cada variable dependiente, y en relación con el resto de las variables independientes incluidas en dichos modelos, fue el más bajo.

## 6.2. Diversidad de hemosporidios aviares.

Mediante la observación de los frotis sanguíneos se pudieron identificar cuatro morfoespecies diferentes de *Haemoproteus* y una morfoespecie de *Leucocytozoon*. En concreto, en cuanto al género *Haemoproteus*, se identificaron las morfoespecies correspondientes a *Haemoproteus coatneyi*, *Haemoproteus erythrogravidus* y *Haemoproteus tartakovskiyi*. Este estudio identifica morfológicamente por primera vez a todas estas especies de hemosporidios en Chile. Para *H. tartakovskiyi*, no existen estudios previos que identifiquen a esta especie, al menos morfológicamente, en el Neotrópico. La identificación morfológica de las especies del género *Haemoproteus* pudo llevarse a cabo gracias a una serie de características propias que cada especie de dicho género desarrolla durante las etapas finales del desarrollo dentro de los eritrocitos, tanto de los microgametocitos como de los macrogametocitos (Valkiūnas, 2005; Mantilla et al., 2016). *H. coatneyi* y *H. erythrogravidus* pueden ser fácilmente diferenciados de *H. tartakovski* gracias a la forma de mancuerna o pesa que los primeros adquieren a medida que aumentan de tamaño dentro del eritrocito (Valkiūnas 2005; González et al., 2015). La ausencia de un desplazamiento notable del núcleo es otra característica para la identificación de *H. coatneyi* y *H. erythrogravidus*, aunque imágenes tomadas en otros estudios sobre identificación de estas especies en Colombia, junto con una posterior confirmación por PCR, sugieren que *H. coatneyi* puede desplazar al núcleo de los eritrocitos hasta la periferia de la célula hospedadora (González et al., 2015).

Dos especies de *Haemoproteus* (*H. coatneyi* y *H. erythrogravidus*), están muy emparentadas y parasitan a un mismo hospedador (*Z. capensis*), lo que sugiere que ambas especies han podido sufrir procesos de especiación simpátrica o una serie de procesos biogeográficos complejos (Mantilla et al., 2016). Aún así, morfológicamente pueden ser diferenciados gracias a dos aspectos principales: en primer lugar, la parte central de *H. erythrogravidus* puede llegar a ser muy delgada ( $\leq 1$  micra), en comparación con la de *H. coatneyi* (Mantilla et al., 2016). En segundo lugar, *H. erythrogravidus* provoca una protuberancia, o “*gravid*” como se conoce en inglés, en el citoplasma del eritrocito del lado opuesto a donde se sitúa el parásito (Mantilla et al., 2016), siendo esta la característica que da nombre a la especie.

*H. tartakovskiy* es una especie de hemosporidio cuya distribución tradicionalmente se ha asociado únicamente al paleártico, infectando especies como el piquituerto (*Loxia curvirostra*), el picogordo (*Coccothraustes coccothraustes*) o el lúgano (*Spinus spinus*) (Valkiūnas, 2005). En este estudio, confirmamos por primera vez la presencia de este parásito en el Neotrópico, al menos bajo una observación morfológica. *H. tartakovskiy* se diferencia de las anteriores especies de *Haemoproteus* principalmente por provocar en el eritrocito una hipertrofia en anchura, es decir, no cambiando el tamaño del eritrocito en el plano longitudinal pero sí en el eje transversal (Valkiūnas, 2005). Esta hipertrofia es causada por el gran tamaño que los macro- y micro-gametocitos completamente desarrollados adquieren en la célula hospedadora. Otra consecuencia del gran tamaño de esta especie es el desplazamiento (primero lateral y después apical) del núcleo del eritrocito hasta llegar a enuclear a la célula hospedadora (Valkiūnas, 2005).

Una cuarta morfoespecie de *Haemoproteus* se observó infectando al chincol en este estudio. Sin embargo, la baja intensidad de infección y la falta de suficientes estadíos de desarrollo del parásito en las muestras en las que se observó dificultaron su identificación a nivel de especie. Esta morfoespecie presenta características morfológicas que no son atribuibles a las otras especies de *Haemoproteus* observadas en este estudio (por ejemplo, el parásito rodea completamente al núcleo de los eritrocitos infectados o no existe un desplazamiento evidente del núcleo de la célula infectada). Estos rasgos morfológicos son similares a los observados por Cadena-Ortíz *et al.* (2018), en cuyo estudio catalogaron a la morfoespecie como *Haemoproteus (P) sp. 1*, describiendo a la morfoespecie como un linaje molecular aún no descrito a nivel morfológico.

Para el caso del género *Leucocytozoon*, la baja intensidad de las infecciones dificultó que se pudieran observar de manera clara los diferentes estadíos del desarrollo de los gametocitos. Sin embargo, dada las particularidades morfológicas encontradas en las formas adultas de las especies de *Leucocytozoon* que aparecieron parasitando al chincol, se identificó a esta morfoespecie con *Leucocytozoon majoris*. Entre las características morfológicas para la clasificación de esta especie destacan la forma redondeada de los

gametocitos completamente desarrollados y la disposición y forma del núcleo del eritrocito infectado, el cuál ocupa más de la mitad del eritrocito y aparece rodeando al núcleo del parásito (Valkiūnas, 2005). *L. majoris* es una especie de *Leucocytozoon* que se describió por primera vez en Europa en el carbonero común (*Parus major*) y del que toma su nombre. Estudios recientes identificaron a esta especie de hemosporidio infectando aves en el Neotrópico (Lotta *et al.*, 2016). En Chile no existen registros que identifiquen morfológicamente a las infecciones por esta especie de hemosporidio, pero las condiciones ambientales de alta montaña donde Lotta *et al.* (2016) obtuvieron sus registros podrían ser similares a las condiciones andinas del centro de Chile y los ecosistemas del sur (donde tuvieron lugar los registros de infecciones por *L. majoris* en este estudio), al menos en cuanto a temperatura se refiere. Si bien las bajas temperaturas son un factor limitante para el desarrollo de muchas especies de hemosporidios (LaPointe *et al.*, 2010), el género de *Leucocytozoon* se ha visto que está adaptado para desarrollarse por debajo de los 15°C (Valkiūnas, 2005), por lo que este factor no debiera ser limitante para que tenga lugar la transmisión de *Leucocytozoon* sp. (Lotta *et al.*, 2016), siempre y cuando el vector esté presente en el ambiente. Estudios futuros que evalúen las infecciones por *Leucocytozoon* sp. a través de la morfología de los parásitos son tremendamente importantes para conocer más acerca de su diversidad en el Neotrópico. Lotta *et al.* (2019) destacan que secuencias genéticas de *Leucocytozoon* detectadas en el Neotrópico permanecen sin estar asociadas aún a una morfología determinada. Análisis moleculares complementarios deberían llevarse a cabo para confirmar estas infecciones por hemosporidios y asociar las morfoespecies encontradas con secuencias genéticas determinadas.

Cabe destacar, que al igual que el uso de métodos únicamente moleculares pueden llegar a ser insuficiente en algunos casos para estudiar la diversidad de hemosporidios en poblaciones de hospedadores, sobretodo bajo infecciones mixtas, inferir la diversidad de especies de hemosporidios únicamente bajo una observación morfológica también puede llegar a ser insuficiente. Entre las razones de esto último, destaco dos: (i) la identificación morfológica requiere de un conocimiento y una experiencia suficiente como para no descartar infecciones en aquellos individuos con una carga parasitaria baja, y además, (ii) en muchos casos, las diferencias morfológicas entre

especies de hemosporidios no son fácilmente identificables, debiéndose obtener un número y una calidad de imágenes de los parásitos suficiente como para su evaluación mediante programas específicos que midan los tamaños y las dimensiones de cada una de estas características. Para confirmar los resultados obtenidos en este estudio, son necesarios evaluaciones moleculares complementarias que ayuden a mejorar nuestro conocimiento sobre la prevalencia y las distribuciones de los hemosporidios aviares a lo largo de Chile.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Atkinson C.T. & Van Riper III C. (1991).** Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: Plasmodium, Leucocytozoon and Haemoproteus. En Loye J.E. and Zuk M. (Eds.). *Bird-Parasite Interactions. Ecology, Evolution and Behaviour* pp. 20-48. Oxford University Press, New York (USA).
- Atkinson C.T. (2008) a.** Haemoproteus. En Atkinson, C.T., Thomas, N. J.& Hunter, D. B. (Eds.). *Parasitic Diseases of Wild Birds*. pp. 13-34. Wiley-Blackwell, Iowa (USA)
- Atkinson C.T. (2008) b.** Avian malaria. En Atkinson, C.T., Thomas, N. J.& Hunter, D. B. (Eds.). *Parasitic Diseases of Wild Birds*. pp. 35-53. Wiley-Blackwell, Iowa (USA).
- Barbosa A. & Palacios M.J. (2009).** Health of Antarctic birds: a review of their parasites, pathogens and diseases. *Polar Biology*, 32: 1095-1115.
- Bensch S., Hellgren O. & Pérez-Tris J. (2009).** MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome-b lineages. *Molecular Ecology Resources*, 9: 1353-1358.
- Burnham K.P. & Anderson D.R. (2004).** Multimodel inference: understanding AIC and BIC in model selection. *Sociological Methods & Research*, 33: 261-304.
- Cadena-Ortiz H., Mantilla J.S., Rivero de Aguilar J., Flores D., Bahamonde D., Matta N.E. & Bonaccorso E. (2018).** Avian haemosporidian infections in rufous-collared sparrows in an Andean dry forest: diversity and factors related to prevalence and parasitaemia. *Parasitology*, 146 (6): 765-773.
- Clark N.J., Clegg S.M. & Lima M.R. (2014).** A review of global diversity in avian haemosporidians (*Plasmodium* and *Haemoproteus: Haemosporida*): new insights from molecular data. *International Journal of Parasitology*, 44: 329-338.
- Couve E., Vidal C.F. & Ruíz J. (2016).** Aves de Chile. Sus Islas oceánicas y Península Antártica. Una guía de campo ilustrada. Chile: F.S. Editorial: Punta Arenas.
- Cuevas E., Vianna J.A., Botero-Delgadillo E., Doussang D., González-Acuña D., Barroso O., Rozzi R., Vásquez R.A. & Quirici V. (2020).** Latitudinal gradients of haemosporidian parasites: Prevalence, diversity and drivers of infection in the

- Thorn-tailed Rayadito (*Aphrastura spinicauda*). *IJP: Parasites and wildlife*, 1: 1-11-
- Doussang D., González-Acuña D., Torres-Fuentes L.G., Loughheed S.C. Clemente-Carvalho R.B., Connelly Greene K. & Vianna J.A (2019).** Spatial distribution, prevalence and diversity of haemosporidians in the rufous-collared sparrow, *Zonotrichia capensis*. *Parasites Vectors*, 12 (2).
- Forrester D.J. & Greiner E.C. (2008).** Leucocytozoonosis. En Atkinson, C.T., Thomas, N. J.& Hunter, D. B. (Eds.). *Parasitic Diseases of Wild Birds*. pp. 54-108. Wiley-Blackwell, Iowa (USA).
- Fox, J. (2016).** *Applied Regression Analysis and Generalized Linear Models*, Third Edition. Sage, California (USA).
- González A.D., Lotta I.A., García L.F., Moncada L.I. & Matta N.E. (2015).** Avian haemosporidians from Neotropical highlands: Evidence from morphological and molecular data. *Parasitology International*, 64: 48-59.
- González-Quevedo C., Davies R.G., Richardson D.S. (2014).** Predictors of malaria infection in a wild bird population: landscape-level analyses reveal climatic and anthropogenic factors. *Journal of Animal Ecology*, 83: 1091-1102.
- Hamilton W. D. & Zuk M., (1982).** Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? *Science* 218: 384-387.
- Hollmén T.E., Franson J.C., Creekmore L.H., Schmutz J.A. & Fowler A.C. (1998).** Leucocytozoon simondi in emperor geese from the Yukon-Kuskokwim delta in Alaska. *Condor*, 100: 402-404.
- Imura T., Suzuki Y., Ejiri H., Sato Y., Ishida K., Sumiyama D., Murata K. & Yukawa M. (2012).** Prevalence of avian haemotozoa in wild birds in a high-altitude forest in Japan. *Vet Parasitol*, 183: 244-248.
- Jenkins C. N., Pimm S. L., & Joppa L. N. (2013).** Global patterns of terrestrial vertebrate diversity and conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(28), E2603–E2610.

- LaPointe DA, Goff ML, Atkinson CT (2010).** Thermal constraints to the sporogonic development and altitudinal distribution of avian malaria *Plasmodium relictum* in Hawai'i. *Journal of Parasitology*, 96: 318–324
- Levine N.D. (1985).** Phylum Ampicomplexa. En Lee J.J., Hunter S.H. & Bovee E.C. (Eds.). Illustrated guide of the protozoa. pp. 322-347. Society of Protozoology, Lawrence (Kansas)
- Levine N.D. (1988).** The protozoan *phylum Apicomplexa*, Vol. II. CRC Press, Boca Raton (Florida).
- Lotta I.A., Valkiūnas G., Pacheco M.A., Escalante A.A., Hernández S.R. & Matta N.E. (2019).** Disentangling *Leucocytozoon* parasite diversity in the neotropics: Descriptions of two new species and shortcomings of molecular diagnostics for leucocytozoids. *Parasites and Wildlife*, 9: 159-173.
- Mantilla J.S., González A.D., Lotta I.A., Moens M., Pacheco M.A., Escalante A.A., Valkiūnas G., Moncada L.I., Pérez-Tris J. & Matta N.E. (2016).** Haemoproteus erythrogravidus n. sp. (Haemosporida, Haemoproteidae): Description and molecular characterization of widespread blood parasite of birds in South America. *Acta tropica*, 159: 83-94
- Margolis L., Esch G.W., Holmes J.C., Kuris A.M. & Schad G.A. (1982).** The use of ecological terms in parasitology (Report of an ad hoc committee of the American Society of Parasitologists). *The Journal of Parasitology*, 68 (1): 131-133.
- Martínez J., Vásquez R.A., Marqués A., Díez-Fernández A. & Merino S. (2015).** The prevalence and molecular characterisation of blood parasites infecting the vulnerable Tamarugo conebill (*Conirostrum tamarugense*) and other birds in the Pampa del Tamarugal, Chile. *Emu – Austral Ornithology*, 116 (3): 310-314.
- Martinsen E.S., Perkins S.L. & Schall J.J. (2008):** A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): Evolution of life-history traits and host switches. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 47 (1): 261-273.
- Mason E.A. (1938).** Determining sex in living bird. *Bird-Banding*, 9: 46-48.

- Matta N. & Rodríguez O. (2001).** Hemoparásitos aviares. *Acta Biológica Colombiana*, 6 (1): 27-34.
- Merino S., Moreno J., Sanz J. J. & Arriero E. (2000).** Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). *Proc. Biol. Sci.* 267: 2507-2510.
- Merino S., Moreno J., Vásquez RA., Martínez J., Sánchez-Monsálvez I., Estados CF., Ippi S., Sabat P., Rozzi R. & McGehee S. (2008).** Haematozoa in forest birds from southern Chile: latitudinal gradients in prevalence and parasite lineage richness. *Austral Ecology*, 33: 329–40.
- Moens M. A. J. & Pérez-Tris J. (2016).** Discovering potential sources of emerging pathogens: South America is a reservoir of generalist avian blood parasites. *International Journal of Parasitology*, 46: 41–49.
- Moller A. P. (1997).** Parasitism and the evolution of host life history. En D. H. Clayton & J. Moore (Eds.). *Host-parasite evolution*, pp. 105-127. Oxford University Press, New York.
- Nunn C. L., Altizer S. M., Sechrest W. & Cunningham A. A. (2005).** Latitudinal gradients of parasite species richness in primates. *Divers. Distrib.* 11, 249–56.
- Olson D. M., Dinerstein E., Wikramanayake E. D., Burgess N. D., Powell G. V. N., Underwood E. C., D'amico J. A., Itoua I., Strand H. E., Morrison J. C., Loucks C. J., Allnutt T. F., Ricketts T. H., Kura Y., Lamoreux J. F., Wettengel W. W., Hedao P., & Kassem K. R. (2001).** Terrestrial Ecoregions of the World: A New Map of Life on Earth. *BioScience*, 51(11), 933-938.
- Pérez-Tris J., Hasselquist D., Hellgren O., Krizanauskiene A., Waldenström J. & Bensch S. (2005).** What are malaria parasites? *Trends in Parasitology*, 51 (5): 209-211.
- Perkins S.L. & Schall J.J. (2002).** A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome-b gene sequences. *The Journal of Parasitology*, 88 (5): 972-978.
- Phillip O., Hall P., Gentry A.H., Sawyer S., Vasquez R. (1994).** Dynamics and species richness of tropical rain forests. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America*, 91: 2805-2809.

- Pinilla J. (Coord.) 2000.** Manual para el anillamiento científico de aves. SEO/BirdLife y DGCN-MIMAM. Madrid.
- R Studio Team (2019).** R Studio: Integrated Development for R. R Studio, Inc., Boston, MA. URL <http://www.rstudio.com/>
- Ricklefs R.E., Fallon S.M. & Bermingham, E. (2004).** Evolutionary relationships, cospeciation, and host switching in avian malaria parasites. *Syst. Biol*, 53: 111-119.
- Rivero A. & Gandon S. (2018).** Evolutionary Ecology of Avian Malaria: Past to Present. *Trends in Parasitology*, 34 (8): 712-726.
- Rivero de Aguilar J., Castillo F., Moreno A., Peñafiel N., Browne L., Walter ST., Karubian J. & Bonaccorso E. (2018).** Patterns of avian haemosporidian infections vary with time, but not habitat, in a fragmented Neotropical Landscape. *PLoS ONE* 13 (10): e0206493.
- Rooyen J.V., Lalubin F., Glaizot O. & Christe P. (2013).** Altitudinal variation in haemosporidian parasite distribution in great tit populations. *Parasites Vectors*, 6: 139-149.
- Rubio-Palis Y. & Zimmerman R.H. (1997).** Ecoregional Classification of Malaria Vectors in the Neotropics. *Journal of Medical Entomology* 34 (5): 499-510.
- Santiago-Alarcón D. & Carbó-Ramírez P. (2015).** Parásitos sanguíneos de malaria y géneros relacionados (Orden: *Haemosporida*) en aves de México: Recomendaciones metodológicas para campo y laboratorio. *Ornitología Neotropical*, 26: 59-77.
- Santiago-Alarcon D., Palinauskas V. & Schaefer H.M. (2012).** Diptera vectors of avian Haemosporidian parasites: untangling parasite life cycles and their taxonomy. *Biological Reviews*, 87: 928-964.
- Sehgal R.N.M. (2015).** Manifold habitat effects on the prevalence and diversity of avian blood parasites. *International Journal of Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4: 421-430.
- Sheldon BC. & Verhulst S. (1996).** Ecological immunology: costly parasite defence and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, 11(8): 317-321

- Siikamäki P., Rätti O., Hovi M. & Bennett G.F. (1997).** Association between haematozoan infections and reproduction in the Pied Flycatcher. *Functional Ecology* 11 (2): 176-183.
- Smith T.M. & Smith R.L. (2007).** Parasitismo y Mutualismo. En Smith T.M. & Smith R.L. (Eds.). *Ecología* pp. 327-347. Pearson Education (Madrid).
- Tellería J.L. (2018).** Distribution of the red-backed shrike *Lanius collurio* at its western range boundary: patterns and conservation prospects. *Ardeola* 65 (2): 221-232.
- Valkiūnas G. (2005).** Avian malaria parasites and other Haemosporidia. CRC Press.
- Valkiūnas G. & Iezhova T.A. (2017).** Exo-erythrocytic development of avian malaria and related haemosporidians parasites. *Malaria Journal* 16 (1): 101-124.
- Westerdahl H., Asghar M., Hasselquist D. & Bensch S. (2011).** Quantitative disease resistance: to better understand parasite-mediated selection on major histocompatibility complex. *Proc. R. Soc. B.* 279: 577-584
- Zehtindjiev P., Krizanauskiene A., Bensch S., Palinauskas V., Asghar M., Dimitrov D., Scebba S., Valkiūnas G. (2012).** A new morphologically distinct avian malaria parasite that fails detection by established polymerase chain reaction-based protocols for amplification of the cytochrome b gene. *The Journal of Parasitology*, 98 (3): 657-665.
- Zuur A.F., Ieno E.N. & Smith G.M. (2007).** Analysing ecological data. Springer, New York.