



UNAP



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

TESIS

**PREVALENCIA Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE HEMOPARÁSITOS
EN COLONIAS DE *Cacicus cela* "PAUCARES" LINNAEUS, 1758
(PASSERIFORMES: ICTERIDAE)**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA**

PRESENTADO POR:

LUZ AURORA ROMERO DÁVILA

ASESOR:

Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ Dr.

IQUITOS, PERÚ

2016

ACTA DE SUSTENTACIÓN



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Dirección de Escuela de Formación
Profesional de Ciencias Biológicas

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

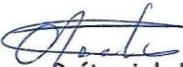
Iquitos, 30 de setiembre de 2016

En la ciudad de Iquitos, a los treinta (30) días del mes de setiembre de 2016 y, siendo las 11:08 horas; se reunió en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas-UNAP, el Jurado Calificador y Dictaminador de tesis que suscribe, designado con Resolución Directoral N° 011-2013-DEFP-B-UNAP, presidido e integrado por la Blga. Carmen Teresa Reátegui de Kahn, Mgr., (Presidente); Blgo. Javier Souza Tecco, M.Sc.(Miembro); Blgo. Jorge Luis Marapara Del Aguila, Dr.(Miembro); para escuchar, examinar y calificar la sustentación y defensa de la tesis titulada: "PREVALENCIA Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE HEMOPARÁSITOS DE COLONIAS DE *Cacicus cela* "PAUCARES" LINNAEUS, 1758 (PASSERIFORMES: ICTERIDAE)" realizado por la bachiller de la Facultad de Ciencias Biológicas LUZ AURORA ROMERO DÁVILA de la Promoción II-2012, graduada de Bachiller con R. R. N° 2570-2013-UNAP, de fecha 21 de noviembre de 2013, reconociendo como asistente Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ, Dr.

Durante todo el desarrollo de la sustentación y defensa de la tesis, el Jurado Calificador y Dictaminador, considerando lo establecido en el nuevo Reglamento de Grados y Títulos aprobado y puesto en vigencia mediante RESOLUCIÓN DECANAL N° 206-2012-FCB-UNAP realizó la evaluación del desempeño de la bachiller, considerando los criterios y el puntaje consignados en la tabla de valoración.

Culminado el acto, el Jurado Calificador y Dictaminador, con el puntaje alcanzado por la bachiller y, aplicando los términos establecidos en la tabla de calificación; dio como veredicto: APROBAR LA SUSTENTACIÓN DE LA TESIS, CALIFICADA COMO MUY BUENA; quedando en consecuencia la candidata apta para ejercer la profesión de Bióloga, previo otorgamiento del Título Profesional por la autoridad universitaria competente y, su correspondiente inscripción al Colegio de Biólogos del Perú.

Finalmente, el Presidente del Jurado Calificador y Dictaminador levantó la sesión siendo las 12:20 horas y en fe de lo cual, todos los integrantes suscriben la presente Acta de Sustentación por triplicado.


Blga. Carmen Teresa Reátegui de Kahn, Mgr
PRESIDENTE


Blgo. Javier Souza Tecco, M.Sc
MIEMBRO


Blgo. Jorge Luis Marapara Del Aguila, Dr.
MIEMBRO

Dirección: Plaza Serafín Filomeno S/N, Iquitos, Perú
Teléfono: 236121

www.unapiquitos.edu.pe
e-mail: fccb@unapiquitos.edu.pe

JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR



Blga. Carmen Teresa Reátegui de Kahn, Mgr
PRESIDENTE



Blgo. Javier Souza Tecco, M.Sc.

Miembro



Blgo. Jorge Luis Marapara Del Aguila, Dr.
MIEMBRO

ASESOR

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized initial 'J' followed by 'C', 'C', and 'G' in a cursive script.

Blgo. Juan Carlos Castro Gómez

DEDICATORIA

*A mis padres **José Armando** y **Zoila Luz** por ser mi fuente inagotable de inspiración en el logro de mis metas profesionales y personales, por los principios y valores éticos inculcados desde mi niñez y su paciencia. A mi hermana **Lucero** por ser mi confidente y consejera; y a mis sobrinos **Johan** y **Luz Victoria** por la alegría de todos los días.*

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Juan Carlos Castro Gómez, porque sin él no hubiese sido posible formar parte de este gran proyecto de tesis. Por brindarme la oportunidad de trabajar con él y aprender nuevas cosas en el laboratorio. Y sobre todo por estar siempre dispuesto a colaborar y comentar cualquier dato o problema.

Al Dr. Joseph Dylan Maddox, por el financiamiento de este trabajo; por ser muy paciente a la hora de enseñarme los procedimientos aplicados y por su cálida amistad.

A los Blgs. Marianela Cobos y Jorge Angulo Quintanilla, por su constante apoyo profesional y personal.

A la Bachiller en Ciencias Biológicas Susana Cubas por la extracción de sangre a los pauceres.

A todos los miembros de la Unidad Especializada de Biotecnología que desde mis inicios me han enseñado, acompañado y mostrado su simpatía dentro y fuera el laboratorio: Cinthya Acuña, Alexander Gutiérrez, Alex Tapullima, Ana Córdova y Freddy Gutiérrez.

INDICE

PORTADA.....	i
ACTA DE SUSTENTACION	ii
JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR	iii
ASESOR.....	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
INDICE.....	vii
LISTA DE ANEXOS	ix
RESUMEN	xi
ABSTRACT.....	xii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. ANTECEDENTES	3
2.2. DESCRIPCIÓN DEL ESPECIMEN EN ESTUDIO.....	17
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.1. MATERIALES	25
3.2. MÉTODOS	26
IV. RESULTADOS	33
4.1. Prevalencia de Hemoparásitos.....	33
4.2. Linajes de hemoparásitos.....	36
4.3. Análisis Filogenético.	39
V. DISCUSIÓN.....	41

VI. CONCLUSIONES	45
VII. RECOMENDACIONES	46
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
IX. ANEXOS	57

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1	Polluelo (25 días) capturado en Quistococha	57
Anexo 2	Zonas de muestreos	57
Anexo 3	Captura de las aves	58
Anexo 4	Anillamiento de las aves.	58
Anexo 5	Hoja de datos de los individuos capturados.....	59
Anexo 6	Método Venopunción	61
Anexo 7	Extracción de la muestra	61
Anexo 8	Tarjetas CloneSaver FTA whatman	62
Anexo 9	Extracción de discos de la tarjeta whatman	62
Anexo 10	Composición Buffer TNES (pH: 7,5)	63
Anexo 11	Composición de proteinasa k.....	63
Anexo 12	Reactivos para la preparación de la solución madre	63
Anexo 13	Reactivos utilizados en las amplificaciones	64
Anexo 14	Preparación del buffer y gel de agarosa	64
Anexo 15	Protocolo estándar de purificación por Exosap-it.....	64
Anexo 16	Protocolo de secuenciamiento	65
Anexo 17	Protocolo de precipitación.....	66
Anexo 18	Parámetros estándares en la electroforesis capilar	67
Anexo 19	Equipos y materiales de los procedimientos	67
Anexo 20	Tabla de contingencia del diagnóstico de la prueba en las colonias de paucares	68
Anexo 21	Tabla de contingencia del diagnóstico de la enfermedad en el sexo de los paucares	69

Anexo 22	Tabla de contingencia del diagnóstico de la enfermedad con la edad de los paucares.....	70
Anexo 23	Tabla de contingencia de los linajes encontrados en las colonias de paucares	71
Anexo 24	Tabla de contingencia de los linajes encontrados entre las edades de los paucares.....	72

RESUMEN

Las enfermedades causadas por hemoparásitos aviares se distribuyen ampliamente en las Américas, provocando efectos negativos en la salud de las aves. El objetivo de la tesis fue determinar la prevalencia de hemoparásitos con respecto a la ubicación geográfica, sexo y edad en *Cacicus cela* “paucare”; además de realizar un análisis filogenético para identificar los linajes y las relaciones filogenéticas de hemoparásitos en estas aves. Fueron capturados 89 ejemplares, mediante redes de neblina. De cada ejemplar se extrajo una alícuota de sangre venosa y se transfirió a tarjetas whatman FTA (Fast Technology for Analysis of Nucleic Acids). El ADN se extrajo por procedimientos estándares y mediante PCR se amplificó un fragmento de 478 pb del gen codante de citocromo b, este amplicón fue purificado y secuenciado con métodos estándares. Existió una alta prevalencia de infecciones por hemoparásitos aviares en las colonias estudiadas (desde 87% hasta 100%). Con la secuencia obtenida se buscó homólogos en una base de datos y se realizó el análisis filogenético, encontrándose en total 5 linajes pertenecientes a *Plasmodium spp.*, de los cuales 4 fueron descubiertos por primera vez en este trabajo (**Linajes “64”, “68”, “211”, “12”**). En conclusión, existe una alta prevalencia de hemoparásitos en *Cacicus cela* “paucare”, siendo las hembras más susceptibles que los machos a ser infectadas. Asimismo, los juveniles mayormente parasitados que los polluelos y adultos. El linaje “59” fue el más frecuente, encontrándose en todas las zonas de muestreos.

Palabras claves: Malaria aviar, carretera Iquitos-Nauta, análisis molecular, MalAvi, relaciones filogenéticas.

ABSTRACT

Diseases caused by avian hemoparasites are widely distributed in the Americas, causing negative effects on bird health. The objective of the thesis was to determine the prevalence of hemoparasites with respect to geographic location, sex and age in *Cacicus cela* "paucare"; In addition to performing a phylogenetic analysis to identify the lineages and phylogenetic relationships of hemoparasites in these birds. 89 specimens were captured by mist nets. An aliquot of venous blood was extracted from each specimen and transferred to whatman FTA (Fast Technology for Analysis of Nucleic Acids) cards. The DNA was extracted by standard procedures and by PCR a 478 bp fragment of the cytochrome b coding gene was amplified, this amplicon was purified and sequenced with standard methods. There was a high prevalence of avian hemoparasite infections in the colonies studied (from 87% to 100%). With the sequence obtained, homologs were searched in a database and phylogenetic analysis was performed, with a total of 5 lineages belonging to *Plasmodium* spp., Of which 4 were first discovered in this work (**Lineages "64", "68", "211", "12"**). In conclusion, there is a high prevalence of hemoparasites in *Cacicus cela* "paucare", females being more susceptible than males to be infected. Likewise, juveniles mostly parasitized than chicks and adults. Lineage "59" was the most frequent, being found in all sampling areas.

Keywords: Avian Malaria, Iquitos-Nauta highway, molecular analysis, MalAvi, phylogenetic relationships.

I. INTRODUCCIÓN

Cacicus cela “paucar” es una de las especies de aves más comunes que habitan en los trópicos, son nativos de la amazonía y no se han introducido en otras regiones¹. Según Robinson², los “paucars” en la amazonía peruana pueden defenderse de tres maneras diferentes. Primero, anidando en las islas y alrededor de los nidos de avispas. En segundo lugar, agrupando los nidos y protegiendo a sus miembros como un grupo. En tercer lugar, mediante la mezcla de nidos activos y abandonados. Sin embargo, a pesar de todas estas medidas de defensa que esta especie presenta ante los depredadores, están indefensos contra las infecciones transmitidas por vectores, muchos de estos son insectos hematófagos que ingieren los microorganismos patógenos junto con la sangre de un portador infectado y posteriormente los inoculan a un nuevo portador al ingerir su sangre, causando enfermedades como malaria aviar, filariasis, etc³.

La prevalencia de las infecciones por hemoparásitos puede ser más común en unos e infrecuentes en otros taxones⁴, también puede diferir entre hábitats intactos e intervenidos⁵. Las modificaciones que crean los seres humanos en los ecosistemas naturales no sólo causan la fragmentación de estos y la pérdida de la biodiversidad^{6, 7}, sino también pueden alterar procesos ecológicos y evolutivos⁸, incluyendo estos entre parásitos y hospederos⁹. Las variables del ciclo de vida de los vectores dependen en gran medida al ambiente, su biología y comportamiento¹⁰.

En los últimos años se ha realizado un gran avance en los estudios de identificación y filogenia de los parásitos haemosporidios gracias a la aplicación de técnicas moleculares basadas en la amplificación de ADN^{11,12}. Así como Read¹³, que utilizó el sistema de apareamiento de las aves para explicar la variación en la prevalencia de parásitos de la sangre de la especie hospedera. Utilizando una comparación de especies hermanas para controlar los efectos de la filogenia, mostró que la proporción de individuos infectados con parásitos de la sangre es significativamente menor en las especies poligínicas que en las especies monógamas en Passeriformes.

Las aves son objeto de ardua investigación desde el siglo pasado, puesto que representan un modelo para el estudio de las enfermedades transmitidas por vectores en humanos¹⁴. Entre las aves, las passeriformes pueden tener alta prevalencia de haemosporidios, aunque hay variaciones entre las especies hospederas e incluso entre poblaciones de diferentes zonas geográficas¹⁵. Actualmente solo un estudio ha sido documentado sobre Hemoparásitos aviares en el Perú, especialmente en la Amazonía Peruana¹⁶. Por tanto, los resultados de esta investigación reforzarán los conocimientos en las interrelaciones parásito – hospedero aviar y poder implementar un plan de control para la vigilancia epidemiológica en nuestro país. Los objetivos en este trabajo fueron: determinar la prevalencia de hemoparásitos en relación con la ubicación geográfica, sexo y edad, además de realizar un análisis filogenético para identificar los linajes y las relaciones filogenéticas de hemoparásitos en *Cacicus cela* “paucarens”.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANTECEDENTES

2.1.1. Hemoparásitos aviares.

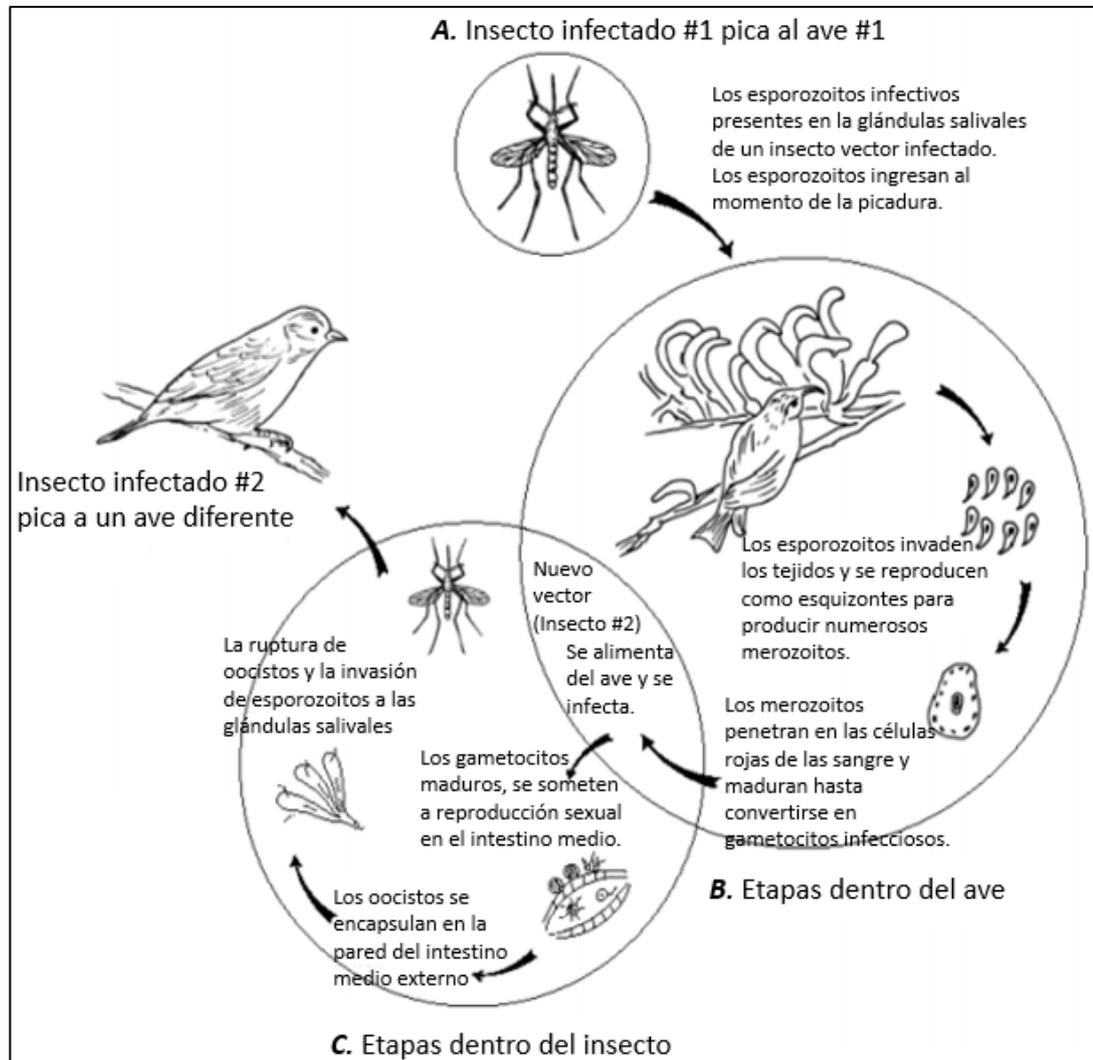
Para este estudio, los tomaremos como parásitos intracelulares patógenos de eritrocitos que habitan en la sangre de las aves, son de distribución mundial y se extienden a través de una amplia gama de hábitats y regiones geográficas¹⁷. Existen tres géneros principales de haemosporidianos (Phylum: Apicomplexa) como son *Plasmodium*, que es el agente causal de la verdadera malaria aviar, *Haemoproteus* y *Leucocytozoon*; que causan otras haemosporidiosis relacionadas, estos parásitos afectan una gran cantidad de especies de vertebrados incluyendo reptiles, anfibios, aves y mamíferos¹⁸.

Dichos parásitos sanguíneos son transmitidos por vectores y sus implicaciones en la salud de las aves siguen siendo foco de investigación y debate. Las especies de *Plasmodium spp.* y *Leucocytozoon spp.* son comúnmente transmitidas por mosquitos culícidos, mientras que *Haemoproteus spp.* es transmitido principalmente por Culicoides. Se ha documentado en diversas especies de aves silvestres que estos parásitos presentan una alta prevalencia y diversidad genética¹⁹.

El ciclo de vida de los hemoparásitos involucra un hospedero invertebrado (vector) y las aves como hospederos vertebrados (Figura 1). La patología varía según la especie de parásito y del hospedero.

Después de que el vector se alimenta de un ave infectada, los parásitos escapan de los eritrocitos aviares al intestino del díptero. La gametogénesis y reproducción sexual tienen lugar allí, seguidos por la reproducción asexual (esporogonia) que se origina en las etapas de extensión llamados esporozoitos. Los esporozoitos desarrollados, infecciosos para las aves, se mueven a través del hemocele del vector a sus glándulas salivales. La transmisión para el hospedero aviar se produce mientras que el insecto se alimenta de la sangre de un ave apropiada. En el interior del cuerpo del ave, los esporozoitos se mueven dentro de las células de los tejidos fijados y sufren una división asexual, produciendo merontes o esquizontes unos días después de la fecha de la infección. Con varias rondas de división múltiple (esquizogonia o merogonia), merontes originan merozoitos, que son las etapas asexuales de distribución dentro del organismo del hospedero (el número de rondas de merogonia y los órganos en los que se produce dependerá del parásito en cuestión). Los merozoitos salen de los tejidos fijados, distribuidas en el torrente sanguíneo e invaden los eritrocitos. Allí, pueden seguir merogonia/esquizogonia (*Plasmodium*) o pueden desarrollar directamente en gametocitos de ambos géneros (*Haemoproteus* y *Leucocytozoon*). Estos gametocitos son infecciosos a los vectores²⁰.

Figura 1. El complejo ciclo de vida general de parásitos hemosporidiano empezando con (A) Un insecto infectado picando a un ave susceptible, (B) división asexual y maduración dentro del hospedero de ave, (C) La reproducción sexual y esporogonia el interior del insecto vector. Tomada de Atkinson²¹.



Sobre la base de la variación morfológica, alrededor de 175 especies de parásitos de los géneros *Plasmodium* y *Haemoproteus* han sido descritas hasta el momento. Sin embargo, los estudios de base molecular recientes²² implican que la diversidad de especies es mucho mayor en estos géneros. Estos parásitos se han registrado en alrededor del 68 % de las especies de aves que han sido examinadas, e infectan

a casi todos los órdenes de aves, de las cuales la más rica fauna de haemosporidianos se encuentra en el orden Passeriformes²³.

Por otro lado, ciertas familias de aves parecen ser más susceptibles a ser infectadas que otras. Las razones de estas diferencias no están completamente estudiadas, aunque podrían ser debidas a la climatología y otros factores ambientales, diferencias en el hábitat o etológicas, ausencia de vectores e incluso a una especificidad de hospedador como resultado de una coevolución hospedador-parásito a lo largo del tiempo.

Estos patógenos son componentes esenciales de los sistemas naturales, en los que actúan como reguladores poblacionales. Pero la creciente influencia del hombre sobre el ambiente produce un desbalance del equilibrio natural que favorece el surgimiento de enfermedades potencialmente riesgosas. Las alteraciones del hábitat y la introducción de especies exóticas (incluyendo insectos vectores) dieron lugar a enfermedades como la malaria aviar y el virus pox (viruela), responsables de dramáticas reducciones poblacionales e incluso de la extinción de numerosas especies en Hawái^{24,25}.

2.1.2. Impacto de hemoparásitos sobre la condición física de hospederos aviares.

Los Hemoparásitos aviares son responsables de muchas enfermedades en las aves domésticas, la disminución de la masa corporal del

hospedero e incluso causando una elevada mortalidad. Aunque sus efectos sobre las poblaciones de aves silvestres aún no han sido plenamente comprendidos, los efectos negativos sobre la salud ya han sido probadas²⁶. Estos son los impulsores de un proceso de coevolución entre la virulencia del parásito y la especialización, y los mecanismos de resistencia o evasión del hospedero^{27,28}.

A nivel de población, los hemoparásitos pueden afectar a sus hospederos reduciendo los parámetros de salud como la condición física, éxito reproductivo y supervivencia⁹. Sin embargo, relativamente pocos estudios han sido realizados con poblaciones silvestres y la evidencia para los impactos negativos en la condición de los hospederos es todavía variada.

Existen pocos registros de mortalidad causadas por hemoparásitos en aves silvestres y muchos estudios encuentran impactos no negativos en la tasa de supervivencia del individuo³⁰. Sin embargo, la mortalidad en aves silvestres es muy difícil de monitorear en individuos gravemente enfermos ya que raramente serán capturados y muestreados; por lo tanto, en la mayoría de los estudios de poblaciones silvestres, muchas de las infecciones muestreadas están en la fase crónica y tienen pequeños costos en la salud del hospedador³¹. Por otro lado, investigaciones en Hawái, donde parásitos de malaria (*Plasmodium relictum*) fueron sólo introducidas el último siglo, muestran una alta tasa de mortalidad en las poblaciones de aves nativas que no pudieron co-

evolucionar con estos parásitos³². Otras investigaciones encontraron que *Plasmodium* y *Haemoproteus* pueden influir en el estado de salud y la supervivencia del hospedero, y alterar los parámetros hemato-serológicos e inmunes³³.

Diferentes especies de parásitos, incluso del mismo género pueden tener diversos efectos patológicos. Varios estudios han revelado anemia grave para especies de los tres géneros de parásito; otros efectos significativos como escasa termorregulación, neumonía, lesiones cerebrales o quistes musculares son asociados con especies particulares³⁴. Los efectos son grandes durante la primera infección, cuando el hospedero tiene su primer encuentro con el parásito. Las Haemosporidiosis aviares pueden ser graves o incluso letales para las aves domésticas y las de zoológicos³⁵, que no están adaptadas o no co-evolucionaron con estas enfermedades.

2.1.3. Prevalencia de hemoparásitos en aves.

Interacciones hospedero-parásito se puede influir de forma local por factores abióticos, como el clima, la estación o el tipo de hábitat, y por los efectos bióticos, como la edad o el sexo³⁶; haciendo que la prevalencia de cada parásito varíe a lo largo de su rango de distribución.

La ocurrencia de hemoparásitos aviares es muy variable según los factores abióticos o bióticos que influyen en el hábitat de una determinada especie. Así como en Brasil³⁷, se compararon tres

diferentes áreas de la región norte entre el 2007 y 2009, donde se estimó una prevalencia muy alta (88%) en *Cacicus cela*; así como para *Formicivora grisea* (87,5%), *Ramphocelus carbo* (75%), *Manacus manacus* (66,7%), *Turdus leucomelas* (55%), *Elaenia chiriquensis* (50%). Sin embargo, estos resultados difieren con los realizados en búhos de Tengmalm 7,1% al oeste de Finlandia entre 1991 y 1992³⁸, así mismo al suroeste de Jamaica en *Setophaga ruticilla* “American Redstarts”, donde se muestrearon en otoño (n = 3/37, 8%) y en primavera (n = 0/36, 0%) presentan prevalencias de hemoparásitos muy bajas³⁹, incluso se reportan estudios donde no se encuentra la presencia de estos hemoparásitos^{40,41}. Estas diferencias en la prevalencia de hemoparásitos posiblemente sean porque las especies coloniales son mucho más propensas a la infección que en especies solitarias⁴², por factores inherentes de la especie como el tamaño del bazo⁴³; ya que es un órgano central de la actividad del sistema inmune.

La diferencia de sexo puede ser un factor influyente en la prevalencia de estos parásitos ya que existe una distinción de características biológicas o fisiológicas asociadas. La evidencia creciente sugiere que los parásitos pueden conducir la selección sexual dentro de las especies hospedadoras, y al mismo tiempo influir en la forma, la función de las exhibiciones sexuales elaboradas⁴⁴. Según Dawson y Bortoli⁴⁵, encontraron que los cambios en la prevalencia del parásito entre cernícalos americanos durante el prepostura y períodos de incubación en el mismo año (1994 o 1995) fueron 75,5% en hembras y 63,9% en machos, así como el

estudio de McCurdy *et al.*⁴⁶; la cual probaron los efectos inmunosupresores de testosterona que se compararon entre los machos y hembras. No encontraron ninguna diferencia general en la prevalencia ya sean crías o no. Sin embargo, las infecciones por *Haemoproteus* (el género más común de parásito de la sangre) fueron significativamente más comunes entre las hembras reproductoras que en machos reproductores. Restringiendo el análisis a las aves reproductoras de especies polígamas, las hembras fueron de nuevo más propensas que los machos a ser infectadas por parásitos de la sangre. Por otro lado, existen muchos casos en que los machos presentan una mayor prevalencia de hemoparásitos que las hembras.

Se analizaron las diferencias sexuales y relacionadas con la edad en la parasitemia de un total de 257 palomas examinados, 206 estaban infectados con *H. columbae* en Barcelona y Granollers donde no hubo evidencia de las diferencias relacionadas con el sexo en la prevalencia, la intensidad o en la abundancia de vectores⁴⁷.

Un patrón importante en la interacción hospedero-parásito es la mayor prevalencia de parásitos en juveniles que en adultos, aunque las razones de estas diferencias siguen siendo desconocidas. Interacciones hospedero-parásito se puede influir de forma local por factores abióticos, como el clima, la estación o el tipo de hábitat, y por los efectos bióticos, como la edad de acogida o el sexo⁴⁸, haciendo que la prevalencia de cada parásito varíe a lo largo de su rango de distribución. Así como en

muchos trabajos donde las aves mayores de dos años tuvieron una prevalencia más alta que las aves más jóvenes⁴⁹⁻⁵¹, posiblemente como resultado de la inmunidad adquirida⁵², que concuerda también con el estudio de Cosgrove *et al.*⁵³ donde ninguno de los 195 polluelos examinados fue positivo para especies de los parásitos de la malaria (*Plasmodium aviar* o *Haemoproteus*) por los 2 protocolos de PCR anidados utilizados en este estudio. Dado que el 30% de los adultos de la misma población estaban infectados con malaria aviar, sus hallazgos sugieren que algunos o todos los pichones estaban infectados, pero la enfermedad era todavía en fase de pre-patente. Por el contrario, las diferencias de edad en la prevalencia del parásito en *Lanius collurio* no fueron significativas⁵⁴.

El clima húmedo, templado y la baja salinidad de los hábitats son ideales para el crecimiento del vector, desarrollan sus huevos y larvas en superficies estancadas de agua dulce⁵⁵. Las características ambientales de cada hábitat influyen en la abundancia del vector y consecuentemente en la transmisión y prevalencia del parásito. Las diferencias geográficas pueden presentarse desde diferencias en las condiciones del hábitat, colonia del ave, abundancia y actividad del vector, la cual influencia la transmisión del parásito⁵⁶. Estas diferencias pueden deberse a variaciones estacionales en el momento del muestreo o de las técnicas de diagnóstico⁵⁷. La ocurrencia de hemoparásitos varía entre regiones⁵⁸ y familias de aves⁵⁹. Entre las aves, los passerines son los que presentan una alta prevalencia de haemosporidians. *Passer domesticus* “gorrión

común” muestra una prevalencia por *Plasmodium spp.* de 47% en una población francesa, y en otra de 75% y 0,01% por *Haemoproteus spp.*⁶⁰. Además, cada especie de parásito puede tener su propia temporada de transmisión (invierno, verano o en todo el año), causando variaciones en la prevalencia durante todo el año⁶¹; si la comunidad del parásito de todos los sitios no es la misma, esto se sumará a las diferencias entre sitios. En especies migratorias, la prevalencia observada en un sitio particular es influenciada también por las condiciones y la fauna parasitaria encontrada durante todo el ciclo de migración. Como es el caso de *Acrocephalus arundinaceus* “carricero tordal”, que muestra una prevalencia del 10% para *Haemoproteus spp.* y 10% para *Plasmodium spp.* en Letonia, 21% para *Haemoproteus spp.* en Alemania⁶², 17% para *Haemoproteus spp.* y 27% para *Plasmodium spp.* en Suecia, 31% para *Haemoproteus spp.* y 23% para *Plasmodium spp.* en Bulgaria. En las aves de Jamaica la baja prevalencia de infección (7,4%) de los parásitos de la sangre fue muy similar a la observada en las aves neotropicales y muy por debajo de la observada para la avifauna Neártica de las mismas familias⁶³.

2.1.4. Detección de Hemoparásitos aviares.

Existen muchos métodos para detectar hemoparásitos en aves⁶⁴ que difieren en especificidad y sensibilidad⁶⁵. Por ejemplo, algunos estudios muestran que las técnicas moleculares son más sensibles que las técnicas microscópicas y dentro de las moleculares también existen

diferencias entre resultados dependiendo del segmento del gen a amplificar⁶⁶.

Elegir la técnica adecuada para la detección de hemoparásitos aviares depende de varios factores, principalmente del tiempo y el costo. Una vez optimizada la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es más rápido y más fiable que el análisis de frotis de sangre para la detección a gran escala. Sin embargo, otros investigadores promueven el uso de microscopía óptica en los estudios de parásitos sanguíneos en paralelo a los métodos moleculares actuales ampliamente utilizados. Es improbable que la microscopía resulte en falsos positivos, lo cual es una preocupación importante en los estudios de PCR a gran escala⁶⁷.

El uso de la PCR para encontrar variación en el gen citocromo b del parásito definen los linajes, que en gran medida superan en número a las morfo especies tradicionales. Esta variación mitocondrial está asociada con la variación del ADN nuclear y estos linajes no parecen recombinar incluso cuando co-ocurren dentro del mismo hospedero. Por tanto, pueden ser consideradas como especies separadas. Estas técnicas moleculares también son más sensibles que a microscopía y por ende mejoran el diagnóstico de las infecciones de parásitos presentes en baja intensidad^{68,69}.

Un nuevo enfoque de PCR anidada para la detección e identificación genética de los hemoparásitos aviares se ha desarrollado

recientemente⁷⁰. Este ha tenido un fuerte impacto en varios aspectos de la investigación sobre los parásitos de la sangre de aves, que mejoran significativamente el rendimiento. Debido a que el índice de detección es más alto y este se debe principalmente a una superior sensibilidad del método para detectar infecciones por *Plasmodium spp.* que suelen ser de baja intensidad y, por tanto, difíciles de detectar con otros métodos.

2.1.5. Linajes de Hemoparásitos aviares.

Hasta ahora la identificación de haemosporidians se ha basado en su morfología microscópica y las características biológicas, tales como vectores y rango de hospederos. Sin embargo, estas características no pueden reflejar con precisión las relaciones filogenéticas entre los parásitos⁷¹ y no son suficientes para distinguir entre especies crípticas. Como consecuencia de ello, el concepto de especie para haemosporidians es aún objeto de debate. Recientemente, el uso de técnicas moleculares ha revelado una amplia diversidad genética que ha permitido abordar mejor estos asuntos⁷².

Muchas especies de aves albergan varios linajes de parásitos sanguíneos. Algunos de los cuales son compartidos a través de diferentes especies de hospederos. Para entender estos sistemas complejos, es esencial tener en cuenta el hecho de que diferentes linajes, especies y familias de parásitos pueden ocurrir en la misma población, así como en el mismo individuo, y que estos parásitos pueden competir o interactuar entre sí⁷³. Diferentes linajes de parásitos están

asociados con una comunidad de vector particular, este factor puede explicar las diferencias en la distribución geográfica de los linajes de hemoparásitos encontrados. La presencia o ausencia de ciertas especies hospederos probablemente el factor más importante que influye en la presencia de linajes de parásitos y la prevalencia global de parásitos, como se muestra en varios estudios previos. Así mismo, la similitud en la diversidad de parásitos entre diferentes áreas podría estar relacionada con la gran variedad de aves silvestres distribuidas en estas. Por lo tanto, es probable que la presencia o ausencia de un linaje de parásito dependa de la presencia de especies hospedadoras adecuadas en lugar de atributos particulares del hábitat independientemente del hospedero⁷⁴. Por el contrario, otros trabajos mostraron que la apertura de los hábitats forestales en Camerún, África, aumenta la prevalencia y la diversidad de linajes de parásitos en una especie hospedero en particular. Sin embargo, este tipo de alteración del hábitat probablemente resulta en cambios más dramáticos en las comunidades de aves y vectoriales que la urbanización de hábitats.

La distribución geográfica de los parásitos genéticamente diferentes ha sido muy estudiada⁷⁵, pero sigue siendo objeto de nuevas investigaciones con respecto a los patrones de la biodiversidad en general, especialmente en los trópicos, y en relación con la deforestación. Wood *et al.*⁷⁶, descubrieron varios patrones complejos de prevalencia con respecto a las características del paisaje. Esta heterogeneidad en la infección por parásitos en esta escala proporciona

información sobre cómo los linajes pueden ser transmitidos dentro de un área pequeña.

2.2. DESCRIPCIÓN DEL ESPECIMEN EN ESTUDIO

Los paucares son aves silvestres consideradas unas de las más inteligentes por sus imitaciones de los diferentes animales del bosque.

2.2.1. Clasificación Taxonómica.

Reino : Animalia

Filo : Chordata

Clase : Aves

Orden : Passeriformes

Familia : Icteridae

Género: Cacicus

Especie: *C. cela* (Linnaeus, 1758)



Nombre común: Paucar (Perú), Arrendajo Común (Venezuela), Cacique Lomiamarillo (Argentina), Xexéu (Brasil), yellow-rumped cacique (E.E.U.U).

2.2.2. Descripción Física.

Los Paucares presentan dimorfismo sexual. Los machos adultos miden de 27-29,5 cm de largo y pesan aproximadamente 100 g. Las hembras adultas alcanzan típicamente 23-25 cm de largo y un peso de 60 a 80 g. Ambos sexos tienen colores similares, pero las hembras tienden a ser menos coloridas. Los adultos son en su mayoría de color negro, pero tienen un punto amarillo en las alas y otro parche de color amarillo brillante en su rabadilla. Tienen los ojos de color azul pálido y un pico de

color amarillo verdoso. En los primeros años tienen manchas marrones en la base del pico y los ojos de color púrpura oscuro (Anexo 1). En las aves de segundo año, el pico es de color amarillo claro y tiene los ojos azules. Los machos tienen bordes aceitunados en las plumas del vientre y las hembras tienen rastros de color púrpura en sus ojos. Los de tercer año expresan la coloración adulta⁷⁷.

2.2.3. Hábitat.

Normalmente no viven en lo profundo del bosque. Son considerados como especies “borde”, prefiriendo vivir al borde del bosque cerca de áreas abiertas como los campos y lagos. Por lo general anidan en el dosel de los árboles, pero también pueden encontrarse en los matorrales. Debido a su preferencia por las fronteras forestales se ven con frecuencia cerca de las actividades humanas^{77,78}. Con un rango de elevación de 400 m.

2.2.4. Rango Geográfico.

Los “paucare” están muy extendidos en el norte de América del Sur. Se encuentran al este de la cordillera de los Andes a lo largo de la cuenca del Amazonas. Son más numerosos en los trópicos que en las regiones templadas, aunque algunos han sido vistos a lo largo de la frontera sur de Bolivia, que se considera ser la extensión sur (más templado) de su área de distribución. Habitan algunos países de América del Sur (Figura 2) y se extienden hacia el este a lo largo de la mitad superior de Brasil.

Son nativos de la Amazonía y que no se han introducido en otras regiones⁷⁸.

Figura 2: Distribución geográfica de *Cacicus cela* “paucar” en América del Sur. Fuente; www.xeno-canto.org/species/Cacicus-cela.



2.2.5. Reproducción.

Son polígamos, lo que significa que un macho se aparea con muchas hembras. Son una especie colonial, con nidos agrupados suelen ocupar uno o dos árboles. El acceso a las hembras depende de la dominancia del macho, se ha demostrado que se correlaciona con el peso. El mayor tamaño significa un mayor número de hembras. Los machos compiten entre sí a través de su tamaño y comunicación con ataques aéreos y griteríos “cara a cara”. Además, los machos contra-cantan el uno al otro. El individuo que no puede seguir el ritmo de las canciones cristalizadas es derrotado. En todos los combates masculinos, hay un claro ganador

y perdedor. Las hembras también compiten entre sí dentro de una colonia. Al igual que con los machos, el tamaño juega en papel importante en el dominio femenino. Las hembras luchan para obtener el mejor lugar de anidación para asegurarse que sus huevos estén seguros. Los materiales para la elaboración de los nidos son extraídos de los nidos vecinos, donde los ataques aéreos y "griteríos" también se reproducen. Sin embargo, a diferencia de los machos, no todos los combates entre hembras tienen un claro ganador o perdedor⁷⁹.

La temporada de cría dura ocho meses (de julio a febrero). Los machos se aparean con muchas hembras, pero están limitados por su capacidad para obtener alimento y protegerlas. Después del apareamiento, los machos no intervienen en el cuidado de las crías, excepto ayudando a las hembras en la protección del nido. Mientras que ellas buscan alimento o recolectan materiales, los machos asumen tareas de protección de los nidos y el territorio. La Re-anidación ocurre al menos una vez durante la temporada de reproducción.

Las hembras ponen dos huevos, cada uno pesando entre 5 a 6 g. Sin embargo, la mayoría de las veces sólo sobrevive uno. Los huevos eclosionan unos 15 días más tarde y solo emerge un ave de 2 a 3 g. La madre alimenta a la cría con artrópodos. Después de 25 días aproximadamente, las aves jóvenes pueden volar por su cuenta. Las crías llegan a la madurez en dos años, después de haber aprendido de

memoria la mayoría de las canciones que necesitarán en la comunicación⁷⁹.

Aparte de aparearse con las hembras y proteger sus territorios, los machos no juegan ningún papel en el cuidado parental. Las hembras son responsables de todas las actividades reproductivas y del cuidado de la descendencia. Ellas construyen el nido, incuban los huevos y alimentan a los pichones. Los nidos son construidos típicamente en el dosel y cuelgan de las ramas. Estos se construyen en gran medida con ramitas y hojas. Los polluelos abandonan el nido cuando su peso alcanza aproximadamente de 50 a 88 g, aproximadamente 25 días después de la eclosión. Una vez que los jóvenes son capaces de volar, las madres poco a poco ganan su peso anterior⁷⁹.

2.2.6. Comportamiento.

Los paucareos son aves sociales. Anidan en los bordes exteriores de los bosques y a veces en las ciudades. El tamaño de la colonia puede variar desde 2 hasta 250 nidos. Por lo general, 40 a 100 nidos estarán activos en un momento dado. Son polígamos y los machos son territoriales. El tamaño del macho determinará el número de hembras con las que se apareará. El dominio del macho se mide por el tamaño y el contra-canto. Los machos en competencia utilizan canciones para establecer su dominio. Coinciden con las canciones de los demás hasta que uno pierde. Los cantos son muy importantes, ya que son específicos de las

colonias individuales. Los machos las usan para atraer a las hembras y defender sus territorios⁷⁹.

2.2.7. Comunicación y Percepción.

Los cantos se adquieren a través de dos fases: la memorización y la cristalización. La memorización se inicia a los pocos meses de incubación y continúa en la primera temporada de cría. Los paucares no cristalizan totalmente sus cantos hasta su tercer año. Las señales vocales son utilizadas para atraer a sus parejas, defender los territorios y anunciar su estatus. Las colonias comparten de 5-7 dialectos de canciones que difieren de otras y se modifican a lo largo de la temporada de cría. Los miembros pueden adoptar estos cambios con rapidez y permitir que la colonia se distinga de otras. Las canciones tienen significados sociales y los machos contra-cantan entre sí para establecer su dominio⁸⁰.

2.2.8. Hábitos Alimentarios.

Son insectívoros, alimentan a sus polluelos con artrópodos, principalmente los saltamontes, grillos (Orthoptera), pero también con arañas tejedoras del orbe (Araneidae). Los adultos no sólo son insectívoros, sino también para cumplir con sus demandas de proteínas también consumen frutas y néctar. Los frutos de los árboles del *Quararibea cordata* “zapote” son uno de sus favoritos, junto con los *Ficus trigona* “higos”. También cazan en la copa de los árboles langostas y otros invertebrados⁸⁰.

2.2.9. Depredación.

Son vulnerables a los depredadores, mientras van en busca de alimento en el sotobosque. Su color amarillo brillante los hace altamente visibles. Las aves del género *Accipiter* (azores o gavilanes) y *Micrastur* (halcones del bosque) son conocidos como sus depredadores. También están sujetos a muchos depredadores de nido. Sin embargo, anidan en zonas que están bien protegidas de la mayoría de los mamíferos, serpientes y otras aves. Los nidos de avispa en las proximidades proporcionan protección de los mamíferos, sin embargo; los paucares deben asegurar suficiente espacio entre ellos y estas avispas para evitar ataques. *Stelopolybia fuscipennis* es una especie de avispa que se ha visto ahuyentar a monos en las colonias de anidación de los paucares. A veces viven también en ambientes aislados, lo que les protege de las serpientes. Los caimanes, como *Melanosuchus niger* "caimán negro", suelen comer o disuadir a las serpientes antes de que lleguen a los nidos. Para ahuyentar otras especies de aves, el tamaño de la colonia es importante. Otras aves son "acosadas" por la colonia cuando representaban una amenaza para los nidos.

2.2.10. Roles ecológicos.

Cumplen funciones como dispersores de semillas de plantas como *Ficus trigona* "higo" y *Quararibea cordata* "sapote", también como controladores biológicos de artrópodos y otros invertebrados⁸⁰.

2.2.11. Estado de Conservación.

Esta especie tiene una amplia gama, con una extensión global estimada de aparición de 8.900.000 km². El tamaño de la población global no ha sido cuantificado, pero se cree que es grande ya que la especie está descrita como "común", al menos en parte de su área⁸¹. Las tendencias de la población global no se han cuantificado, pero no se cree que la especie se acerque a los umbrales para el criterio de disminución de la población de la Lista Roja de la UICN (es decir, la disminución de más del 30% en diez años o tres generaciones). Por estas razones, la especie es evaluada como de Preocupación Menor.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Área de estudio.

Los muestreos se realizaron en cuatro zonas ubicadas en la carretera Iquitos – Nauta (Anexo 2): [1] Complejo Turístico de Quistococha (km 5) a $3^{\circ}49'44.92''S$ y $73^{\circ}19'20.99''O$. [2] “Predio Privado” (km 24) a $3^{\circ}56'48.45''S$ y $73^{\circ}23'58.18''O$, lado izquierdo de la carretera. [3] Centro de Investigación Allpahuayo (km 26) a $3^{\circ}58'1.96''S$ y $73^{\circ}25'5.64''O$ y [4] Comunidad Mishana (km 28) a $3^{\circ}56'26''S$ y $73^{\circ}28'21''O$, ambas dentro de la Reserva Nacional Allpahuayo - Mishana.

3.1.2. Tipo de Investigación.

La investigación fue no experimental, ya que no se manipularon deliberadamente las variables y transversal, se analizaron muestras tomadas en un sólo momento.

3.1.3. Población y Muestra.

La población estuvo constituida por paucareos ubicados a lo largo de la carretera Iquitos-Nauta; específicamente en cuatro zonas.

Las muestras de sangre (material biológico) fueron provistas por un grupo de investigadores de campo, que formaron parte del mismo proyecto de tesis de Postdoctorado titulado “Sexual Conflict in the Tropics: Can Females Provide a Resolution when Males Control Mating

Opportunities?”. Luego analizadas en el laboratorio de la Unidad Especializada de Biotecnología del Centro de Investigaciones de Recursos Naturaleza de la Amazonía (CIRNA). El trabajo tuvo una duración de 7 meses (marzo-octubre, 2013).

3.2. MÉTODOS

Tenemos que resaltar que en este estudio se realizó el procesamiento y análisis de las muestras de sangre en el laboratorio. Sin embargo, fue necesario hacer referencia al trabajo de campo ya que gracias a ello finalmente se proveyó el material biológico.

A.) Trabajo de Campo

3.2.1. Captura de paucares.

Se realizó mediante redes de neblina que se colocaron alrededor de las colonias de acuerdo con la ubicación vertical de los nidos. Las aves se extrajeron manualmente con mucho cuidado evitando estresarlos. Luego con un calibrador digital 0 – 150 mm y una regla de metal de 30 cm, se tomaron medidas morfométricas del ala, pico, cola, tibia y otras estructuras importantes para determinar la edad y sexo. Se pesaron mediante “pesolas” de 300 g y 100 g (Anexo 3).

3.2.2. Anillamiento de las aves.

Se procedió al marcado de cada individuo para su identificación dentro de la colonia. Para ello se estableció combinaciones diferentes en una plantilla de trabajo para cada espécimen⁸², las cuales se siguió para

colocar los anillos de acero inoxidable plateado y los de plástico de diferentes colores en el tarso de los paucars. Los anillos de acero se colocaron en el tarso derecho de los machos y en el izquierdo de las hembras, las combinaciones se leyeron de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo (Anexo 4). Además, se elaboró un resumen de los individuos estudiados por edad, sexo y lugar de procedencia (Anexo 5).

3.2.3. Identificación de los paucars.

La categorización de los paucars se desarrolló considerando las características morfológicas y fisiológicas de acuerdo con las variables de estudio.

Sexo: Las hembras son más pequeñas que los machos, sin embargo; tienen colores similares pero las hembras tienden a ser menos coloridas.

Edad:

Polluelos (0-12 meses): En los primeros años tienen manchas marrones en la base del pico y los ojos de color púrpura oscuro.

Juveniles (13-48 meses): El pico es de color amarillo claro y tiene los ojos azules. Los machos tienen bordes aceitunados en las plumas del vientre y las hembras tienen rastros de color púrpura en sus ojos. En el tercer año expresan la coloración adulta.

Adultos (49 ≥): Son en su mayoría de color negro, pero tienen un punto amarillo en las alas y otro parche de color amarillo brillante en su rabadilla. Tienen los ojos de color azul pálido y un pico de color amarillo verdoso.

3.2.4. Toma de muestras de sangre.

Para la toma de muestra se utilizó el método de punción de la vena braquial o ulnar del ala de las aves⁸³ (Anexo 6). Primero se limpió el área con algodón empapado de alcohol al 96%, con una aguja hipodérmica de 26 a 27½ g se penetró el área, una vez que la sangre fue expulsada se retiró la primera gota para evitar contaminación. Las muestras se colectaron por medio de tubos capilares de $75 \pm 1,00$ mm de longitud y $1,55 \pm 0,05$ mm de diámetro. La herida se cubrió con algodón presionándolo con los dedos hasta que la sangre se coagule (entre 30 y 60 s) y finalmente se liberó al ave (Anexo 7).

3.2.5. Procesamiento y conservación de las muestras.

Las muestras de sangre obtenidas en tubos capilares se colocaron en tarjetas FTA Whatman, se rotularon con sus respectivos códigos (Anexo 8) y se almacenaron a temperatura ambiente dentro de bolsas ziploc con gel de sílice ($21,8^{\circ}\text{C} - 31,4^{\circ}\text{C}$), hasta la realización de las pruebas moleculares.

B.) Trabajo de Laboratorio

3.2.6. Análisis Molecular.

Todas las muestras se analizaron para diagnosticar infecciones por hemoparásitos, usando técnicas de biología molecular para detectar la presencia de ADN del parásito.

Para la extracción de ADN (Anexo 9) se utilizó el protocolo de precipitación por sales (salting-out)⁸⁴, que consistió en extraer 2 pequeños discos con la muestra de sangre impregnada en la tarjeta FTA whatman, se colocó en un microtubo para adicionar 300 µl de buffer TNES a pH 7,5 (Anexo 10) y 10 µl de Proteinasa 10 mg/µl (Anexo 11), se incubó a 55 °C en el agitador a temperatura por 2 horas, se agregó 85 µl de NaCl 5M y vorteo por 15 s. Se centrifugó por 10 min, se decantó el sobrenadante en un nuevo microtubo, se agregó 500 µl de EtOH 100%, se centrifugó por 15 min y se eliminó el etanol, obteniendo el pellet, que se lavó con 200 µl de EtOH 70%, se volvió a centrifugar por 10 min. Cuidadosamente con una micropipeta, se descartó el etanol, se secó a 35 °C por 30 – 40 min en un equipo de baño seco digital de dos bloques y finalmente se agregó 40 µl de agua estéril.

Para la amplificación utilizamos el protocolo PCR anidada que consistió en realizar dos PCR's para cada muestra, con diferentes primers cada una. A partir de muestras en las que detectamos resultados positivos, utilizamos cebadores diseñados para amplificar un fragmento de 478 pares de bases (pb) del gen mitocondrial citocromo b. La reacción externa de PCR se corrió en volúmenes que contienen las siguientes concentraciones finales: 2,5 µl de Taq polimerasa, 1,5 de MgCl₂ 25 mM, 2.5 µl de Gold buffer 10x PCR, 1,0 µl de desoxinucleótido trifosfato, 1,5 x 2 µl de cada primer y 1 µl de ADN genómico, disueltos en 13,5 µl por muestra (Anexo 12). Los cebadores utilizados fueron HaemNFI (5'-CATATATTAAGAGAAITATGGAG-3') y HaemNR3 (5'-

ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC-3'). El perfil térmico empezó con 3 min de desnaturalización a 94 °C, seguido por 20 ciclos de 94 °C por 30 s, 50 °C por 30 s, 72 °C por 45 s, y finalizó con una etapa de elongación de 72 °C por 10 min (Anexo 13). Para todas las muestras se vertió 1 µl de alícuota de este producto como molde para la reacción interna con las mismas proporciones de reactivos y perfil térmico, con la diferencia del número de ciclos aumentó a 35 en vez de 20 ciclos; además de los cebadores utilizados HaemF (5'-ATGGTGCTTTTCGATATATGCATG-3') y HaemR2 (5'-GCATTATCTGGATGTGATAATGGTAATGGT-3') según Hellgren *et al.*⁸⁵.

Para verificar si los productos de la PCR se amplificaron con éxito, se realizó electroforesis a todas las muestras. Se corrió 3 µl del producto final en gel de agarosa 2% (Anexo 14) a 100 Voltios por 10 min. Se utilizó el software BioDocAnalyze para observar la formación de bandas en las muestras positivas para la evaluación posterior. Todas las corridas se efectuaron con un control positivo y un negativo.

La purificación de los amplicones se realizó utilizando el sistema de purificación enzimática con ExoSAP-IT⁸⁶ (Anexo 15). Que consiste en degradar los cebadores no incorporados y dNTPs (sin perder la muestra), para que no interfieran con el secuenciamiento posterior.

Los productos purificados fueron sometidos a una reacción de secuenciamiento en ambas direcciones, empleando los primers de la

reacción interna de PCR (HaemF y HaemR2), mediante el protocolo estándar de Secuenciamiento con Big Dye terminator v3.1 (Anexo 16).

La purificación de los productos de la reacción de secuenciación se realizó por precipitación, adicionando EtOH/EDTA a las muestras (Anexo 17). Finalmente se dispensó 10 µl de HiDi formamida.

El secuenciamiento de las muestras se realizó con un 3130xl Genetic Analyzer, que utiliza el Método de Sanger⁸⁷ para el secuenciamiento de ácidos nucleicos con parámetros estandarizados (Anexo 18). Secuenciamos 478 pares de bases (pb) del gen mitocondrial citocromo b para *Plasmodium spp.*, *Haemoproteus spp.* y *Leucocytozoon spp.*

El análisis de las secuencias de ADN se realizó con el programa Geneious 6.1.6 para editar, alinear y comparar; se utilizó la función búsqueda BLAST de MalAvi v2.0.6 (mbio-serv2.mbioekol.lu.se/Malavi/)⁸⁸ para encontrar coincidencias entre los más de 1500 linajes hemosporidianos únicos disponibles en la actualidad en las bases de datos. Los materiales utilizados en cada uno de los procedimientos mencionados se muestran en el Anexo 19.

Para realizar el análisis filogenético se empleó el método de Neighbor-Joining en el programa Geneious 6.1.6, para la construcción del árbol filogenético y estimar la distancia genética con el modelo de Jukes-Cantor.

3.2.7. Prevalencia de hemoparásitos.

Para calcular la prevalencia de los hemoparásitos se recurrió a la siguiente fórmula⁸⁹:

$$P = \frac{N^{\circ} \text{ de individuos infectados}}{N^{\circ} \text{ total de individuos de la colonia}} \times 100$$

3.2.8. Procesamiento y análisis de datos.

Los datos obtenidos en las plantillas de campo fueron ordenados según las variables de estudio, mediante el programa EXCEL 2010. Para los análisis estadísticos se realizó un análisis descriptivo mediante tablas de doble entrada comparando las variables en estudio, utilizando la prueba estadística Chi-cuadrado el programa SPSS Statistics v21 (Anexos 20,21,22,23,24).

IV. RESULTADOS

4.1. Prevalencia de Hemoparásitos.

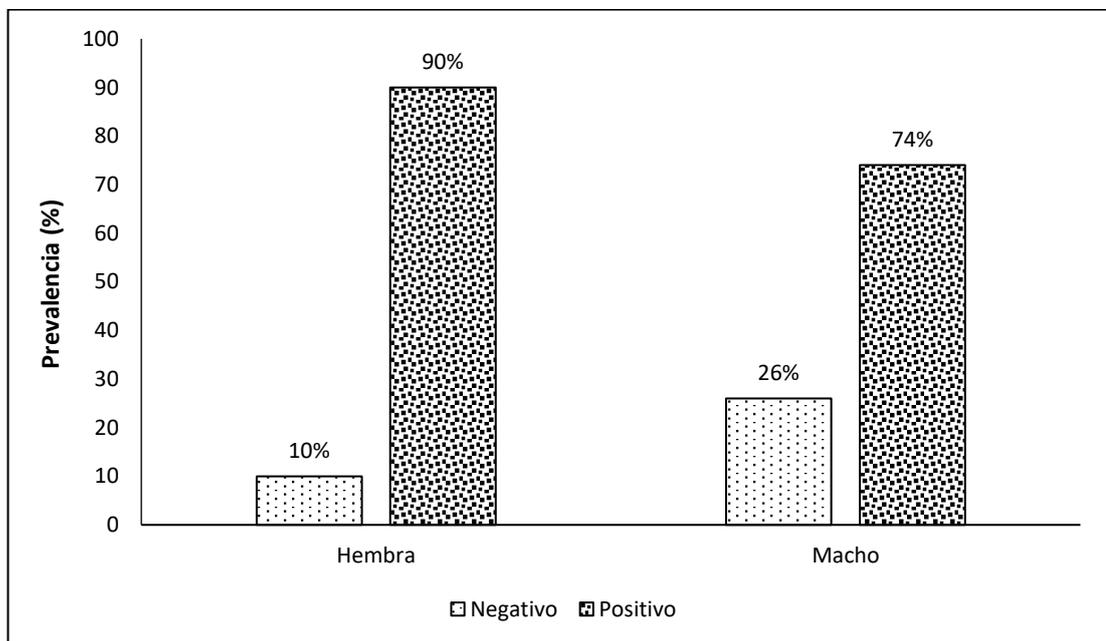
De las 89 aves analizadas, 74 estuvieron infectados por parásitos del género *Plasmodium*. Esto indica una alta prevalencia de hemoparásitos (83,1%) en las colonias estudiadas de *Cacicus cela* "paucares". También se observó diferencias en la prevalencia de las infecciones con la ubicación geográfica de las colonias. Como fue en la Comunidad Mishana (n = 12, 100%) y el Centro de Investigaciones Alpahuayo (n = 28, 100 %) con la totalidad de sus individuos infectados, Quistococha (n = 34/39, 87%) y Propiedad Privada (n = 10, 0%), donde sólo se capturaron polluelos (no presentaron ningún tipo de infección por hemoparásitos) (Figura 3). Al analizar los datos, las diferencias estadísticas fueron significativas ($X^2 = 57,89$; $gl = 3,0$; $p = 0.000$).

Figura 3. Prevalencia de hemoparásitos con respecto a la ubicación geográfica de las colonias de *C. cela* en la carretera Iquitos – Nauta.



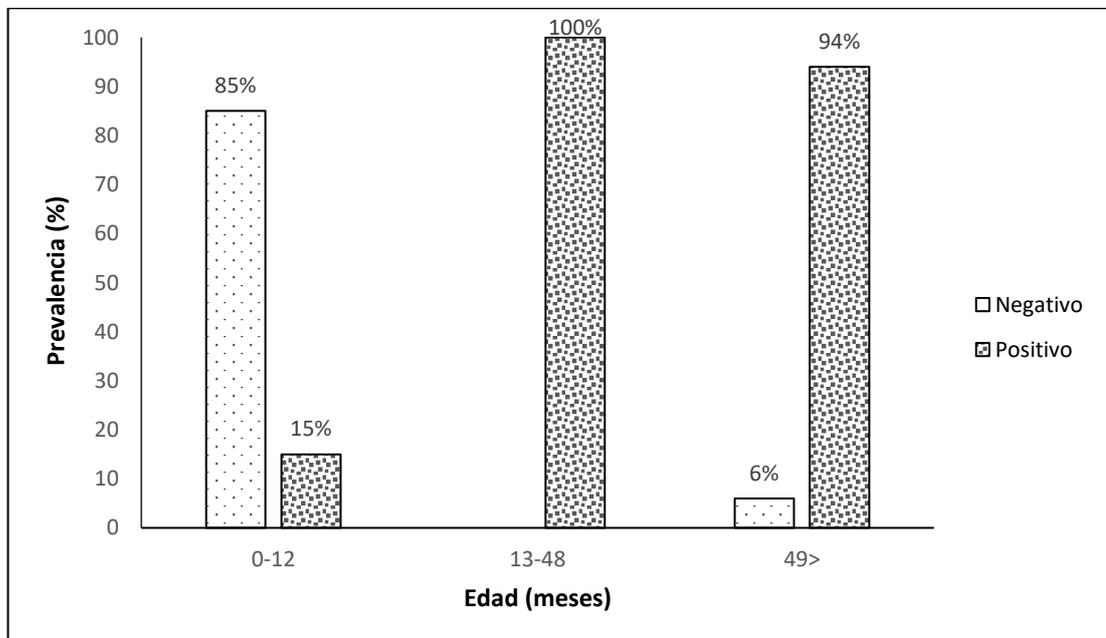
Como se evidencia en la Figura 2, los paucares hembras presentaron mayor prevalencia de hemoparásitos que los machos, esta diferencia resulta ser significativa ($X^2 = 4,24$; $gl = 1$, $p = 0,04$). Por lo que concluimos, que la infección por hemoparásitos está asociada al sexo de los paucares.

Figura 4. Prevalencia de hemoparásitos en “paucares” machos y hembras de las colonias muestreadas.



Los resultados de la prevalencia de hemoparásitos fueron mínimas en polluelos (2 infectados de 13; 15,4%), seguido por los adultos (60 infectados de 64; 93,8%) e incrementándose en juveniles (12 infectados de 12; 100%) (Figura 5). Al análisis estadístico, ésta diferencia fue significativa ($X^2 = 50,16$; $gl = 2,0$; $p = 0,000$). Por lo que concluimos, que la infección por hemoparásitos está asociada a la edad de los paucares.

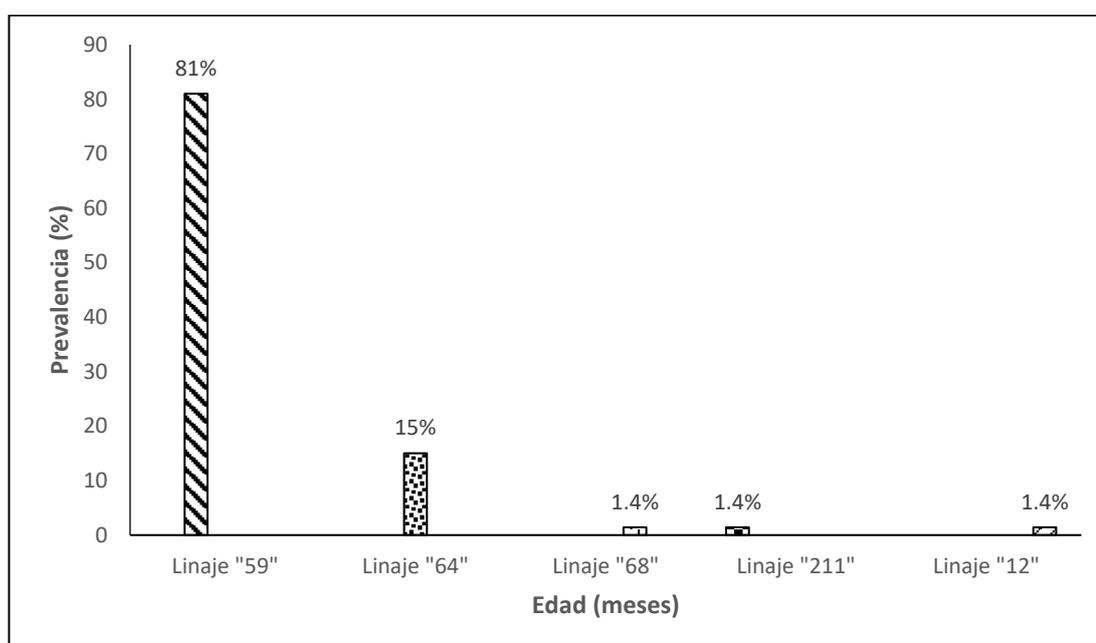
Figura 5. Prevalencia de hemoparásitos en los diferentes grupos etarios.



4.2. Linajes de hemoparásitos.

El análisis de la secuenciación de un fragmento del gen mitocondrial citocromo b reveló cinco linajes. Estos linajes fueron el "59", "64", "68", "211" y "12" y pertenecen al género *Plasmodium*. De los cuales, los últimos cuatro son nuevos registros para la comunidad científica. El Linaje más común fue el "59" (n = 60; 81,1%), seguido por el "64" (n = 11; 14,9%) y los otros tres linajes "68", "211" y "12" fueron menos frecuentes (n = 1; 1,4%) (Figura 6).

Figura 6. Prevalencia de los Linajes de *Plasmodium* encontrados en este estudio.



Los linajes registrados en este estudio fueron comparados con las zonas de muestreo y las edades de los paucareos. En **Quistococha**, fueron reportados los linajes "59", "211", "64", "68". En el **CIA**, los linajes "59", "12", "64" y en la **Comunidad Mishana** los linajes "59", "64". Los resultados de la prevalencia de los linajes con las zonas de muestreo no fueron estadísticamente significativos ($X^2 = 5,291$; $gl = 8$, $p = 0,726$) (Figura 7). Sin embargo, con

respecto a las edades de las aves los resultados fueron estadísticamente significantes ($X^2 = 37,652$; $gl = 8$, $p = 0,000$). Encontrándose el **linaje "59"** en un polluelo (1.4%), once juveniles (14.9%) y cuarentaiocho adultos (64.9%). El **linaje "211"** en un polluelo (1.4%), el **linaje "64"** en un juvenil (1.4%) y en diez adultos (13.5%). El **linaje "68"** en un adulto (1.4%), el **linaje "12"** en un adulto (1.4%) (Figura 8).

Figura 7. Prevalencia de los Linajes de *Plasmodium* encontrados en las zonas de muestreo.

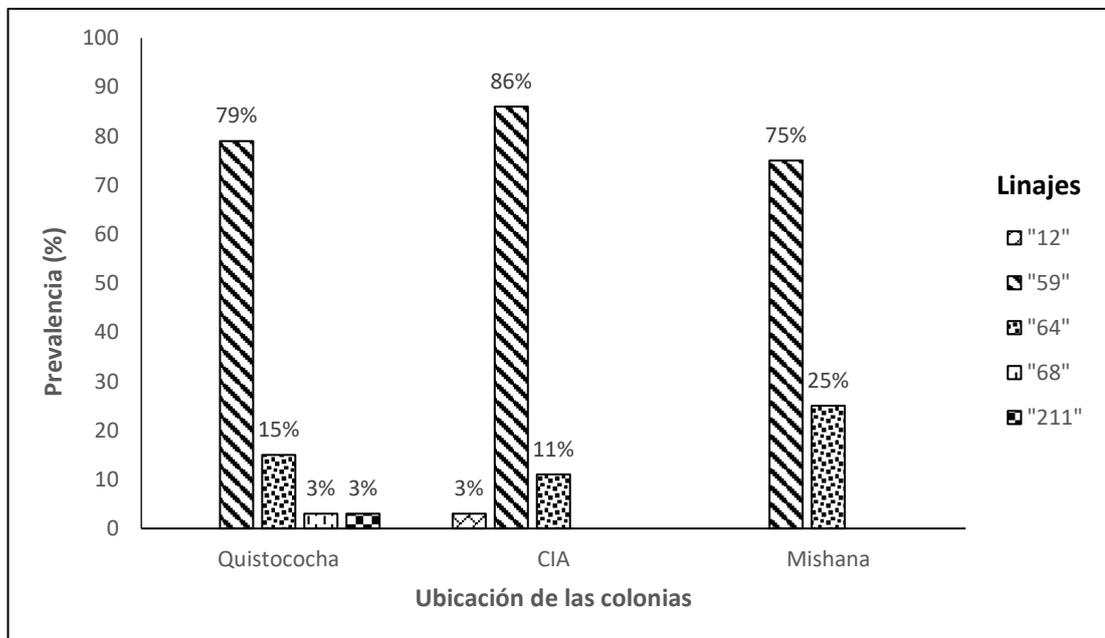
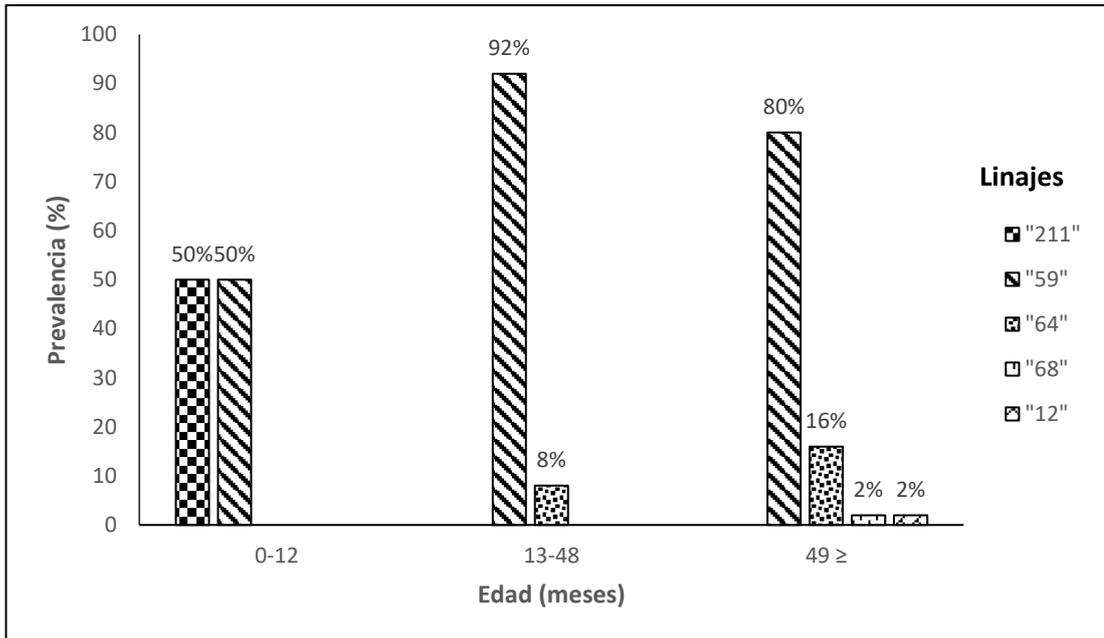


Figura 8. Prevalencia de Linajes de *Plasmodium* en las edades de los paucares

(Polluelos = 0 – 12 meses, juveniles = 13 – 48 meses, adultos = ≥ 49).



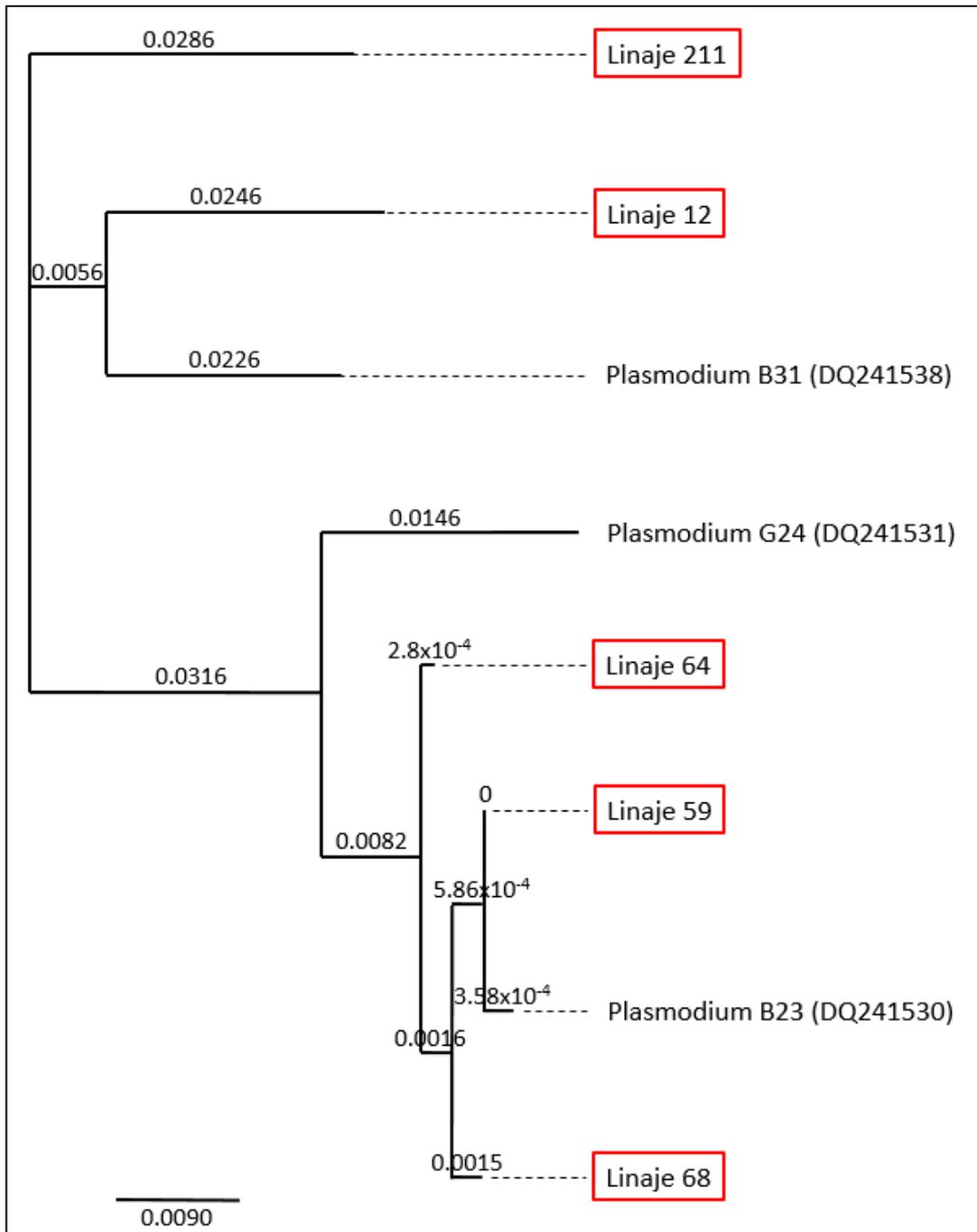
4.3. Análisis Filogenético.

En análisis filogenético en base a la secuencia del citocromo b mostró las relaciones entre los cinco linajes de *Plasmodium* (Figura 9). Los linajes “211” y “68” se encontraron exclusivamente en la zona de Quistococha y el linaje “12” se encontró en el Centro de Investigaciones Allpahuayo. Asimismo, la diversidad de parásitos fue mayor en Quistococha que en el Centro de Investigaciones Allpahuayo y la Comunidad Mishana.

Además, el análisis filogenético mostró la formación de dos clados bien definidos de los parásitos. El primer clado estuvo constituido por los linajes “64”, “59” y “68”, junto a las accesiones homólogas de los parásitos identificados en *Volatinia jacarina* (accesión en GenBank: DQ241530) y *Cacicus cela* (accesión en GenBank: DQ241531). El segundo clado, estuvo conformado por los linajes “211” y “12” junto con el parásito identificado en *Pitylus grossus* (accesión en GenBank: DQ241538).

El linaje “211” es el más cercano al linaje PESA01 [465/466 (99%)] y el “12” más cercano a CATUST05 (*Turdus spp.*) [470/478 (98%)], secuencias homólogas de la base de datos MalAvi, que probablemente poseen un origen en común. Además, se encontraron diferencias en las pares de bases que oscilaron entre 1-34 (0,2-7,1% de diferencia) y en aminoácidos que variaron entre 1-8 (0,6-5,1% de diferencia). Todos los SNPs (Polimorfismo de un nucleótido), encontrados fueron mutaciones silenciosas.

Figura 9. Relaciones filogenéticas de los linajes encontrados en las colonias de *Cacicus cela* “paucarens”. Los linajes encerrados en el rectángulo de color rojo son los registrados en este estudio y los otros son accesiones obtenidas del GenBank de MalAvi (<http://mbio-serv2.mbioekol.lu.se/Malavi/>).



V. DISCUSIÓN

La prevalencia de infecciones por hemoparásitos del género *Plasmodium* en las colonias estudiadas de *Cacicus cela* es alta (83,1%). Estos resultados fueron similares a los reportados para otras especies como *Lanius collurio* del sur de la República Checa, donde encontraron una prevalencia de 73,8% en ejemplares adultos⁵⁴. De igual manera, Chasar *et al.*⁵, encontró en *Cyanomitra olivacea* y *Andropadus latirostris* de la selva tropical de África prevalencias del 70,2% y 58,2% respectivamente. Asimismo, Belo *et al.*³⁷; registró una prevalencia de 49% de hemoparásitos en aves de la Amazonía brasilera y Ricopa *et al.*¹⁶, indicaron que en aves de la Reserva Nacional Allpahuayo Mishana hay una prevalencia de hemoparásitos de sólo el 16%. Sin embargo, la especie más infectada por hemoparásitos fue *Cacicus cela* con el 88% y 6,24%, respectivamente. De acuerdo con Tella *et al.*⁴⁰, la reproducción colonial de las aves puede imponer un alto riesgo de infección y por ende una alta prevalencia de hemoparásitos. También, Bennett *et al.*⁴², corroboraron estas observaciones al encontrar una mayor prevalencia de hemoparásitos en especies coloniales en una comunidad de aves en Senegal. Esto hace pensar que, al parecer los vectores se sienten atraídos por la cuantiosa cantidad de CO₂ y calor que emanan los individuos de la colonia.

Las prevalencias de hemoparásitos fueron altas (100%) en las colonias, a excepción de Propiedad Privada que no encontramos paucareos infectados por hemoparásitos. Esto porque el estudio se lleva a cabo en zonas tropicales, donde existe una mayor actividad del vector; así como lo confirmó Durrant *et*

*al.*⁷⁴, donde comparó la zona tropical de Guyana 42 % y la zona templada de Uruguay 24%. La variación geográfica en la prevalencia se puede atribuir a diferencias en la exposición a vectores de parásitos y/o de la vulnerabilidad a los parásitos. En este estudio, se evidenció que por ser una zona tropical la abundancia de vectores juega un papel importante en las diferencias de la prevalencia²². Así como otros factores como las condiciones de hábitat, colonia del ave y la actividad del vector, la cual influencia la transmisión del parásito⁶³.

Las diferencias relacionadas con el sexo del ave afectan a la prevalencia de hemoparásitos como lo confirman nuestros resultados, así como otros trabajos que atribuyen a las hembras comúnmente infectadas^{17,36}. Por el contrario, McCurdy *et al.*⁴⁶, revisando los datos de 33 estudios no encontró diferencias estadísticas significativas en la prevalencia entre machos y hembras; sin embargo, menciona que las infecciones por *Uaemoproteus* (el género más común de hemoparásito encontrado) fueron significativamente más frecuentes en las hembras. Probablemente esto depende a la exposición de los paucareos hembras a los vectores que transmiten los hemoparásitos, ya que son las que intervienen completamente en el cuidado de las crías, colectan materiales para la construcción del nido, buscan y alimentan a los pichones. Además, porque la reducción de la actividad de locomoción durante el período de anidación es un factor de aumento de la probabilidad de la infección con hemosporidians¹⁷. Caso contrario, los machos no juegan ningún papel en el cuidado parental de las crías; ellos sólo se dedican a proteger el territorio y reproducirse^{44, 52}. Por otro lado, la disimilitud en la

prevalencia de hemoparásitos entre hembras y machos puede significar que ambos sexos son distintamente susceptibles al parásito, por el supuesto efecto inmunosupresor de determinadas hormonas sexuales³⁴.

El efecto de la edad sobre la prevalencia de hemoparásitos en hospederos es un tema controversial en la ecología aviar. Por un lado, el número de encuentros parásito-hospedero y la acumulación de las infecciones con el tiempo significan que podemos esperar un patrón de mayor prevalencia de parásitos en los adultos que en las etapas tempranas de la vida^{49,50}. Por otro lado, la baja de defensas inmunológicas y de comportamiento contra parásitos de los polluelos en comparación con adultos sugiere el patrón opuesto, con mayor prevalencia esperada en los polluelos que en los adultos⁵¹. En este trabajo encontramos que la prevalencia de hemoparásitos fue mayor en los paucares juveniles, este resultado fue consistente con el trabajo realizado por Sol *et al.*⁴⁸, que comparó dos tiempos de captura en palomas, encontrando la intensidad del parásito en juveniles del 76.3% más alta que la de los adultos en la captura inicial. Sin embargo, cuando estos fueron recapturados mostrando la morfología adulta, sus intensidades habían experimentado una disminución dramática. Así mismo, van Oers *et al.*³⁶, reporta que en *Acrocephalus sechellensis* los adultos tienen menos probabilidades de infectarse que los juveniles, como consecuencia de la supresión individual de infección y la mortalidad selectiva, aunque esto ya sale del objetivo de encontrar la prevalencia de infección en las aves. Por otro lado, también algunos estudios de prevalencia de la malaria aviar en edad estratificada a menudo excluyen a la cohorte de pichones, muy probablemente debido a una

idea preconcebida de que el período pre-patente de la enfermedad es más larga que el período de pichones de la mayoría de las especies de aves²⁹.

Encontramos una baja diversidad de linajes, sin embargo, la mayoría nuevos descubrimientos para la ciencia. La diversidad, distribución geográfica y las relaciones filogenéticas de parásitos de malaria aviar y otros hemoparásitos son poco conocidas⁵⁶. Investigaciones de hemoparásitos son escasas en relación con su potencial de estudio y mucha información básica es todavía necesaria para entender los factores ecológicos y evolutivos que determinan la distribución de estos parásitos de la especie hospedadora de la misma comunidad de aves²⁸. El análisis filogenético mostró linajes de hemoparásitos muy relacionados entre sí, sin embargo; no presentan especificidad geográfica. Probablemente se deba a que el estudio no se extendió a lugares o zonas más alejadas, como el realizado por Durrant *et al.*⁷⁴, donde investigó dos diferentes regiones (zona tropical de Guyana y zona templada de Uruguay), de las cuales encontraron haplotipos únicos dentro y entre regiones. Los estudios filogenéticos de parásitos, dentro de un contexto regional, son necesarios para evaluar una asociación hospedero-parásito a nivel comunitario, incluyendo el grado de especialización por el anfitrión y la ubicación geográfica de los linajes de parásitos²⁸.

VI. CONCLUSIONES

- ❖ De acuerdo con las evidencias mostradas en este trabajo, se demostró que las variables en estudio como la ubicación de la colonia de paucares, la edad y el sexo de estos estuvo asociada la prevalencia de hemoparásitos.
- ❖ La prevalencia de hemoparásitos en *Cacicus cela* “paucares” fue alta en la amazonia peruana.
- ❖ Las hembras de paucares abarcan distancias mayores y están más expuestas a los vectores y presentaron mayor infección por hemoparásitos que los machos.
- ❖ Las infecciones por hemoparásitos están asociada a la edad de los paucares.
- ❖ Todos los linajes de hemoparásitos encontrados pertenecen al género *Plasmodium*, causante de la “verdadera” malaria aviar y mostraron relaciones filogenéticas cercanas entre sí.
- ❖ La aportación principal de este trabajo fue el descubrimiento de 4 nuevos linajes, que servirán de referencia a los próximos estudios.

VII. RECOMENDACIONES

- ❖ Trabajar con un mayor número de individuos, para confirmar las conclusiones de esta investigación e incluir otras especies de aves para verificar los resultados obtenidos para corroborar si existe una relación específica entre parásito-hospedero.

- ❖ Comparar colonias establecidas en diferentes regiones para observar si existen diferencias marcadas entre las variables propuestas en este estudio.

- ❖ Realizar una evaluación a largo plazo, que implica la ampliación de las variables a medir; para descartar o aceptar los impactos negativos que pueda poner en peligro la supervivencia de los individuos.

- ❖ Realizar el trabajo de campo juntamente con el de laboratorio para tener una visualización más amplia del estudio en sí.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ridgely RS, Rudor G. The Birds of South America. The Oscine Passerines. Univ Texas Press. Austin. 1989; vol 1.
2. Robinson SK. Coloniality in the Yellow-Rumped Cacique as a Defense against Nest Predators. *The Auk*. 1985; 102(3):506-519.
3. Organización Mundial de la Salud. Enfermedades transmitidas por vectores. Nota de prensa: OMS; 2016. Nota descriptiva: 387.
4. Greiner EC, Bennett GF, White EM, Coombs RF. Distribution of the avian hematozoa of North America. *Can J Zool*. 1975; 53(12): 1762-1787.
5. Chasar A, Loiseau C, Valkiūnas G, Iezhova T, Smith TB, Sehgal RN. Prevalence and diversity patterns of avian blood parasites in degraded African rainforest habitats. *Mol Ecol*. 2009; 18, 4121-4133.
6. Fahrig L. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematic*. 2003; 34: 487–515.
7. Devictor V, Julliard R, Clavel J, Jiguet F, Lee A. Functional biotic homogenization of bird communities in disturbed landscapes. *Glob Ecol Biogeogr*. 2008; 17: 252–261.
8. Smith TB, Mila B, Grether GF, Slabbekoorn H, Sepil I, Buermann W. *et al.* Evolutionary consequences of human disturbance in a rainforest bird species from Central Africa. *Mol Ecol*. 2008; 17: 58–71.
9. Walsh JF, Molyneux DH, Birley MH. Deforestation: Effects on Vector-Borne Disease. *Parasitology*. 1993; 106 (Suppl), S55–S75.
10. Carter R, Mendis KN, Roberts D. Spatial targeting of intervention against malaria. *Bull World Health Organ*. 2000; 78: 1401D1411.

11. Bensch S, Pérez-Tris J, Waldenström J, Hellgren O. Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences in avian malaria parasites: Multiple cases of cryptic speciation? *Evol.* 2004; 58: 1617–1621.
12. Perez-Tris J, Hasselquist D, Hellgren O, Krizanauskiene A, Waldenstrom J, Bensch S. What are malarial parasites? *Trends in Parasitology.* 2005; 21: 209-211.
13. Read AF. Passerine polygyny: a role for parasites? *Am. Nat.* 1991; 138: 434-459.
14. Matta NE, Rodríguez OA. Hemoparásitos Aviares. *Acta Biol Colomb.* 2001; 6(1); 27-34.
15. LaPointe DA, Atkinson CT, Samuel MD. Ecology and conservation biology of avian malaria. *Ann NY Acad Sci.* 2012; 1249:211–226.
16. Ricopa L, Villa ZH. Prevalencia y diversidad de hemoparásitos en aves capturadas en la Reserva Nacional Allpahuayo Mishana (RNAM) [Tesis de Pregrado, sin publicar]. [Iquitos]: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. 2013; 51p.
17. Valkiūnas G. Avian malaria parasites and other haemosporidia. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 2005.
18. van Riper C III. The impact of introduced vectors and avian malaria on insular Passeriform Bird Populations in Hawaii. *Bull Soc Vector Ecol.* 1991; 16:59–83.
19. Knowles SC, Wood MJ, Alves R, Wilkin TA, Bensch S, Sheldon BC. 2011. Molecular epidemiology of malaria prevalence and parasitaemia in a wild bird population. *Molecular Ecology.* 20(5): 1062-1076.

20. Atkinson CT, van Riper C III. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon*, and *Haemoproteus*. In *Bird-Parasite Interactions: Ecology, Evolution, and Behaviour*. Oxford University Press (ed. Loye JE and Zuk, M). 1991; 19-48.
21. Atkinson CT. Hemosporodiosis. In *Field Manual of Wildlife Diseases. General Field Procedures and Diseases of Birds*. Supersedes U.S. Fish and Wildlife Service Resources Publication (eds. M Friend y JC Franson). Madison, USA. 1999.
22. Ricklefs RE, Fallon SM, Bermingham E. Evolutionary relationships, co-speciation, and host switching in avian malaria parasites. *Syst Biol*. 2004; 53:111–119.
23. Merino S, Potti J, Fargallo JA. Blood Parasites of Passerine Birds from Central Spain. *J Wildl Dis*. 1997; 33(3):638-641.
24. Forrester DJ, Telford SR Jr, Foster GW, Bennett GF. Blood Parasites of Raptors in Florida. *J Raptor Res*. 1994; 28(4):226-231.
25. Pagenkopp KM, Klicka J, Durrant KL, Garvin JC, Fleischer RC. Geographic variation in malarial parasite lineages in the common yellow throat (*Geothlypis trichas*). *Conserv Genet*. 2008; 9:1577–1588.
26. Marzal A, Bensch S, Reviriego M, Balbontin J, De Lope F. Effects of malaria double infection in birds: one plus one is not two. *J Evol Biol*. 2008,21: 979-987. doi:10.1111/j.1420-9101.01545.x.
27. Woodworth BL, Atkinson CT, La Pointe DA, Hart PJ, Spiegel CS, Tweed EJ, *et al*. Host population persistence in the face of introduced vector-borne diseases: Hawaii amakihi and avian malaria. *Proc Natl Acad Sci*. 2005; 102(5):1531-1536.

28. Stjernman M, Raberg L, Nilsson JA. Survival costs of reproduction in the blue tit *Parus caeruleus*: a role for blood parasites? Proc R Soc B.2004; 271(1555):2387-2394.
29. Marzal A, De Lope F, Navarro C. & Møller AP. Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. Oecol. 2005,142: 541–545.
30. Bensch S, Waldenstrom J, Jonzen N, Westerdahl H, Hansson B, Sejberg D, *et al.* Temporal dynamics and diversity of avian malaria parasites in a single host species. J Anim Ecol. 2007; 76(1):112-122.
31. Atkinson CT, Dusek RJ, Woods KL, Iko WM. Pathogenicity of avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. J Wildl Dis. 2000; 36(2):197-204.
32. Stjernman M, Raberg L, Nilsson JA. Maximum Host Survival at Intermediate Parasite Infection Intensities. PLoS One. 2008; 3(6): e2463.
33. Hamilton WD, Zuk M. Heritable true fitness and bright birds: A role for Parasites? Science.
34. Ricklefs RE, Swanson BL, Fallon SM, Martinez-Abraín A, Scheuerlein A, Gray J, *et al.* Community relationships of avian malaria parasites in southern Missouri. Ecol Monogr. 2005; 75(4):543-559.
35. Ferrell ST, Snowden K, Marlar AB, Garner M, Lung NP. Fatal Hemoprotozoal Infections in Multiple Avian Species in a Zoological Park. J Zoo Wildl Med. 2007; 38(2):309-16.
36. van Oers K, Richardson DS, Sæther SA, Komdeur J. Reduced blood parasite prevalence with age in the Seychelles Warbler: selective mortality or suppression of infection? J Ornithol. 2010; 151:69–77.

37. Belo NO, Pinheiro RT, Reis ES, Ricklefs RE, Braga EM. Prevalence and Lineage Diversity of Avian Haemosporidians from Three Distinct Cerrado Habitats in Brazil. PLoSOne. 2011; 6(3): e17654.
38. Korpimäki E, Hakkaraineann H, Bennett GF. Blood Parasites and Reproductive Success of Tengmalm's Owls: Detrimental effects on females but not on males? Func Ecol. 1993; 7:420-426.
39. Garvin MC, Marra PP, Crain SK. Prevalence of Hematozoa in Overwintering American Redstarts (*Setophaga ruticilla*): No Evidence for Local Transmission. J Wildl Dis. 2004; 40(1): 115-118.
40. Tella JL, Forero MG, Gajon A, Hiraldo F, Donazar JA. Absence of blood-parasitization effects on Lesser Kestrel fitness. Auk. 1996; 113:253-256.
41. Forero MG, Tella JL, Gajon A. Absence of Blood Parasites in the Red-Necked Nightjar. J Field Ornithol. 1997; 68(4):575-579.
42. Bennett GR, Blancou J, White KM, Williams NA. Blood parasites of some birds from Senegal. J Wildl Dis. 1978. 14: 67-73.
43. Brown CR, Brown MB. Spleen volume varies with colony size and parasite load in a colonial bird. Proc R Soc Lond. 2002; 269:1367-1373.
44. Webster MS. Sexual Dimorphism, Mating System, and Body Size in New World Blackbirds (Icterinae). Evol Med Public Health. 1992; 46:1621-1641.
45. Dawson RD, Bortolotti GR. Sex-specific associations between reproductive output and hematozoan parasites of American kestrels. Oecol. 2001; 126:193-200.
46. McCurdy DG, Shutler D, Mullie A, Forbes MR. Sex-biased parasitism of avian hosts: relations to blood parasite taxon and mating system. Oikos. 1998; 82:303-312.

47. Sol D, Jovani R, Torres J. Geographical variation in blood parasites in feral pigeons: the role of vectors. *Ecography*. 2000; 23(3):307-314.
48. Sol D, Jovani R, Torres J. Parasite mediated mortality and host immune response explain age-related differences in blood parasitism in birds. *Oecol*. 2003; 135 (4): 542-547.
49. Dobson A, Hudson P. Microparasites: observed patterns in wild animal populations. In: Grenfell BT, Dobson AP, editors. *Ecology of infectious diseases in natural populations*. Cambridge University Press; 1995: 52–89.
50. Deviche P, McGraw K, Greiner E. Interspecific differences in hematozoan infection in Sonoran Desert *Aimophila* sparrows. *J Wildl Dis*. 2005; 41:532. doi: 10.7589/0090-3558-41.3.532. [PubMed] [Cross Ref].
51. Hudson P, Dobson A. Host-parasite Processes and Demographic Consequences. In: Clayton DH, Moore J, editors. *Host-parasite evolution: general principles and avian models*. Oxford University Press; 1997: 128–154.
52. Allander K, Bennett GF. Prevalence and intensity of haematozoan infection in a population. *J Avian Biol*. 1994; 25(1):69-74.
53. Cosgrove CL, Knowles SC, Day KP, Sheldon BC. No Evidence for Avian Malaria Infection During the Nestling Phase in a Passerine Bird. *J Parasitol*. 2006; 92(6):1302-1304.
54. Votýpka J, Simek J, Tryjanowski P. Blood parasites, reproduction and sexual selection in the red-backed shrike (*Lanius collurio*). *Ann Zool Fennici*. 2003; 40: 431-439.
55. Cox FE. *Modern parasitology*. Blackwell Science, Oxford, UK. 1993.

56. Dimitrov D, Zehtindjiev P, Bensch S. Genetic diversity of avian blood parasites in SE Europe: Cytochrome b lineages of the genera *Plasmodium* and *Haemoproteus* (Haemosporida) from Bulgaria. *Acta Parasitol.* 2010; 55(3):201-209.
57. Ishtiaq F, Gering E, Rappole JH, Rahmani AR, Jhala YV, Dove CJ, *et al.* Prevalence and Diversity of Avian Hematozoan Parasites in Asia: A Regional Survey. *J Wildl Dis.* 2007; 43(3):382–398.
58. Križanauskienė A, Hellgren O, Kosarev V, Sokolov L, Bensch S, Valkiūnas G. Variation in Host Specificity between Species of Avian Haemosporidian Parasites: Evidence from Parasite Morphology and Cytochrome b Gene Sequences. *J Parasitol.* 2006; 92(6):1319–1324.
59. Fallon SM, Bermingham E, Ricklefs RE. Host Specialization and Geographic Localization of Avian Malaria Parasites: A Regional Analysis in the Lesser Antilles. *Am Nat.* 2005; 165(4):466-480.
60. Bonneaud C, Pérez-Tris J, Federici P, Chastel O, Sorci G. Major histocompatibility alleles associated with local resistance to malaria in a passerine. *Evol.* 2006; 60(2):383-389.
61. Pérez-Tris J, Bensch S. Dispersal increases local transmission of avian malarial parasites. *Ecol Lett.* 2005b; 8(8):838-845.
62. Bensch S, Stjernman M, Hasselquist D, Ostman O, Hansson B, Westerdahl, *et al.* Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. *Proc R Soc B.* 2000; 267(1452):1583-1589.
63. Bennett GF, Witt H, White EM. Blood Parasites of Some Jamaican Birds. *Journal of Wildl Diseases.* 1980; 16(1):29-38.

64. Super PE, van Riper C III. California Coastal Scrub Communities. *J Wildl Dis.* 1995; 31(4):447-461.
65. Belo NO, LF, Júnior LMC, Goularta CE, Sherlock TM, Braga EM. Avian malaria in captive psittacine birds: Detection by microscopy and 18S rRNA gene amplification. *Prev Vet Med.* 2009; 88(2):220-224.
66. Richard FA, Sehgal RN, Jones HI, Smith TB. A Comparative Analysis of PCR-Based Detection Methods for Avian Malaria. *J Parasitol.* 2002; 88(4): 819–822.
67. Scheuerlein A, Ricklefs RE. Prevalence of blood parasites in European Passeriform birds. *Proc R Soc Lond.* 2004; 271:1363–1370.
68. Peirce MA. Distribution and host-parasite check-list of the haematozoa of birds in Western Europe. *J Nat Hist.* 1981a; 15:419-458.
69. Krams I, Suraka V, Cīrule D, Hukkanen M, Tummeleht L, Mierauskas P, *et al.* A comparison of microscopy and PCR diagnostics for low intensity infections of haemosporidian parasites in the Siberian tit *Poecile cinctus*. *Ann Zool Fennici.* 2012; 49: 331-340.
70. Valkiūnas G, Iezhova TA, Križanauskienė A, Palinauskas V, Sehgal RN, Bensch S. A Comparative Analysis of Microscopy and PCR-Based Detection Methods for Blood Parasites. *J Parasitol.* 2008; 94(6):1395–1401.
71. Ricklefs RE, Fallon SM. Diversification and host switching in avian malaria parasites. *Proc R Soc B.* 2002; 269:885-892.
72. Garamszegi LZ. The Sensitivity of Microscopy and PCR-Based Detection Methods Affecting Estimates of Prevalence of Blood Parasites in Birds. *J Parasitol.* 2010; 96(6):1197-1203.

73. Merino S, Moreno J, Sanz JJ, Arriero E. Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits *Parus caeruleus*. Proc R Soc B. 2000a; 267 (1461):2507-2510.
74. Durrant KL, Beadell JS, Ishtiaq F, Graves GR, Olson SL, Gering E, *et al.* Avian Hematozoa in South America: A Comparison of Temperate and Tropical Zones. Ornithol Monogr. 2006; 60:98-111.
75. Waldenström J, Bensch S, Kiboi S, Hasselquist D, Ottosson U. Cross-species infection of blood parasites between resident and migratory songbirds in Africa. Mol Ecol. 2002;11(8):1545-1554.
76. Wood MJ, Cosgrove CL, Wilkin TA, Knowles SC, Day KP, Sheldon BC. Within-population variation in prevalence and lineage distribution of avian malaria in blue tits, *Cyanistes caeruleus*. Molec Ecol. 2007; 16:3263–3273.
77. Robinson SK. Benefits, Costs, and Determinants of Dominance in a *Polygynous Oriole*. Anim Behav. 1986; 34:241-255.
78. Lowther PE. Geographic and Ecological Variation in the Family Icteridae. Wilson Libr Bull. 1975; 87(4):481-495.
79. Trainer JM. Behavioral Associations of Song Types during Aggressive Interactions among Male Yellow-Rumped Caciques. The Cond. 1987; 89(4):731-738.
80. Trainer JM, Parsons RJ. Delayed Vocal Maturation in Polygynous Yellow-Rumped Caciques. The Wilson Bull. 2002; 114(2):249-254.
81. Stotz, DF, Fitzpatrick JW, Parker TA III, Moskovits DK. Neotropical Birds: Ecology and conservation. Chicago Univ Press. 1996; 478.
82. Ralph CJ, Geupel GR, Pyle P, Martin TE, DeSante DF; Milá B. Manual de métodos de campo para el monitoreo de aves terrestres. Gen. Tech. Rep.

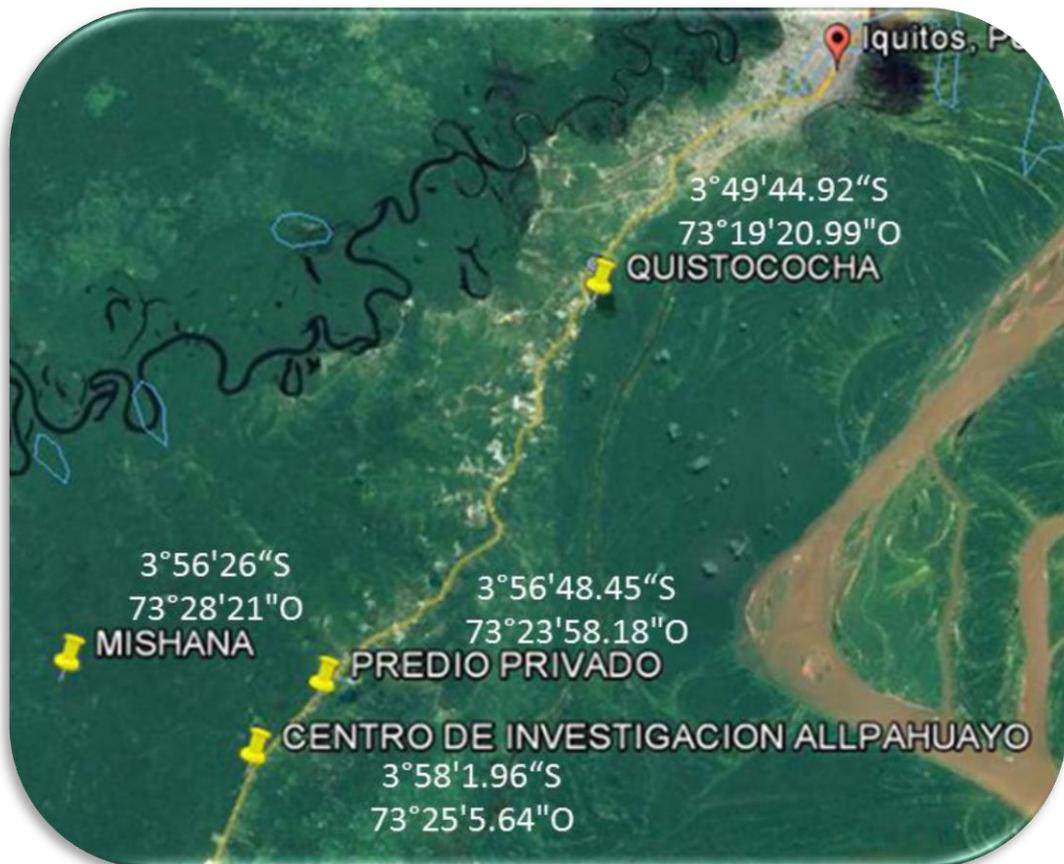
- PSW-GTR159. Albany, CA: Pacific Southwest Research Station, Forest Service, U.S. Department of Agriculture. 1996, 46.
83. Rose K, Newman S, Uhart M, Lubroth J. Producción y Sanidad Animal: Vigilancia de la influenza aviar altamente patógena en las aves silvestres: toma de muestras de aves sanas, enfermas y muertas. Manual ISSN 1 81 0- 11 43 11 FAO. Roma, 2007.
84. Sunnucks P, Hales DF. Numerous Transposed Sequences of Mitochondrial Cytochrome Oxidase I-II in Aphids of the Genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). *Mol Biol Evol.* 1996; 13(3):51-524.
85. Hellgren O, Waldenström J, Bensch S. A New PCR Assay for Simultaneous Studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from Avian Blood. *J Parasitol P.* 2004; 90(4):797–802.
86. Bell JR. A Simple Way to Treat PCR Products Prior to Sequencing Using ExoSAP-IT®. *Biotechniques.* 2008; 44(6). Doi: 10.2144/000112890.
87. Sanger F, Nicklen S, y Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Nat. Acad Sci.* 1977; 74(12): 5463-5467.
88. Bensch S, Hellgren O, Pérez-Tris J. MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. *Mol Ecol Resour.* 2009; 9(5):1353-1358.
89. Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW. Parasitology Meets Ecology on its own Terms: Margolis et al. Revisited. *J Parasitol.* 1997; 83(4):575-583.

IX. ANEXOS

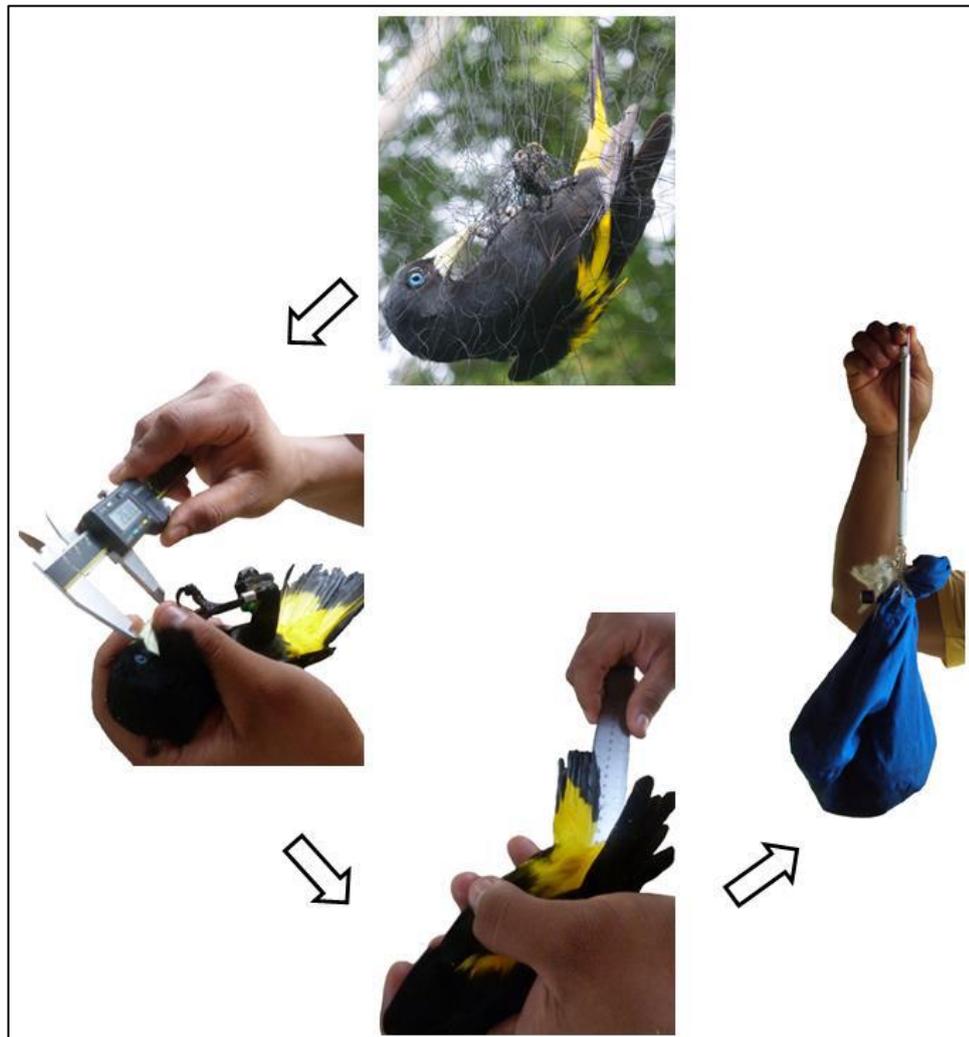
Anexo 1: Polluelo (25 días) capturado en la zona de Quistococha.



Anexo 2: Zonas de muestreos a lo largo de la carretera Iquitos-Nauta.



Anexo 3: Captura de las aves, mediciones morfométricas.



Anexo 4: Anillamiento de las aves y las diferentes combinaciones asignadas para cada individuo dentro de las colonias.

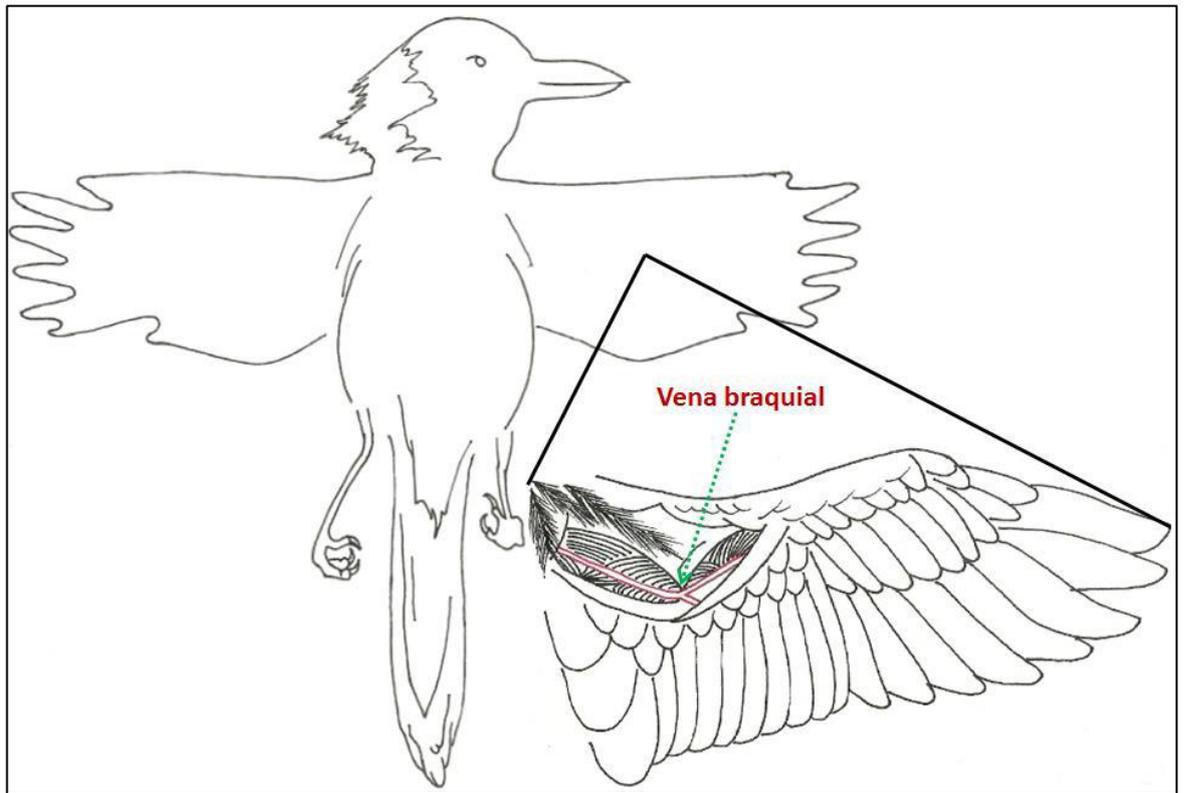
MACHO COLORES		HEMBRA COLORES	
Plata (Silver) = P	Yellow (Amarillo) = Y	Plata (Silver) = P	Yellow (Amarillo) = Y
RVP 1 /2	BRP 22	PV/V 601-3	AP/Y 140
VVP 11/3	NBP	PA/N 15	PN/V 141
RPR 1/4	RRP	PMM 60/6	*BP/V 142
V/PB 8/4	NNP 31	MP/N 62/7	PR/Y 143
BY/P 30/4	NVP	PVR 64/10	VP/B 144
MVP 30/11		MP/Y 1 /12	RP/R 150

Anexo 5: Hoja de datos, donde se registra el sexo, la edad y el lugar de los 89 ejemplares capturados. CIA: Centro de Investigaciones Allpahuayo, Prop Priv: Propiedad Privada.

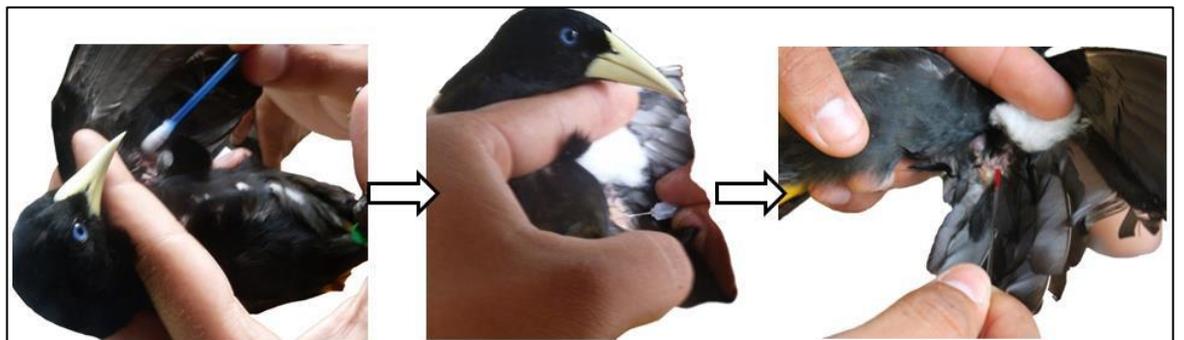
N° Muestra	Sexo	Edad	Lugar	Diagnóstico	Linajes
1	Hembra	1	QUISTOCOCHA	Positivo	Lin211
2	Hembra	2	QUISTOCOCHA	Positivo	Lin59
3	Macho	2	QUISTOCOCHA	Positivo	Lin59
4	Hembra	2	QUISTOCOCHA	Positivo	Lin59
5	Hembra	3	QUISTOCOCHA	Positivo	Lin59
6	Macho	3	QUISTOCOCHA	Positivo	Lin59
7	Macho	3	QUISTOCOCHA	Positivo	Lin59
8	Macho	3	QUISTOCOCHA	Positivo	Lin59
9	Hembra	3	QUISTOCOCHA	Positivo	Lin59
10	Macho	3	QUISTOCOCHA	Positivo	Lin59
11	Hembra	3	QUISTOCOCHA	Positivo	Lin59
12	Macho	3	QUISTOCOCHA	Negativo	
13	Macho	3	QUISTOCOCHA	Positivo	Lin59
14	Hembra	3	QUISTOCOCHA	Positivo	Lin59
15	Hembra	3	QUISTOCOCHA	Positivo	Lin59
16	Macho	3	QUISTOCOCHA	Positivo	Lin59
17	Macho	3	QUISTOCOCHA	Positivo	Lin59
18	Hembra	3	QUISTOCOCHA	Positivo	Lin59
19	Hembra	3	QUISTOCOCHA	Negativo	
20	Hembra	3	QUISTOCOCHA	Positivo	Lin59
21	Macho	3	QUISTOCOCHA	Positivo	Lin59
22	Macho	3	QUISTOCOCHA	Positivo	Lin59
23	Macho	1	QUISTOCOCHA	Negativo	
24	Hembra	3	QUISTOCOCHA	Positivo	Lin59
25	Hembra	3	QUISTOCOCHA	Positivo	Lin59
26	Macho	3	QUISTOCOCHA	Negativo	
27	Macho	3	QUISTOCOCHA	Negativo	
28	Hembra	3	QUISTOCOCHA	Positivo	Lin59
29	Hembra	3	QUISTOCOCHA	Positivo	Lin59
30	Hembra	3	QUISTOCOCHA	Positivo	Lin59
31	Hembra	3	QUISTOCOCHA	Positivo	Lin59
32	Macho	3	QUISTOCOCHA	Positivo	Lin59
33	Hembra	3	QUISTOCOCHA	Positivo	Lin59
34	Hembra	3	QUISTOCOCHA	Positivo	Lin64
35	Hembra	3	QUISTOCOCHA	Positivo	Lin64
36	Hembra	3	QUISTOCOCHA	Positivo	Lin64
37	Hembra	3	QUISTOCOCHA	Positivo	Lin64
38	Macho	3	QUISTOCOCHA	Positivo	Lin64
39	Hembra	3	QUISTOCOCHA	Positivo	Lin68
40	Macho	1	CIA	Positivo	Lin59
41	Hembra	2	CIA	Positivo	Lin59
42	Macho	2	CIA	Positivo	Lin59
43	Hembra	2	CIA	Positivo	Lin59

44	Hembra	2	CIA	Positivo	Lin59
45	Macho	2	CIA	Positivo	Lin59
46	Macho	2	CIA	Positivo	Lin59
47	Hembra	2	CIA	Positivo	Lin59
48	Hembra	3	CIA	Positivo	Lin59
49	Hembra	3	CIA	Positivo	Lin59
50	Macho	3	CIA	Positivo	Lin59
51	Hembra	3	CIA	Positivo	Lin59
52	Hembra	3	CIA	Positivo	Lin59
53	Hembra	3	CIA	Positivo	Lin59
54	Macho	3	CIA	Positivo	Lin59
55	Macho	3	CIA	Positivo	Lin59
56	Macho	3	CIA	Positivo	Lin59
57	Macho	3	CIA	Positivo	Lin59
58	Hembra	3	CIA	Positivo	Lin59
59	Hembra	3	CIA	Positivo	Lin59
60	Hembra	3	CIA	Positivo	Lin59
61	Hembra	3	CIA	Positivo	Lin59
62	Hembra	3	CIA	Positivo	Lin59
63	Hembra	3	CIA	Positivo	Lin59
64	Macho	3	CIA	Positivo	Lin12
65	Macho	3	CIA	Positivo	Lin64
66	Hembra	3	CIA	Positivo	Lin64
67	Hembra	3	CIA	Positivo	Lin64
68	Macho	1	PROP PRIV	Negativo	
69	Hembra	1	PROP PRIV	Negativo	
70	Hembra	1	PROP PRIV	Negativo	
71	Macho	1	PROP PRIV	Negativo	
72	Macho	1	PROP PRIV	Negativo	
73	Macho	1	PROP PRIV	Negativo	
74	Hembra	1	PROP PRIV	Negativo	
75	Hembra	1	PROP PRIV	Negativo	
76	Macho	1	PROP PRIV	Negativo	
77	Macho	1	PROP PRIV	Negativo	
78	Macho	2	C. MISHANA	Positivo	Lin59
79	Hembra	2	C. MISHANA	Positivo	Lin64
80	Macho	3	C. MISHANA	Positivo	Lin59
81	Hembra	3	C. MISHANA	Positivo	Lin59
82	Macho	3	C. MISHANA	Positivo	Lin59
83	Hembra	3	C. MISHANA	Positivo	Lin59
84	Hembra	3	C. MISHANA	Positivo	Lin59
85	Hembra	3	C. MISHANA	Positivo	Lin59
86	Macho	3	C. MISHANA	Positivo	Lin59
87	Hembra	3	C. MISHANA	Positivo	Lin59
88	Macho	3	C. MISHANA	Positivo	Lin64
89	Hembra	3	C. MISHANA	Positivo	Lin64

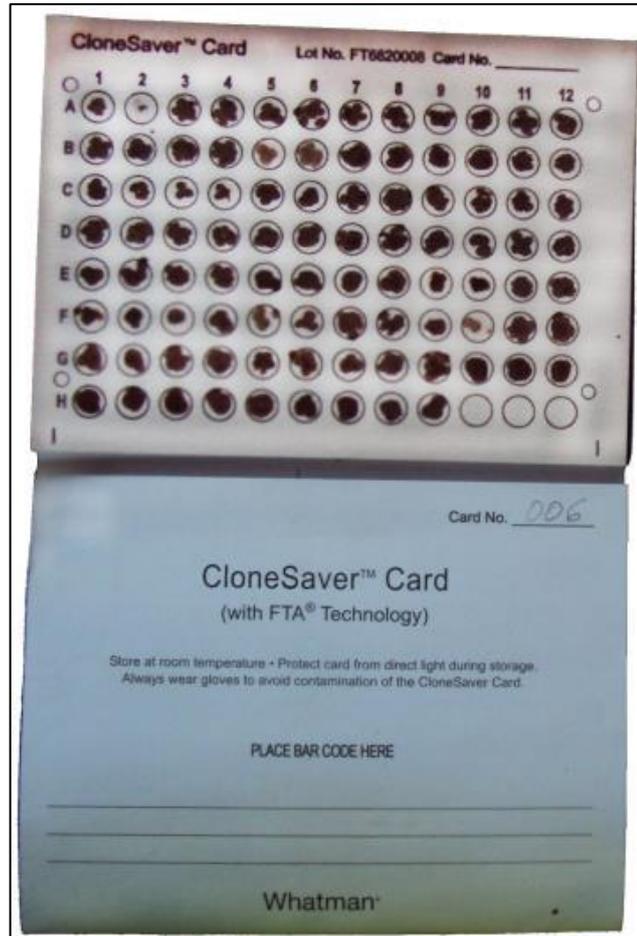
Anexo 6: Método Venopunción en la vena braquial o ulnar del ave.



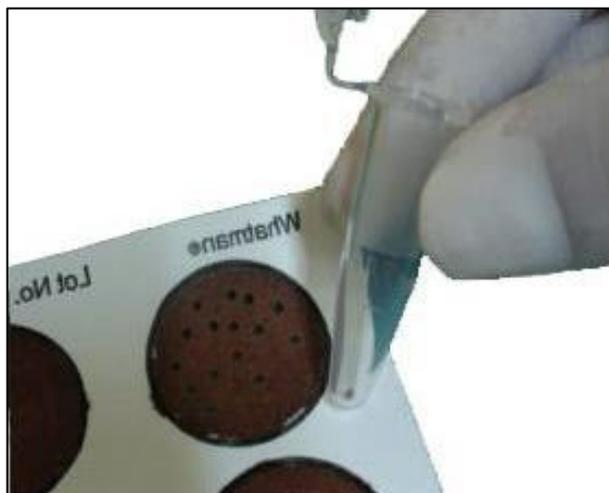
Anexo 7: Extracción de la muestra.



Anexo 8: Tarjetas CloneSaver FTA whatman, donde se almacenaron y conservaron todas las muestras.



Anexo 9: Extracción de discos de la tarjeta whatman impregnada con la muestra de sangre.



Anexo 10: Composición Buffer TNES (pH: 7,5).

CONCENTRACIÓN	VOLUMEN POR 100 ml
Tris 50 mM	Tris 1 M en 5 ml
NaCl 0,4 M	NaCl 5 M en 8 ml
EDTA 100 mM	EDTA 0,5 M en 220 ml
SDS 0,5%	SDS 10% en 5 ml

Anexo 11: Composición de proteinasa k, empleada en la extracción de ADN.

Composición	Concentración
CaCl ₂	1 mM
Glicerol v/v	40%
Proteinasa K	20 mg/ml
Tris * HCl (pH 7.5)	10 mM

Anexo 12: Reactivos utilizados para la preparación de la solución madre.

Master Mix	Volumen
Agua estéril	13.5 µl
Buffer PCR 10x	2.5 µl
dNTPs 8 mM	1.0 µl
MgCl 25 mM	1.5 µl
Taq	2.5 µl
Primers (cebadores)	1.5 µl

Anexo 13: Reactivos utilizados en las ampliaciones.

PCR	PRIMERS	CICLOS	PROGRAMA DE CICLO TERMAL
Reacción Externa	HaemNFI, HaemNR3	20 x	94 °C por 3 min 94 °C por 30 s 50 °C por 30 s
Reacción interna	HaemF, HaemR2	35 x	72 °C por 45 s 72 °C por 10 min 4°C

Anexo 14: Reactivos y concentraciones para la preparación del buffer y gel de agarosa.

>Buffer TAE 10x (para 250 ml)		> Gel de Resolución	
Tris	12.1 g	Agarosa 2%	0.8 g
Ácido acético glacial	2.85 ml	Buffer TAE	40 ml
EDTA	0.93 g	Bromuro de etidio	3 µl

Anexo 15: Protocolo estándar de purificación por Exosap-it.

- ❖ En una placa estéril se adicionó 2 µl de este reactivo + 4 µl producto PCR.
- ❖ Se sellaron los pocillos y se vorteoó brevemente.
- ❖ La placa se colocó en el termociclador con las siguientes condiciones: a 37 °C por 30 minutos y 80 °C por 15 minutos para inactivar el reactivo.

Anexo 16: Protocolo de secuenciamiento.

- ❖ En un microtubo estéril se preparó una solución madre, donde la composición y los volúmenes están indicadas para cada muestra.

Master Mix	Volumen
Big dye terminator	0.6 μ l
Big dye Seq Buffer	3.4 μ l
Primers	0.6 μ l
Agua estéril	4.65 μ l

- ❖ La mezcla se vorteoó 3 o 4 veces brevemente.
- ❖ En cada pocillo de una placa para PCR se dispensó 9.3 μ l MM + 0.7 μ l producto ExoSAP-IT.
- ❖ Se sellaron los pocillos con una lámina de goma y se vorteoó brevemente para asegurar que el contenido quede localizado en el fondo.
- ❖ La placa se colocó en el termociclador y se utilizó el siguiente programa térmico:

96 °C por 1 min
25 ciclos { 96 °C por 10 s
50 °C por 5 s
60 °C por 4 min
4 °C hold

Anexo 17: Protocolo de precipitación

- ❖ En un recipiente de plástico se preparó el master mix de EtOH/EDTA, con los siguientes volúmenes:

	Por muestra	1 PLACA
125 mM EDTA	2.5 μ l	312.5 μ l
100% EtOH	30 μ l	4 x 937.5 μ l

- ❖ En cada pocillo de una placa para PCR se agregó 32.5 μ l de la solución EtOH/EDTA y 10 μ l del producto de secuenciación. Luego de colocar la solución se cerraron los pocillos con una lámina de goma y se agitó con el vortex unas cuantas veces para mezclar.
- ❖ Se dejó por 15 minutos a temperatura ambiente para precipitar los productos de extensión. Se centrifugó a 1730 g por 45 minutos a 4o C. Se retiró el sello y la placa se invirtió en papel toalla, para retirar el exceso de la solución. Luego a placa invertida se centrifugó a 50 g por 3 minutos a 4o C.
- ❖ En el mismo recipiente se preparó una solución de Agua/EtOH, con los siguientes volúmenes:

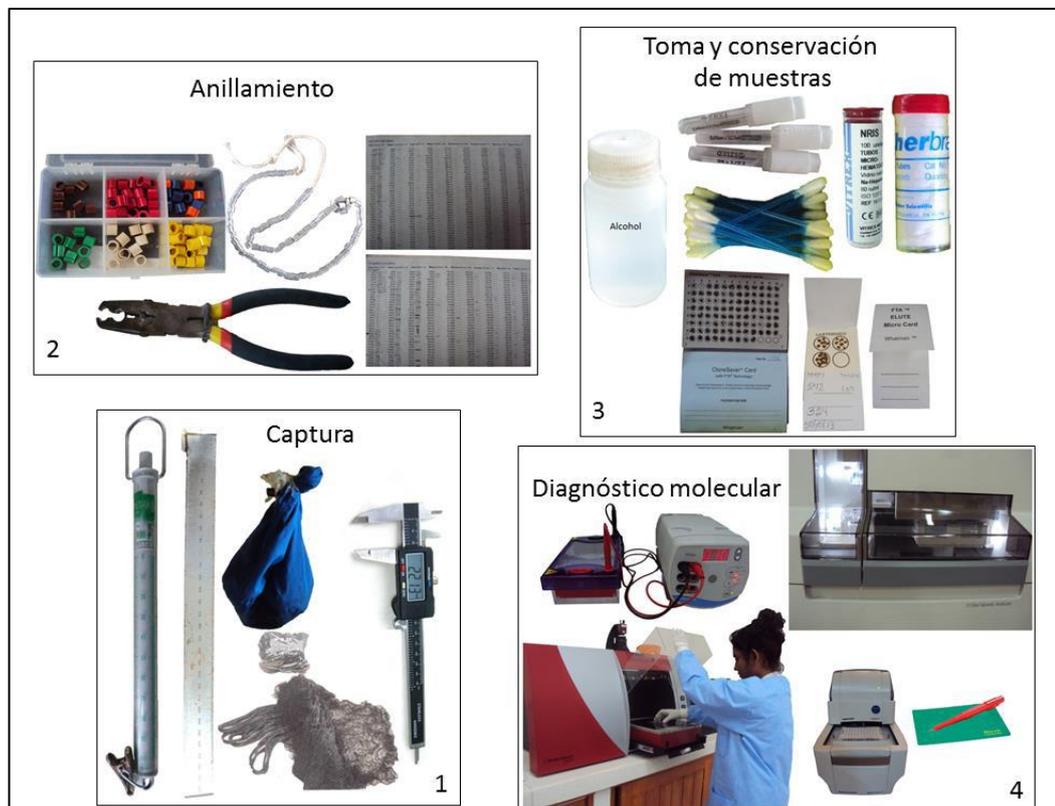
	Por muestra	1 PLACA
Agua	9 μ l	2 x 562.5 μ l
100% EtOH	21 μ l	3 x 875 μ l

- ❖ Con la micropipeta se mezcló ambas soluciones y se dispensó 30 μ l de EtOH 70% a cada pocillo. Las placas se centrifugaron a 1730 g por 15 minutos a 4oC. Se invirtió y se volvió a centrifugar a 50 g por 3 minutos a 4oC. Se dejó incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se agregó 10 μ l formamida (HiDi) a cada pocito.

Anexo 18: Parámetros estándares de corrida e instrumentación utilizados para la electroforesis capilar en el secuenciamiento.

Name	Value		
Oven_Temperature	60 Deg. C		
Poly_Fill_Vol	6500		
Current_Stability	5 uAmp		
Pre_Run_Voltage	15 kVolts		
Pre_Run_Time	180 sec.		
Injection_Voltage	1.2 kVolts		
Injection_Time	18 sec.		
Voltage_Number_Of_Steps	30 nk		
Voltage_Steps_Internal	15 sec.		
Data_Delay_Time	120 sec.		
Run_Voltage	8.5 kVolts		
Run_Time	2780 sec.		
Protocolo de Instrumentación			
Nombre	SECUENCIAMIENTO02del19_10_10	Dye Set	Z-BigDyeV3
		Run Module	RapidSeq36_POP7_1

Anexo 19: Equipos y materiales utilizados en cada uno de los procedimientos realizados: 1, captura. 2, anillamiento. 3, toma y conservación de las muestras hasta el posterior 4, diagnóstico molecular y análisis de las secuencias.



Anexo 20: Tabla de contingencia del diagnóstico de la prueba con la ubicación de las colonias de paucos.

Ubicacion*Diagnostico tabulación cruzada					
			Diagnostico		Total
			Negativo	Positivo	
Ubicacion	C. MISHANA	Recuento	0	12	12
		% dentro de Diagnostico	0,0%	16,2%	13,5%
	CIA	Recuento	0	28	28
		% dentro de Diagnostico	0,0%	37,8%	31,5%
	PROP PRI	Recuento	10	0	10
		% dentro de Diagnostico	66,7%	0,0%	11,2%
	QUISTOCOCHA	Recuento	5	34	39
		% dentro de Diagnostico	33,3%	45,9%	43,8%
Total		Recuento	15	74	89
		% dentro de Diagnostico	100,0%	100,0%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado			
	Valor	gl	Sig. asintótica (2 caras)
Chi-cuadrado de Pearson	57,894 ^a	3	,000
Razón de verosimilitud	50,863	3	,000
N de casos válidos	89		

a. 3 casillas (37,5%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 1,69.

Anexo 21: Tabla de contingencia del diagnóstico de la enfermedad en el sexo de los paucáres.

sexo*Diagnostico tabulación cruzada					
			Diagnostico		Total
			Negativo	Positivo	
sexo	Hembra	Recuento	5	46	51
		% dentro de Diagnostico	33,3%	62,2%	57,3%
	Macho	Recuento	10	28	38
		% dentro de Diagnostico	66,7%	37,8%	42,7%
Total		Recuento	15	74	89
		% dentro de Diagnostico	100,0%	100,0%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	gl	Sig. asintótica (2 caras)	Significación exacta (2 caras)	Significación exacta (1 cara)
Chi-cuadrado de Pearson	4,237 ^a	1	,040		
Corrección de continuidad ^b	3,140	1	,076		
Razón de verosimilitud	4,216	1	,040		
Prueba exacta de Fisher				,049	,039
N de casos válidos	89				

a. 0 casillas (0,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 6,40.

b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2

Anexo 22: Tabla de contingencia del diagnóstico de la enfermedad con la edad de los pauceres.

Tabla de contingencia Diagnóstico de la prueba * Edad de los pauceres						
			Edad de los pauceres			Total
			Polluelo	Juveniles	Adultos	
Diagnóstico de la prueba	Negativo	Recuento	11	0	4	15
		Frecuencia esperada	2,2	2,0	10,8	15,0
	Positivo	Recuento	2	12	60	74
		Frecuencia esperada	10,8	10,0	53,2	74,0
Total		Recuento	13	12	64	89
		Frecuencia esperada	13,0	12,0	64,0	89,0
Pruebas de chi-cuadrado						
	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)			
Chi-cuadrado de Pearson	50,163 ^a	2	,000			
Razón de verosimilitudes	39,646	2	,000			
N de casos válidos	89					
a. 2 casillas (33,3%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 2,02.						

Anexo 23: Tabla de contingencia de los linajes encontrados en las colonias de paucares.

Tabla de contingencia Linaje de hemoparásitos * Zona de Muestreo						
			Zona de Muestreo			Total
			CIA	MISHANA	QUISTOCOCHA	
Linaje de hemoparásitos	12	Recuento	1	0	0	1
		Frecuencia esperada	,4	,2	,5	1,0
	59	Recuento	24	9	27	60
		Frecuencia esperada	22,7	9,7	27,6	60,0
	64	Recuento	3	3	5	11
		Frecuencia esperada	4,2	1,8	5,1	11,0
	68	Recuento	0	0	1	1
		Frecuencia esperada	,4	,2	,5	1,0
	211	Recuento	0	0	1	1
		Frecuencia esperada	,4	,2	,5	1,0
	Total	Recuento	28	12	34	74
		Frecuencia esperada	28,0	12,0	34,0	74,0

Pruebas de chi-cuadrado			
	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	5,291 ^a	8	,726
Razón de verosimilitudes	6,242	8	,620
N de casos válidos	74		

a. 11 casillas (73,3%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,16.

Anexo 24: Tabla de contingencia de los linajes encontrados entre las edades de los paucares.

Tabla de contingencia Linaje de hemoparásitos * Grupo etario							
			Grupo etario			Total	
			Adulto	Juveniles	Polluelo		
Linaje de hemoparásitos	12	Recuento	1	0	0	1	
		Frecuencia esperada	,8	,2	,0	1,0	
	59	Recuento	48	11	1	60	
		Frecuencia esperada	48,6	9,7	1,6	60,0	
	64	Recuento	10	1	0	11	
		Frecuencia esperada	8,9	1,8	,3	11,0	
	68	Recuento	1	0	0	1	
		Frecuencia esperada	,8	,2	,0	1,0	
	211	Recuento	0	0	1	1	
		Frecuencia esperada	,8	,2	,0	1,0	
	Total	Recuento	60	12	2	74	
		Frecuencia esperada	60,0	12,0	2,0	74,0	
	Pruebas de chi-cuadrado						
		Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)			
Chi-cuadrado de Pearson	37,652 ^a	8	,000				
Razón de verosimilitudes	9,636	8	,292				
N de casos válidos	74						
a. 12 casillas (80,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,03.							