



UNAP



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

**ESTANDARIZACIÓN DE PROTOCOLOS PARA EL ENRIQUECIMIENTO Y
AISLAMIENTO DE ADN GENÓMICO DE PARÁSITOS DE LOS GÉNEROS
PLASMODIUM, HAEMOPROTEUS, LEUCOCYTOZOOM CAUSANTES DE
LA MALARIA AVIAR EN LA AMAZONIA PERUANA**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA**

PRESENTADO POR:

PAULA ALESSANDRA GALVEZ ZAGACETA

ASESORES:

Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ. Dr.

Blga. MARIANELA COBOS RUÍZ. Dra.

COASESOR

PhD. DYLAN MADDOX

IQUITOS, PERÚ

2022

ACTA DE SUSTENTACIÓN



UNAP

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 007-CGT-UNAP-2022

En la ciudad de Iquitos, Departamento de Loreto, mediante plataforma virtual, a los 24 días del mes de febrero de 2022, a horas 15:05 se dio inicio a la sustentación pública de la Tesis titulada: "ESTANDARIZACIÓN DE PROTOCOLOS PARA EL ENRIQUECIMIENTO Y AISLAMIENTO DE ADN GENÓMICO DE PARÁSITOS DE LOS GÉNEROS PLASMODIUM, HAEMOPROTEUS, LEUCOCYTOZOOM CAUSANTES DE LA MALARIA AVIAR EN LA AMAZONIA PERUANA", presentado por la Bachiller PAULA ALESSANDRA GALVEZ ZAGACETA, autorizada mediante RESOLUCIÓN DECANAL N° 065-2022-FCB-UNAP, para optar el Título Profesional de **BIÓLOGA**, que otorga la UNAP de acuerdo a Ley 30220, su Estatuto y el Reglamento de Grados y Títulos vigente.

El Jurado Calificador y dictaminador designado mediante RESOLUCIÓN DECANAL N° 304- 2021-FCB-UNAP, de fecha 08 de noviembre de 2021, integrado por los siguientes Profesionales:

- | | |
|---|--------------|
| - Blgo. JORGE LUIS MARAPARA DEL AGUILA, Dr. | - Presidente |
| - Blga. JANETH BRAGA VELA, Dra. | - Miembro |
| - Blgo. JAVIER RAMÍREZ ABANTO | - Miembro |

Luego de haber escuchado con atención y formulado las preguntas, las cuales fueron respondidas:

SATISFACTORIAMENTE

El jurado después de las deliberaciones correspondientes, llegó a las siguientes conclusiones:

La sustentación pública y la Tesis ha sido APROBADA con la calificación de Muy Buena estando la Bachiller apta para obtener el Título Profesional de **BIÓLOGA**.

Siendo las 16:57 se dio por terminado el acto de sustentación.


Blgo. JORGE LUIS MARAPARA DEL AGUILA, Dr.
Presidente


Blga. JANETH BRAGA VELA, Dra.
Miembro


Blgo. JAVIER RAMÍREZ ABANTO
Miembro


Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ, Dr.
Asesor


Blga. MARIANELA COBOS RUÍZ, Dra.
Asesora


Ph.D. DYLAN MADDOX
Coasesor

JURADO



Blgo. JORGE LUIS MARAPARA DEL AGUILA, Dr.
Presidente



Blga. JANETH BRAGA VELA, Dra.
Miembro



Blgo. JAVIER RAMÍREZ ABANTO
Miembro

ASESORES



Blgo. Juan Carlos Castro Gómez. Dr



Blga. Marianela Cobos Ruíz. Dra.



PhD. Dylan Maddox

DEDICATORIA

A mis padres, Luis y Martha por apoyarme incondicionalmente y motivarme en cada una de las metas que me he trazado.

A mis hermanas, Maríafernanda y Rafaela quienes me motivan a ser el mejor ejemplo como hermana.

A mis asesores, Marianela Cobos, Juan Carlos Castro y Dylan Maddox, por apoyarme desde el comienzo y alentarme a continuar haciendo ciencia en compañía de ellos.

A todos los jóvenes que están dispuestos a estudiar ciencia, aún hay mucho por investigar y descubrir.

AGRADECIMIENTO

Al proyecto: “Desarrollo de un Biosensor portátil y versátil basado en el Sistema CRISPR/Cas para la detección rápida, sensible, específica y de bajo costo de múltiples patógenos que causan la malaria en aves en la Amazonía Peruana”. Universidad Científica del Perú (UCP). FONDECYT/BM (Convenio 044-2019-FONDECYT/BM). por ser el ente financiero para realizar el presente trabajo de investigación.

Al Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú, por permitirme el acceso a sus instalaciones, uso y manejo de equipos que hicieron posible la realización de la presente tesis.

A mi familia, por el apoyo incondicional y desmedido en mi desarrollo personal y académico, por sus sabidurías para guiar cada paso que doy y hacer de mí una persona de bien.

A mis asesores, Juan Carlos Castro, Marianela Cobos y Dylan Maddox por apostar por mi desde el comienzo, guiarme y apoyarme incondicionalmente en el transcurso del proyecto.

A mis compañeros de laboratorio, Levi Estela, Hicler Rodriguez, Miguel Grandez, por compartirme sus conocimientos y enseñarme las destrezas que debo adquirir para desarrollarme con éxito en este campo.

INDICE DE CONTENIDOS

| | Pág. |
|---|------|
| PORTADA | i |
| ACTA DE SUSTENTACIÓN | ii |
| JURADO | iii |
| ASESORES | iv |
| DEDICATORIA | v |
| AGRADECIMIENTO | vi |
| INDICE DE CONTENIDOS | vii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | x |
| ÍNDICE DE TABLAS | xi |
| INDICE DE ANEXOS | xii |
| RESUMEN | xiii |
| ABSTRACT | xiv |
| INTRODUCCION | 1 |
| CAPITULO I: MARCO TEÓRICO | 3 |
| 1.1. Antecedentes | 3 |
| 1.2. Bases teóricas | 12 |
| 1.2.1. Hemoparasitos aviares | 12 |
| 1.2.1.1. Haemoproteus | 12 |
| 1.2.1.2. Leucocytozoon | 14 |
| 1.2.1.3. Plasmodium | 15 |
| 1.2.2. Ciclo de vida | 16 |
| 1.2.3. Detección microscópica de hemoparásitos | 18 |
| 1.2.4. Detección molecular | 19 |
| 1.2.5. Linajes de hemoparásitos aviares | 19 |
| 1.2.6. Ácidos nucleicos | 20 |
| 1.2.6.1. El ácido desoxirribonucleico (ADN) | 21 |
| 1.2.6.2. Métodos de extracción de ácidos nucleicos | 21 |

| | |
|---|----|
| 1.2.6.3. Importancia de las Técnicas de Extracción | 22 |
| 1.3. Definición de términos básicos | 23 |
| CAPITULO II: HIPOTESIS Y VARIABLES | 27 |
| 2.1. Formulación de la hipótesis | 27 |
| 2.2. Variables y definiciones operacionales | 27 |
| CAPITULO III: METODOLOGIA | 28 |
| 3.1. Diseño metodológico | 28 |
| 3.2. Diseño muestral | 28 |
| 3.2.1. Población universo | 28 |
| 3.2.2. Población de estudio | 28 |
| 3.2.3. Tamaño de la población de estudio | 28 |
| 3.2.4. Muestreo o selección de la muestra | 29 |
| 3.2.5. Criterios de selección | 29 |
| 3.2.5.1. Criterios de inclusión | 29 |
| 3.2.5.2. Criterios de exclusión | 29 |
| 3.3. Procedimiento de recolección de datos | 30 |
| 3.3.1. Área de estudio | 30 |
| 3.3.2. Recolección de la muestra | 32 |
| 3.3.2.1. Captura e identificación de aves | 32 |
| 3.3.2.2. Marcación de aves y procesamiento | 32 |
| 3.3.2.3. Colecta de muestras sanguíneas | 33 |
| 3.3.2.4. Ensayos de estandarización de Protocolos. | 33 |
| CAPITULO IV: RESULTADOS | 38 |
| Comparar protocolos de aislamiento del ADN genómico de parásitos de los géneros Plasmodium, Haemoproteus, Leucocytozoon causantes de la malaria aviar en la Región Loreto | 38 |
| Identificación de aves parasitadas por los géneros Plasmodium, Haemoproteus y o Leucocytozoon causantes de malaria aviar en la Región Loreto. | 40 |
| CAPITULO V: DISCUSIÓN | 47 |
| CAPITULO VII: RECOMENDACIONES | 51 |

CAPITULO VIII: FUENTES DE INFORMACIÓN

52

ANEXOS

60

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Pág. |
|---|------|
| Figura 1. Ciclo de vida de malaria aviar, Tomada de Atkinson | 16 |
| Figura 2. Área de muestreo en la Concesión para la conservación Cuenca Alta Río Itaya de la Universidad Científica del Perú. | 28 |
| Figura 3. Gel de agarosa al 1% mostrando bandas de ADN genómico según protocolo aplicado. | 36 |
| Figura 4. Número de ciclos detectados mediante qPCR. | 36 |
| Figura 5. Algunas familias y especies de aves identificadas en la Concesión de Conservación Cuenca Alta Río Itaya (CCCARI). | 39 |
| Figura 6. Detección de malaria aviar mediante Reacción de Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real. | 41 |
| Figura 7. Identificación por órdenes de aves positivos a malaria aviar. | 42 |
| Figura 8. Identificación de familias positivas a malaria aviar. | 43 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Pág. |
|--|------|
| Tabla 1. Comparación de protocolos en cuanto a la concentración y ratios de calidad obtenidos | 35 |
| Tabla 2. Especies identificadas en la Cuenca Alta Río Itaya (CCCARI) de la Universidad Científica del Perú. | 37 |
| Tabla 3. Especies positivas a malaria aviar por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR). | 39 |

INDICE DE ANEXOS

| | Pág. |
|---|------|
| Anexo 1. Secuencia de fotos de la Captura e identificación de aves en el área de concesión de la UCP, cuenca Alta Río Itaya. | 57 |
| Anexo2. Secuencia de fotografías de la marcación y procesamiento de aves. | 58 |
| Anexo 3. Secuencia de fotografías de la colecta de muestras sanguíneas. | 59 |
| Anexo4. Cebadores R330F Y R480RL para protocolos de PCR en tiempo real | 60 |
| Anexo 5. Extracción de ADN de aves y amplificación de las muestras | 61 |
| Anexo 6. Aislamiento de células sanguíneas de aves por gradientes de densidades. | 62 |
| Anexo 7. Permiso de colecta emitido por SERNANP | 63 |
| Anexo 8. Concentración y ratios de ADN de aves extraído. | 64 |
| Anexo 9. Prueba de Kruskal Wallis a Protocolos utilizados | 71 |

RESUMEN

El estudio de malaria en aves en estas últimas dos décadas ha ido en aumento, para ello se desarrollan protocolos rápidos y de bajo costo para la de extracción de ADN genómico, amplificación y cribado, permitiendo detectar la presencia de estos hemoparásitos. El objetivo de esta investigación fue comparar protocolos de aislamiento del ADN genómico y realizar la identificación de aves parasitadas por los géneros Plasmodium, Haemoproteus y Leucocytozoon causantes de malaria aviar en la Región Loreto, para ello se utilizó y modificó el protocolo de precipitación por sales (Salting-out) y el método de aislamiento de células sanguíneas por gradiente de densidades según las condiciones de la muestra colectada, procediéndose a amplificar mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR) obteniendo como resultado que el protocolo de precipitación de sales mostró mejores resultados en cuanto a su concentración y calidad de ratios a comparación del método de aislamiento de células por gradientes de densidades, indicándonos que el ADN obtenido no presenta contaminantes pudiendo realizar con éxito la identificación de malaria aviar mediante qPCR, identificándose 170 aves parasitadas donde el orden Passeriforme y la familia Thamnophilidae son los grupos con mayor número de aves infectadas. En conclusión, el protocolo de precipitación de sales (Salting out) estandarizado es eficiente para la detección de malaria aviar convirtiéndose en una valiosa herramienta en el campo para la rápida detección y expansión de la investigación de estos hemoparásitos.

Palabras claves: ADN, aves, malaria, protocolo, parásito.

ABSTRACT

The study of malaria in birds in these last two decades has been increasing, for this, rapid and low-cost protocols are being developed for the extraction of genomic DNA, amplification and screening, allowing the presence of these hemoparasites to be detected. The objective of this research was to compare genomic DNA isolation protocols and to identify birds parasitized by the Plasmodium, Haemoproteus and Leucocytozoon genera that cause avian malaria in the Loreto Region, for which the salt precipitation protocol was used and modified (Salting-out) and the method of isolation of blood cells by density gradient according to the conditions of the collected sample, proceeding to amplify by means of the Polymerase Chain Reaction in real time (qPCR) obtaining as results that the salt precipitation protocol showed better results in terms of its concentration and quality of ratios compared to the method of isolation of cells by density gradients, indicating that the DNA obtained does not present contaminants, being able to successfully carry out the identification of malaria avian by qPCR, identifying 170 parasitized birds where the Passeriforme order and the Thamnophilidae family are the groups with the highest numbers of infected birds. In conclusion, the standardized Salting out protocol is efficient for the detection of avian malaria, becoming a valuable tool in the field for the rapid detection and expansion of the investigation of these hemoparasites.

Keywords: DNA, birds, malaria, protocol, parasite.

INTRODUCCION

Las aves, como la mayoría de los animales silvestres, se encuentran con frecuencia afectadas por una enorme diversidad de parásitos, dentro de ello los endoparásitos que pueden hallarse en el plasma, o bien infectando a eritrocitos o leucocitos causando diferentes enfermedades y una de ellas es la malaria o paludismo ⁽¹⁾. Actualmente se conoce más de 200 especies de hemosporidios de aves identificadas morfológicamente, aunque se desconoce la verdadera riqueza debido a la gran diversidad genética y al muestreo insuficiente en zonas muy diversificadas como es la amazonia peruana, de tal modo se sustenta en distintos estudios que Plasmodium, Haemoproteus y Leucocytozoon son causantes de la malaria aviar y el conjunto más diverso de parásitos hemosporidianos aviares ⁽²⁾.

Siendo la amazonia una de las zonas con mayor diversidad de aves, es donde se han realizado menor número de estudios de hemoparásitos que afectan a este grupo; sin embargo se postula que la deforestación y cambios en el uso del suelo pueden provocar aumentos en las enfermedades infecciosas de la fauna silvestre como la malaria aviar, por lo que el estudio de parásitos sanguíneos en aves asociados a cambios en el uso del suelo podría ayudar a predecir y prevenir epidemias que están afectando a humanos, animales domésticos y poblaciones de fauna silvestre en todo el país, explicando así desde el punto de vista ecológico los efectos negativos que las poblaciones sufren generando la probabilidad que el hospedador sea depredado o reemplazado ⁽³⁾.

En las últimas dos décadas se ha visto un aumento dramático en el estudio de estos hemoparásitos como herramientas para probar las teorías evolutivas de las interacciones parásito-huésped ⁽⁴⁾⁽⁵⁾, lo que ha llevado a este campo al desarrollo de protocolos ⁽⁶⁾ eficaces para el cribado, amplificación y extracción de ADN genómico del parásito hemosporidiano ⁽⁷⁾ para así estimar la prevalencia y diversidad de éstos, teniendo claro que los datos varían estacionalmente, entre especies, la edad y las características de los huéspedes. Por lo tanto, las estimaciones precisas requieren tamaños de muestras suficientes ⁽⁸⁾, la aplicación de protocolos de detección localmente optimizados y enriquecidos ⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾ para la detección imperfecta y poder explicar la variación natural en las estimaciones ⁽¹¹⁾⁽¹²⁾. Asimismo, existen muchos métodos para detectar hemoparásitos en aves ⁽¹³⁾ que difieren en especificidad y sensibilidad ⁽¹⁴⁾, de tal modo, que elegir la técnica adecuada para la detección de hemoparásitos aviares depende de varios factores, principalmente del tiempo y el costo ⁽¹⁵⁾.

Por tanto, el objetivo general de esta investigación fue estandarizar un protocolo para el aislamiento de ADN genómico de parásitos causantes de malaria aviar en la Región Loreto y los objetivos específicos fueron:

- 1) Comparar protocolos de aislamiento del ADN genómico de parásitos de los géneros Plasmodium, Haemoproteus, Leucocytozoon causantes de la malaria aviar en la Región Loreto.
- 2) Realizar la identificación de aves parasitadas por los géneros Plasmodium, Haemoproteus y o Leucocytozoon causantes de malaria aviar en la Región Loreto.

CAPITULO I: MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes

En el 2019, realizaron un estudio sobre los ADN ribosomales nucleares 18S de parásitos hemosporídicos aviares, donde se recolectaron muestras de sangre y tejidos de aves que contenían parásitos de tres géneros hemosporidianos, casi todos los rSAD 18S de hemosporidianos aviares pertenecientes a los géneros *Plasmodium* (17), *Haemoproteus* (9) y *Leucocytozoon* (16) se obtuvieron por PCR, clonación molecular y secuenciación de diez clones cada uno. Se calcularon los árboles filogenéticos y se analizaron los patrones de secuencia y se compararon con los de las especies de malaria en simios y roedores. Una sección del mitocondrial *CytB* también fue secuenciada. Esto mostró que los patrones de secuencia en la mayoría de las especies de *Plasmodium* aviar fueron similares a los de los parásitos de mamíferos con la mayoría de las especies con dos grupos de secuencias de ADNr 18S distintos. También se encontraron variantes 18S distintas en *Haemoproteus tartakovskyi* y las tres especies de *Leucocytozoon*, mientras que las otras especies presentaban conjuntos de haplotipos similares. Los contenidos de 18S rDNA GC del complejo *Leucocytozoon toddi* y el subgénero *Parahaemoproteus* fueron extremadamente altos con 49.3% y 44.9%, respectivamente. Las secuencias 18S de varias especies de los tres géneros mostraron características quiméricas, lo que indica recombinación ⁽¹¹⁾.

En el 2015, se realizó un estudio sobre un nuevo protocolo de PCR en tiempo real para la detección de hemosporidios aviares donde se detectó de forma rápida y fiable los tres géneros de hemosporidianos aviares, para ello se diseñó los cebadores R330F y R480RL, que flanquean un fragmento de 182 pares de bases de ADNr conservado mitocondrial, estos cebadores fueron probados inicialmente utilizando PCR en tiempo real en muestras de Malawi, Africa, previamente seleccionadas para detectar hemosporidios aviares utilizando PCR anidada, luego se probó en 94 muestras del bioma Cerrado de Brasil, anteriormente cribado utilizando un único ensayo de PCR para los parásitos hemosporidianos, estas muestras también fueron amplificadas utilizando protocolos de PCR anidados, lo que permito realizar comparaciones entre los tres métodos de detección diferentes (PCR única, anidada PCR, PCR en tiempo real) obteniendo que como resultado que el protocolo de PCR en tiempo real identificó con éxito los tres géneros de hemosporidios aviares con infecciones únicas y mixtas detectadas previamente en Malawi. No hubo diferencia significativa entre los tres protocolos de cribado diferentes utilizados para las 94 muestras del Cerrado brasileño ($\chi^2 = 0,3429$, $df= 2$, $P = 0,842$). Después de demostrar su eficacia, se utilizó el protocolo en tiempo real para analizar 2113 muestras brasileñas, identificando 693 muestras positivas. Se concluyó que el PCR en tiempo real demostró ser tan eficaz como dos técnicas de cribado molecular ampliamente utilizadas, PCR simple y PCR anidada. Sin embargo, el protocolo en tiempo real tiene la clara ventaja de detectar los tres géneros en una sola reacción, lo que aumenta

significativamente la eficiencia al disminuir en gran medida el tiempo y el costo de cribado ⁽²⁾.

En el 2014, realizaron un estudio sobre un ensayo de qPCR multiplex listo para muestra para la detección de malaria, donde se liofilizó liofilizando en formato Sample-Ready™ (MMSR). El ensayo MMSR contenía todos los reactivos necesarios para qPCR, incluidos los cebadores y las sondas, que solo requieren la adición de agua y muestra para realizar qPCR. El rendimiento del ensayo MMSR se comparó con el ensayo "húmedo" no liofilizado. Los estudios de estabilidad se realizaron manteniendo los ensayos MMSR a cuatro temperaturas ambiente diferente de 4°C, temperatura ambiente (RT), 37°C y 42°C durante un período de 42 días, probados a intervalos de siete días. Los ADN de *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax* se usaron para el análisis del ensayo MMSR como parásitos simples o mixtos, en dos concentraciones diferentes los valores de C_T y las desviaciones estándar (DE) se utilizaron en el análisis del rendimiento del ensayo. Sin embargo, el límite de detección para el ensayo MMSR fue de 0.244 parásitos /μL para Plasmodium spp (PLU) y *P. falciparum* (FAL) objetivos de ensayo en comparación con el ensayo "húmedo" que fue de 0,39 y 3,13 parásitos / μL para PLU y FAL objetivos de ensayo, respectivamente. El ensayo MMSR se realizó con altas eficiencias similares a las del ensayo "húmedo" y fue estable a 37°C durante 42 días, con una vida útil estimada de 5 meses. Cuando se utiliza para analizar muestras clínicas de campo, el ensayo MMSR se realizó con un 100% de sensibilidad y especificidad en comparación con el ensayo

"húmedo". Se concluyó que el ensayo MMSR tiene las mismas características de rendimiento robusto que el ensayo "húmedo" y es altamente estable. La disponibilidad del ensayo MMSR permite flexibilidad y ofrece una opción para elegir el análisis de diagnóstico de malaria según la aplicación, las necesidades y el presupuesto ⁽¹⁰⁾.

En el 2011, se realizó un estudio de predominio y diversidad de hemosporidios aviares en tres hábitats diferentes en la ecorregión brasileña de Cerrado, durante los años 2007 al 2009. En este estudio 676 aves dieron positivo a hemosporidios comprendidos en 29 familias con 122 especies. Los métodos empleados fueron mediante combinaciones de PCR y microscopia encontrando especies como *Haemoproteus* sp y *Plasmodium* sp en 26 familias (89.7%) y 93 especies (76.2%) de aves, las especies de aves con mayor prevalencia fueron *Turdus leucomelas* (55%), *Cacicus cela* (88%), *Elaenia chiriquensis* (50%), *Formicivora grisea* (87,5%), *Manacus manacus* (66,7%), *Pipra fasciicauda* (43%) y *Ramphocelus carbo* (75%). Solo 6 especies fueron migratorias (*Myiarchus wainsoni*, *Vireo livaceus*, *Elaenia chiriquensis*, *Myiarchus ferox*, *Tyrannus melancholicus*, *Elaenia cristata*.) todas las demás fueron residentes. De las migratorias, *Elaenia chiriquensis* presentó la más alta prevalencia. Concluyeron que el predominio y la diversidad de infecciones por especies de *Plasmodium* sp o *Haemoproteus* sp difieren significativamente entre los tres hábitats. se encontraron 15 linajes de parásitos que no se habían descrito previamente y podrían asociarse a estas regiones o hábitats; 6 de estos linajes habían sido registrados en

otras regiones, principalmente en la Cuenca Caribeña, comprendiendo el 50-80% de las infecciones indicando una relación regional entre la distribución del parásito y la abundancia ⁽¹⁶⁾.

En el 2009, estudiaron la diversidad de parásitos Haemosporidios en aves de la especie *Acrocephalus agricola* (Passeriformes, Sylviidae) en Rusia, Kazajistán y Bulgaria. Se analizaron 138 aves en total distribuidas en Bulgaria (57), Kazajistán (9) y Rusia (57), dando positivo a hemosporidios 46 aves (9 con infecciones múltiples, 25 con *Haemoproteus sp* y 12 con *Plasmodium sp.*) teniendo una prevalencia total de parásitos hemosporidios de 33.3%. Nueve linajes fueron identificados en las muestras. El predominio en Bulgaria y Rusia fue casi igual al 28% (formando parte de 5 linajes) y 22% (6 linajes), respectivamente. La prevalencia en los Kazajistán fue de dos linajes con 55% del género *Haemoproteus* únicamente. La hemoparasitosis más común en Bulgaria fueron los del linaje ACAGR2 del género *Haemoproteus*, siendo el primer registro en el estudio. Este linaje fue también encontrado en un ave de 1 año de edad indicando transmisión local del parásito en el rango europeo de reproducción. El linaje estrechamente relatado ACDUM2 (género: *Haemoproteus*) ocurrió en todas las tres poblaciones de estudio ⁽¹⁷⁾.

En el 2009, en el Parque Nacional Natural Chingaza (Colombia) se analizaron la presencia de parásitos sanguíneos en aves, entre abril del 2002 y marzo del 2003. Se analizaron la presencia de parásitos

sanguíneos en aves del páramo en el Parque Nacional Natural Chingaza (Colombia), entre abril de 2002 y marzo de 2003. Se analizaron en ella 136 aves pertenecientes a 14 familias con un total de 40 especies, 38 de estas dieron positivo a *Microfilaria* (2.9%), *Plasmodium*(8,1%), *Hepatozoon*(1.5%), *Leucocytozoon*(2.1%), y *Haemoproteus*(1.5%). La observación más destacada fue la prevalencia alta del género *Leucocytozoon*, de modo que esta se asocia con aves migratorias su presencia en aves nativas sugiere un ciclo local de transmisión en la zona (18).

En el 2008, se llevó a cabo un estudio en Chile sobre gradientes latitudinales en el predominio y la riqueza de linajes de parásitos, donde analizaron durante 3 años entre el 2003- 2006 varios géneros de parásitos sanguíneos aviares y la distribución de estos a lo largo de una gradiente latitudinal. A través de la combinación de técnicas moleculares de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y microscopía lograron encontrar 27 linajes de parásitos (8 *Plasmodium*, 8 *Haemoproteus* y 11 *Leucocytozoon*) en 27 especies de aves de la familia *Emberizidae*. Determinaron una relación significativamente positiva entre el predominio y la latitud para los linajes de *Leucocytozoon* y una relación negativa para *Haemoproteus*, *Plasmodium* e infecciones mixtas. Sin embargo, no encontraron una relación significativa entre la diversidad del parásito y latitud (19).

En el año 2008, se llevó a cabo un estudio en Alemania en 2 regiones (Baja Sajonia y Berlin Brandemburgo), sobre parásitos de sangre hemosporidios en aves de rapiña y búhos, entre diciembre del 2002–2003. Examinaron muestras de sangre de 68 aves de rapiña y búhos mediante exámenes microscópicos, métodos de PCR y análisis filogenético. Donde dieron positivo a *Leucocytozoon sp.* (10,9%), *Plasmodium sp.* (5,9) y *Haemoproteus sp.* (4,9%). Conjuntamente fueron identificadas morfológicamente 3 especies: *Haemoproteus noctuae* (*Strix aluco*), *Haemoproteus nisi* (*Accipiter gentilis*), y *Leucocytozoon danilewskyi* (*Asio otus*). De modo que no se registraron diferencia en los métodos de microscopia y PCR para hemosporidios. Las especies de *Plasmodium sp.* que 7 ya habían sido encontradas en Passeriformes fueron también detectadas en las aves de rapiña y los búhos ⁽²⁰⁾.

En el 2008, se realizó un estudio en España sobre los efectos de infección por malaria en aves. En un periodo de 6 años entre el 2002 -2007 se probó los efectos negativos en una población de *Delichon urbica* la infección con dos linajes de parásitos de malaria; para esto se analizaron 112 muestrasde sangre, en donde se utilizó el método nested-PCR de modo que encontraron 32 (29%) individuos no infectados y 80 (71%) individuos infectados con parásitos de sangre. Entre las aves infectadas, 62 (55%) presentaron un parásito, mientras que 18 (16%) presentaron infección doble. Encontraron nueve linajes de parásitos sanguíneos diferentes, de los cuales tres fueron del género *Haemoproteus* (Durb1, Durb2 y Durb3) y seis del género *Plasmodium* (SGS1, GRW2, GRW4, GRW11, Durb4 y

Durb5). Los resultados mostraron que las infecciones por malaria disminuyen la supervivencia y desarrollo reproductivo de aves silvestres con simples o dobles infecciones concluyendo la existencia de varias diferencias en los efectos de aptitud de infecciones únicas y dobles de malaria en aviones comunes. Además de las secuelas de los parásitos en la supervivencia, mostraron efectos mixtos en la condición corporal y el éxito reproductor, y sugieren que la regla simple 6 no es viable con respecto al hospedero- parasito ⁽²¹⁾.

en el 2007, se realizó en Asia un estudio de prevalencia y diversidad de parásitos, analizaron 699 muestras de aves en tres regiones de Asia (Myanmar, India y Corea del sur) para identificar a los hemoparásitos Plasmodium y Haemoproteus, para esto se colectaron las muestras entre noviembre de 1994 hasta octubre del 2004. Se identificaron 241 aves infectadas (34%), identificando 34 linajes de especies de Plasmodium spp. Y 41 de Haemoproteus spp. La diversidad fue más alta en Myanmar seguido por la India y Corea del Sur. Encontraron 4 linajes de *Plasmodium* sp y uno de Haemoproteus sp compartido en Myanmar e India y solo un linaje de *Plasmodium* sp compartido entre Myanmar y Corea del Sur ⁽²²⁾.

En el 2004, en Australia y Nueva Guinea se realizó un estudio sobre la prevalencia y especificidad de hospederos en dos géneros de parásitos sanguíneos de aves colectadas entre el 2002 y 2003. Se llevó a cabo las técnicas de PCR en un total de 428 individuos, de los cuales 209 fueron capturados en Papua Nueva Guinea. Los resultados indicaron que 64 (31%) individuos positivos a especies de *Haemoproteus* sp y 20 (10%)

positivos a *Plasmodium* sp. De los 219 individuos capturados en Australia, 30 (14%) fueron positivos a *Plasmodium* sp y 68 (28%) a *Haemoproteus* sp. La prueba no reveló diferencia significativa en el predominio de parásitos entre regiones, ni tampoco se encontraron diferencias significativas de hospederos relacionados entre linajes de *Plasmodium*. Estos resultados apoyan evidencias previas de fuerte especificidad de familias hospederas en especies de *Haemoproteus* sp y sugieren que linajes de *Plasmodium* sp son más probables de formar asociaciones evolutivas estables con sus hospederos originales ⁽²³⁾.

1.2. Bases teóricas

1.2.1. Hemoparasitos aviares

Son 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 geográficas ⁽¹⁾. Existen tres géneros principales de haemosporidians (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 mamíferos ⁽²⁴⁾.

Estos parásitos son transmitidos por vectores, sin embargo, sigue siendo fuente de investigación y debate para la salud de las aves. Las especies de *Plasmodium* spp. Y *Leucocytozoon* spp. Son transmitidos por culícidos mientras que *Haemoproteus* spp. es transmitido principalmente por Culicoides. Se considera que la prevalencia y diversidad genética de estos parásitos están presentes en diversas especies de aves silvestres ⁽²⁵⁾.

1.2.1.1. Haemoproteus

Este género infecta a las aves de manera intraeritocitarios transmitidos por un vector, siendo uno de los hemoparásitos más comunes y distribuidos en aves silvestres, sin embargo su potencial patogenicidad es desconocido en estas son usados actualmente por los ecologistas como modelos para evaluar las teorías evolutivas sobre el efecto de la enfermedad en el estado de salud de los hospederos y la selección sexual, pero estos esfuerzos se han visto obstaculizados por la falta de conocimientos básicos sobre sus ciclos de vida, vectores y epizootiología. Algunas especies de Haemoproteus pueden ser altamente patogénicas y causar una miositis severa en las aves hospederas; no obstante, casos bien documentados son escasos ⁽²⁴⁾.

Distribución

La distribución de los parásitos de la familia Haemoproteidae son en climas templados y tropicales. Esta amplia distribución está relacionada probablemente a los diversos hábitats ocupados por sus vectores, moscas de la familia Ceratopogonidae e Hippoboscidae ⁽²⁶⁾. Estas especies de Haemoproteidae también han sido reportadas en islas remotas ⁽²⁷⁾. La mayor diversidad de especies se encuentra en las regiones zoogeográficas holártica, etíope y oriental, con un menor número de especies reportadas en las 6 regiones neotropical y australiana ⁽²⁸⁾. En América del sur y el norte la distribución de Haemoproteus es relativamente

uniforme a excepción de la tundra ártica, principalmente por la ausencia del vector ⁽²⁹⁾.

1.2.1.2. Leucocytozoon

Esta parasitosis es causada por especies del género *Leucocytozoon*, solo de algunas está registrada la patogenicidad para sus hospederos. Los grupos de aves en riesgo incluyen Avesanseriformes, Columbiformes, Galliformes, Falconiformes y Struthioniformes. Todas las especies de *Leucocytozoon* son específicas de hospederos en órdenes y en algunos casos a nivel de especie. Sin embargo, están relacionados con los géneros *Plasmodium* y *Haemoproteus* teniendo ciclos similares con la diferencia que son transmitidos por moscas negras de la familia Simuliidae, a excepción de *L. caulleryi* el cual es transmitido por moscas de la familia Ceratopogonidae ⁽¹⁾.

Distribución

Las especies de *Leucocytozoon* se distribuyen a nivel mundial excepto en la Antártida ⁽¹⁾. Estas se encuentran en las regiones occidental, etíope y holártica del planeta, solo algunas especies se encuentran en las regiones australianas y neotropical. La alta prevalencia y diversidad de *Leucocytozoon* y el gran número de especies específicas ocurren en región zoogeográfica holártica ⁽²⁴⁾. El incremento de *Leucocytozoon* se ha atribuido a la densidad de hospederos en la región norte y los cambios en la dinámica de transición ⁽³⁰⁾.

Las especies de mayores importancias son tres, *L. simondi* en aves acuáticas, *L. marchouxi* en palomas y pichones y *L. toddi* en rapaces. Estas tres se encuentran en la región holártica, siendo *Leucocytozoon toddi* la más distribuida encontrándose en la región neotropical y no existen reportes de *L. simondi* en África, Sur Asia y México ⁽³¹⁾. Se ha reportado la asociación de *Leucocytozoon* con ambientes en grandes altitudes, donde es más abundante en grandes elevaciones, en donde ocho de los nueve linajes reportados se encontraron cerca de los 2200 m s.n.m. Dos de estos linajes se encontraron a altitudes excepcionales 4123 y 4384 m s.n.m. ⁽³²⁾.

1.2.1.3. Plasmodium

Las infecciones causadas por las especies de *Plasmodium* en aves se conocen como Malaria aviar, la cual es una enfermedad de las aves que es transmitida por mosquitos, poseen un rango amplio de hospederos y distribución geográfica. Las diferentes especies de *Plasmodium* que infectan a las aves comparten desarrollo y características morfológicas con los parásitos hemosporidios del género *Leucocytozoon* y *Haemoproteus*, sin embargo difieren de estos por la fase de reproducción asexual en los eritrocitos circulantes ⁽³¹⁾.

Distribución

Las especies de Plasmodium que poseen las aves tienen una distribución cosmopolita, con excepción de la Antártica, donde los vectores responsables de la transmisión no se encuentran. Los reportes de Plasmodium de la región australiana son mucho menores que en otras zonas del planeta ⁽²⁴⁾. Se tiene conocimiento que 7 especies de Plasmodium tienen un gran número de hospederos conociéndose por lo menos 67 aves hospederas ⁽¹⁾.

1.2.2. Ciclo de vida

El ciclo de vida de los hemoparásitos involucra un hospedero invertebrado (vector) y las aves como hospederos vertebrados. Según la especie de parásito y hospedero varía la patología. 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 vectores ⁽³³⁾.

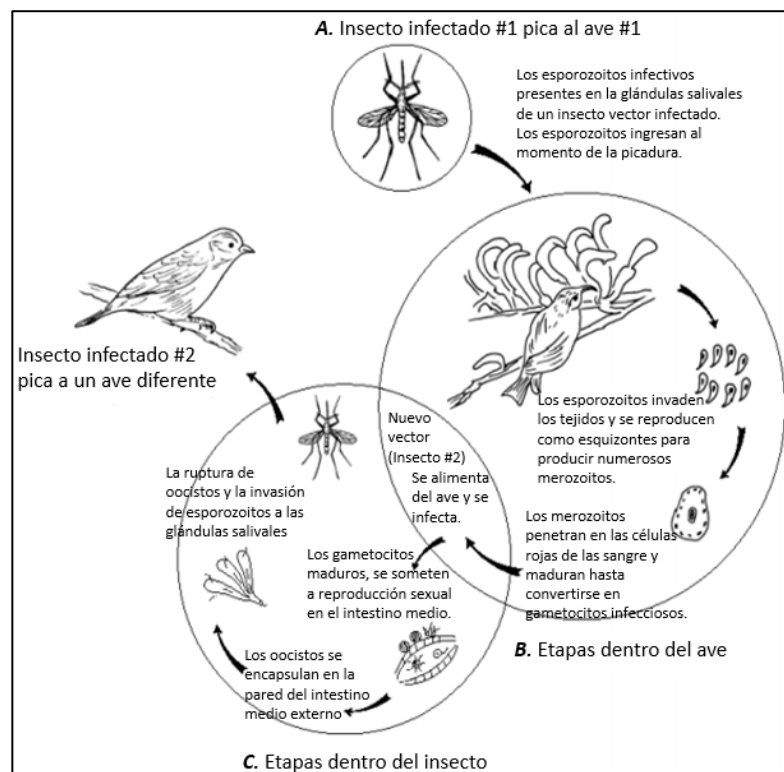


Figura 1. Ciclo de vida de malaria aviar. Fuente: Atkinson ⁽²⁴⁾.

1.2.3. Detección microscópica de hemoparásitos

A) Plasmodium

Parasita principalmente eritrocitos, como también trombocitos, leucocitos y células endoteliales. Los trofozoitos juveniles son semejantes a Haemoproteus. Dos claves que ayudan a la identificación del parásito son la presencia de esquizontes y gametocitos en eritrocitos de sangre periférica. Se observa a los esquizontes como inclusiones intracitoplasmática ovaladas u redondas que contienen merozoitos de color oscuro. Los gametocitos contiene pigmentos granulares refráctiles y usualmente ocupa menos del 50% del citoplasma de la célula parasitada, alterando la posición del núcleo del eritrocito ⁽³⁴⁾.

B) Haemoproteus

En este género únicamente se observan trofozoitos jóvenes y gametocitos en sangre periférica. Los gametocitos poseen coloración granulares refractiles amarillo- café ocupando más del 50% del citoplasma, adopta la forma de halterio y rodea el núcleo, haciendo casi nulo el desplazamiento del mismo, en cambio el macrogametocito posee una coloración azul intenso con pigmentos granulares por todo el citoplasma del parásito, en cambio el microgametocito se colorea de azul claro o rosado con pigmentos granulares formados en agregados esféricos ⁽³⁴⁾.

C) Leucocytozoon

En este género se observa gametocitos jóvenes que producen hipertrofia, deformación de las células y los núcleos, adoptando forma de copa. Las células infectadas desplazan su núcleo a la periferia y se vuelven redondeadas o fusiformes, en las formas fusiformes. Dentro de los gametocitos encontramos inclusiones azurófilas de pigmento o pseudopigmento valutina en forma de polvo que posee una refracción débil de luz ⁽³⁵⁾.

1.2.4. Detección molecular

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 mejoran el diagnóstico de las infecciones de parásitos presentes en baja intensidad ⁽³⁶⁾⁽³⁷⁾ . Sin embargo, surge una nueva técnica la de PCR anidada permitiendo mejorar significativamente el índice de detección más alto y detectar infecciones de baja intensidad.

1.2.5. Linajes de hemoparásitos aviares

Muchas especies de aves albergan varios linajes de parásitos sanguíneos. Algunos de los cuales son compartidos a través de diferentes especies de hospederos. Para comprender los sistemas complejos se debe tener en cuenta que distintos linajes, familias y especies de parásitos pueden ocurrir en la misma población, como en el mismo individuo, y que estos parásitos pueden competir o interactuar entre sí ⁽³⁸⁾. 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 hospedero ⁽³⁹⁾.

1.2.6. Ácidos nucleicos

1.2.6.1. El ácido desoxirribonucleico (ADN)

El ADN está organizado en dos pares de cromosomas heredados de cada uno de los progenitores. Cada uno de los genes posee dos copias a los que se les denomina alelos, uno en cada cromosoma de un par. En el caso de los mamíferos a lo largo de los cromosomas están diseminados los genes y separados por secuencias de ADN largas y normalmente repetitivas los genes están formados por exones y separados por intrones. Estos últimos mencionados no llevan información para codificar. Mediante dos procesos se activan las instrucciones codificadas por los genes. El primero es la transcripción (copia) de información genética a otro tipo de ácido nucleico ⁽⁴⁰⁾.

1.2.6.2. Métodos de extracción de ácidos nucleicos

Es preciso provocar una lisis celular para extraer los ácidos nucleicos del material biológico, de modo que inactivan las nucleasas celulares y se separan los ácidos nucleicos de los restos de célula. El procedimiento idóneo de lisis consiste en un equilibrio de técnicas y ha de ser suficientemente fuerte para romper el material inicial complejo, pero suficientemente suave para preservar el

ácido nucleicodiano. Los procedimientos usuales de lisis son los siguientes ⁽⁴⁰⁾:

- Rotura mecánica (trituration, lisis hipotónica, etc.);
- Tratamiento químico (reducción con tioles, agentes caotrópicos, detergentes, etc.) ⁽⁴⁰⁾.
- Digestión enzimática (Proteinasa K, etc.).

Sin embargo, es posible inactivar las nucleasas intracelulares y romper la membrana celular al mismo tiempo. Por ejemplo, una misma solución puede contener sales caotrópicas y detergentes que solubilicen las membranas celulares. Tras la inactivación de las nucleasas y la lisis celular, los restos celulares se eliminan fácilmente por precipitación o filtración ⁽⁴⁰⁾.

1.2.6.3. Importancia de las Técnicas de Extracción

De tal manera que, en todos los organismos, la célula es la unidad de origen estructural y funcional básica, todos poseen esencialmente la misma maquinaria bioquímica y tienen, en común el mismo código genético. Toda la información genética de un organismo vivo se encuentra acumulada en la secuencia lineal de los cuatro nucleótidos que conforman la molécula de ADN.

La importancia de la técnica reside en la purificación y obtención del material genético de modo que se recobre el máximo producto de ADN de alto peso molecular libre de proteínas, inhibidores y fenol de las enzimas de restricción y de la Taq polimerasa. El ADN de alta calidad es un pre requisito para el uso de técnicas en biología molecular como impresiones digitales de ADN (utilizando secuencias altamente repetitivas denominadas minisatelites que permite la identificación genética de las personas) y PCR (para la identificación de las secuencias específicas de ADN mediante el uso de cebadores), no aso el ADN degradado que no sustenta la integridad de los fragmentos de restricción para producir bandas definidas, ni los sitios blanco para los cebadores. Consecuentemente, los métodos apropiados de conservación de muestras en el campo son de extrema importancia, y pueden afectar grandemente la calidad del ADN extraído. También es de gran importancia la obtención de ADN con alta pureza para su aplicación en estudios de genética molecular utilizando técnicas de hibridación y amplificación por reacción en cadena polimerasa (PCR) ⁽⁴⁰⁾.

1.3. Definición de términos básicos

- Parásito: ser que vive y se alimenta a expensas de otro mayor, llamado huésped, durante toda o parte de su vida.
- Malaria: paludismo. Enfermedad producida que es causado por un parásito denominado Plasmodium que se transmite a través de la picadura de mosquitos infectados.
- Hemoparásito: parasito que vive en la sangre del huésped.
- Protocolos: documentos que listan series de instrucciones necesarias para la realización de un experimento o investigación en un laboratorio.
- Estandarización: creación de normas o estándares que establecen las características comunes con las que deben cumplir los procedimientos de una investigación y deben ser respetados en diferentes partes del mundo.
- ADN genómico: conjunto de ADN que comprende el genoma de un organismo, es el ADN cromosómico nuclear que ha sido aislado directamente de células o tejidos.
- Linajes: secuencia de especies que forman una línea directa de descendencia, siendo cada nueva especie el resultado directo de la evolución desde una especie ancestral inmediata. Se determinan por técnicas de sistemática molecular.

- Malaria aviar: enfermedad causada por un parasito protozoo que se transmite por la picadura de un mosquito infectado a un ave.
- Hospedero: aquel organismo que alberga a otro en su interior o lo porta sobre si permitiendo su subsistencia, este puede ser de dos tipos, definitivo cuando alberga la forma adulta, o la etapa de reproducción sexual del parásito o intermediaria cuando alberga la forma larvaria o la etapa asexual del parásito.
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa, técnica de laboratorio que permite amplificar pequeños fragmentos de ADN para identificar gérmenes microscópicos que causan enfermedades.
- Extracción: consiste en la separación y purificación de ADN con el fin de poder estudiarlo. Analizarlo o manipularlo, utilizando técnicas físicas o químicas.
- Vector: artrópodo u otro animal invertebrado que transmite las infecciones parasitarias, se puede realizar de dos formas, mecánica, cuando transmite las infecciones parasitarias en forma pasiva, o biológicas donde el parasito realiza una etapa de desarrollo o maduración.

- ADN: Almacena y transmite la información genética. Dirige el proceso de síntesis de proteínas. Constituye el material genético y forma los genes, que son las unidades funcionales de los cromosomas.
- ARN: Ejecuta las órdenes contenidas en el ADN, se encarga de sintetizar proteínas.
- Ácidos Nucleicos: Los ácidos nucleicos son biomoléculas orgánicas formadas por C, H, O, N y P. Son macromoléculas de elevado peso molecular constituidas por unas unidades básicas llamadas nucleótidos unidos mediante enlaces fosfodiéster.
- ADN genómico: es el conjunto de ADN que comprende el genoma de un organismo, es el ADN cromosómico nuclear que ha sido aislado directamente de células o tejidos.

CAPITULO II: HIPOTESIS Y VARIABLES

2.1. Formulación de la hipótesis

El protocolo estandarizado de aislamiento de ADN genómico de parásitos que causan malaria aviar en la Región Loreto se caracteriza por permitir la obtención de ADN de alta calidad y cantidad apropiada para análisis moleculares

2.2. Variables y definiciones operacionales

| Variable | Tipo | Indicador | Escala | Categorías | Valores | Medios de verificación |
|---|--------------|-----------------------|---------|------------|--|--|
| Independiente: protocolo estandarizado de aislamiento de ADN | Cualitativo | Reproducibilidad | Razón | Alta | 76-100% | cuaderno de laboratorio, base de datos en Excel y registro fotográfico |
| | | | | Media | 4-75% | |
| | | | | Baja | 0-40% | |
| Dependiente: Calidad del ADN genómico | Cualitativo | Ratios de calidad | Razón | Alta | A260/A280: 1,8 - 2,0 A260/A230: > 2,0 | Apuntes de laboratorio |
| | | | | Baja | A260/A280: < 1,7 A260/A230: < 2,0 | |
| Cantidad del ADN genómico | Cuantitativo | Concentración del ADN | Nominal | Alta | > 50 ng/μL | |
| | | | | Baja | < 50 ng/μL | |

CAPITULO III: METODOLOGIA

3.1. Diseño metodológico

La presente investigación fue no experimental con diseño descriptivo-transversal, considerando las características taxonómicas de las especies capturadas y el diagnóstico parasitológico de las mismas en la Región Loreto (Área de concesión Cuenca Alta Río Itaya), durante los años 2020-2021.

3.2. Diseño muestral

3.2.1. Población universo

Estuvo constituido por todas las aves de la Amazonia Peruana (Área de concesión Cuenca Alta Río Itaya)

3.2.2. Población de estudio

Estuvo constituido por todas las aves existentes en el Área de concesión para la conservación Cuenca Alta Río Itaya.

3.2.3. Tamaño de la población de estudio

Estuvo constituido por 315 aves capturadas en el Área de Concesión para conservación Cuenca Alta Río Itaya

3.2.4. Muestreo o selección de la muestra

La selección de la muestra fue al azar de acuerdo a las capturas en los muestreos por redes de neblina tomando en cuentas los criterios de inclusión y exclusión

Se seleccionaron 250 individuos los cuales fueron correctamente anillados y procesados, realizando la toma de muestra sanguínea para así aplicar los diferentes protocolos que nos llevaron a la fase confirmativa de hemoparásitos causantes de malaria aviar.

3.2.5. Criterios de selección

3.2.5.1. Criterios de inclusión

Estuvo constituido por las aves con muestras de sangre codificadas y conservadas correctamente

3.2.5.2. Criterios de exclusión

Estuvo constituidos por las muestras de sangre que no han sido codificadas y aves que no habían sido procesadas completamente.

3.3. Procedimiento de recolección de datos

A) Trabajo de campo

3.3.1. Área de estudio

Los muestreos se realizaron en zonas aledañas a la maloca de la Universidad Científica del Perú-UCP, en el área de Concesión de Conservación Cuenca Alta Río Itaya (CCCARI) ubicada entre los ríos Amazonas, Marañón y Nanay al sureste de la ciudad de Iquitos en el distrito de San Juan Bautista, provincia de Maynas y departamento de Loreto ⁽⁴¹⁾, donde se establecieron 4 puntos de muestreo tomando como referencia las trochas existentes (Figura 2).

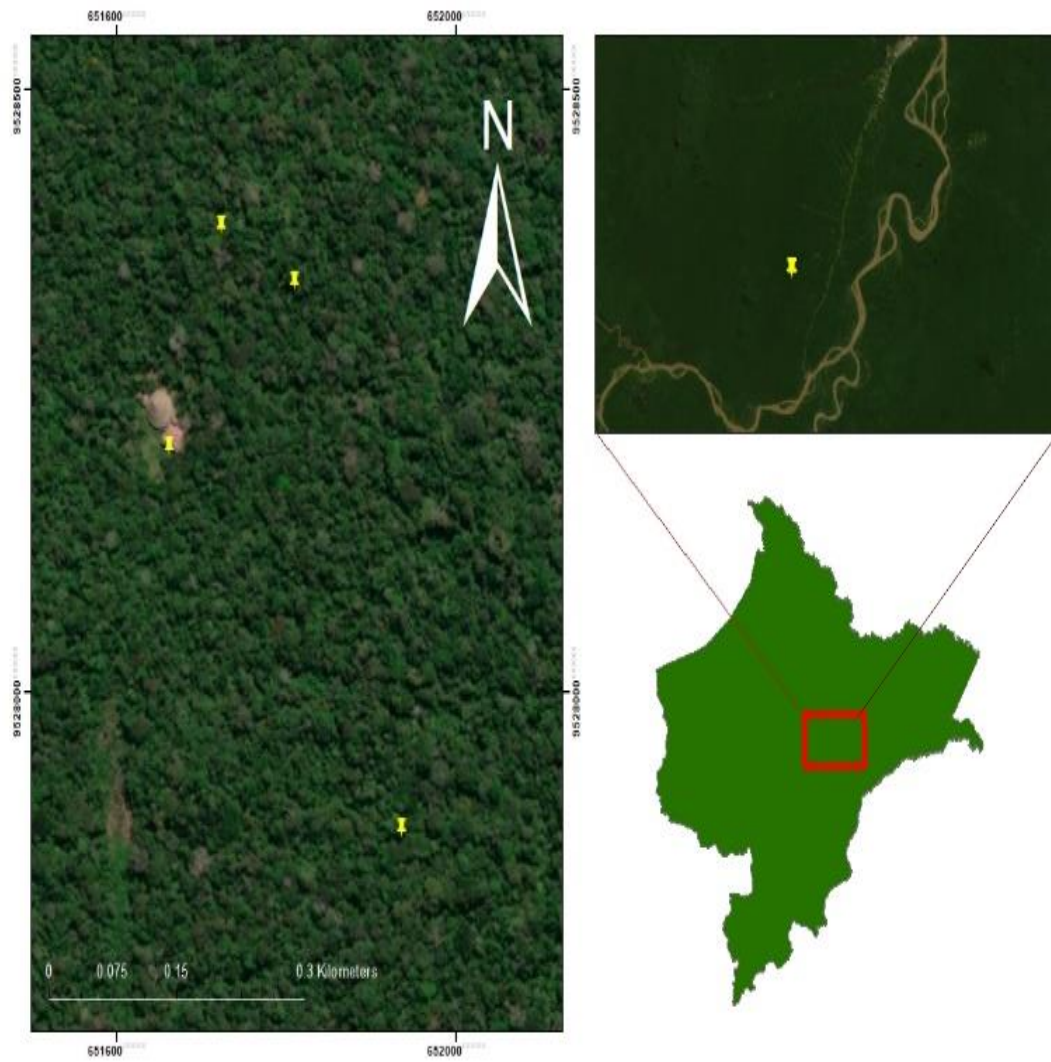


Figura 2. Área de muestreo en la Concesión para la conservación Cuenca Alta Río Itaya de la Universidad Científica del Perú (41).

3.3.2. Recolección de la muestra

3.3.2.1. Captura e identificación de aves

Las aves fueron capturadas en el Área de concesión de la UCP cuenca Alta Río Itaya, en horario mañana (6am a 12pm) y tarde (3pm a 5 pm), donde se utilizaron 10 redes de neblina (12.5 x 2.6m; con ojo de malla de 36 mm) colocadas a nivel de sotobosque (3m de altura sobre la superficie) de forma individual o en sistemas de 2 o 3 redes (cada sistema tuvo un intervalo de 10 metros), según las condiciones del terreno; la revisión de las redes se realizó en intervalos de 30 minutos, con la finalidad de establecer periodos libres de perturbación, así como evitar que las especies capturadas sufran daño por permanecer largos periodos en ellas. Las aves se extrajeron manualmente con mucho cuidado evitando estresarlos e inmediatamente fueron colocados en bolsas de tela para ser trasladados al punto de procesamiento ⁽⁴²⁾ (Anexo 1).

3.3.2.2. Marcación de aves y procesamiento

Las aves capturadas fueron identificadas morfológicamente según Schulenberg *et al.*⁽⁴²⁾ y a nivel de especie según Plenge ⁽⁴³⁾, así mismo fueron marcadas haciendo un pequeño corte en dos plumas de la cola, para tener un mayor control de los

individuos de tal manera se evitó duplicar los registros y se registraron las medidas morfológicas básicas y la masa corporal, estableciendo combinaciones diferentes en una plantilla de trabajo para cada espécimen ⁽⁴⁴⁾ (Anexo 2).

3.3.2.3. Colecta de muestras sanguíneas

Se obtuvo mediante punción de la vena braquial del ala ⁽⁴⁵⁾. La sangre fue colectada en capilares heparinizados para luego ser transferidos a tarjetas Whatman FTA (GE Healthcare, EE. UU.), se codificó y almacenó a temperatura ambiente dentro de un envase con gel de sílice hasta la realización de las pruebas moleculares (Anexo 3).

También se transfirieron muestras de los capilares a tubos vacutainer con EDTA tapa morada para hematología, haciendo un pool de muestras de sangre líquida (1ml) agrupándolas por familia al que pertenece la especie de ave y se almaceno en un cooler con hielo seco.

B) trabajo de laboratorio

3.3.2.4. Ensayos de estandarización de Protocolos.

Se utilizaron preliminarmente muestras colectadas de *Cacicus cela* por Romero ⁽⁴⁷⁾ para realizar los ensayos correspondientes. Se utilizó y modifíco el protocolo de

precipitación por sales (Salting-out) ⁽⁴⁸⁾, que consistió en extraer una pequeña parte de sangre impregnada en las tarjetas Whatman FTA, colocándolos en microtubos para adicionar 200 µl de TNES a pH 8 y 5 µl de proteinasa K (10 mg/ml), llevándolo a incubar a 56°C por 5 horas, se agregó 85 µl de Cloruro de sodio (NaCl) 5 M y se homogenizó por vortex (ISOLAB, modelo MX-S) a máxima revolución por 15 segundos. Se centrifugó (Thermoscientific, modelo MicroCL21R) a 21 000xg por 7 minutos, se decantó el sobrenadante en un nuevo microtubo de 1,5 ml, agregando asimismo 500 µl de isopropanol al 95%, se volvió a centrifugar por 15 min y con la ayuda de una micropipeta, se descartó el isopropanol, agregando 500 µl de Etanol frio al 70%, volviendo a centrifugar por 10 minutos, finalmente se descartó el sobrenadante para luego secarlo a 55°C de 10-15 min en un termoblock (USA SCIENTIFIC, INC, modelo P.O.Box 3565) y finalmente se agregó 100 µl de buffer IDTE.

Luego, se procedió a amplificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real de acuerdo a Bell et al. ⁽⁴⁹⁾ empleando los cebadores R330F (5'-CGTTCTTAACCCAGCTCACG-3') y R480RL (5'-GCCTGGAGGTWAYGTCC-3'), estos pueden identificar los tres géneros de parásitos en una sola reacción en donde flanquean un fragmento de 182 pares de bases de ADNr

mitocondrial conservado (Anexo 4), amplificados bajo las siguientes condiciones en un termociclador: 95 ° C por 30 s, seguido de 35 ciclos de 95 ° C durante 30 s y 53 °C durante 35 s (con una lectura de placa) seguido de una curva de fusión final, utilizando la configuración predeterminada del instrumento. Se incluyeron controles negativos en todas las reacciones (Anexo 5).

Así mismo según las condiciones de la muestra colectada, al obtener sangre líquida conservada en vacutainer con EDTA, utilizamos el método de aislamiento de células sanguíneas por gradiente de densidades ⁽⁴⁴⁾(Anexo 6), que consistió en diluir la muestra de sangre con 2 ml de NaCl homogenizándola, posteriormente se agregó a un tubo falcon 3 ml de Ficoll-paque para luego agregar cuidadosamente 2 ml de muestra diluida, centrifugándolo a 400 xg durante 30 minutos a 4°C, finalmente se extrajo la capa superior que contiene plasma, células mononucleadas y Ficoll-paque, quedándonos con la última capa de eritrocitos la cual para conservarla se agregó 1ml de NaCl, de esta se alicuotó 100 µl dentro de un microtubo de 1.5 ml y se agregó cloruro de amonio (Solución de lisis fría), homogenizando con la sangre e incubando a temperatura ambiente durante 30 minutos, pasado este tiempo se centrifugo a 500 xg durante 10 minutos a 4°C donde se obtuvo un primer pellet y el sobrenadante fue traspasado a otro microtubo de 1.5 ml la cual se volvió a

centrifugar a 10 000 xg durante 5 min a 4°C obteniéndose el pellet final con el cual se realizó la extracción de ADN Y la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa siguiendo el protocolo de JD Maddox unpublished data con cebadores apDNA FWD Set1 (5'-GATATGGACCGAACTGTCTCAC-3') y apDNA REV Set1 (5'-GTCGGCTTATCGCATCCTAAA-3') para la detección de ADN de aves y cebadores R330F (5'-CGTTCTTAACCCAGCTCACG-3') y R480RL (5'-GCCTGGAGGTWAYGTCC-3') para parásitos.

3.4. Procesamiento y análisis de datos

La información registrada durante la ejecución de la investigación se ordenó en una base de datos en el Programa Microsoft Office Excel 2010 para realizar con ello los análisis estadísticos correspondientes utilizando IBM SPSS statistics 25.

3.5. Aspectos éticos

La investigación al tener contacto directamente con las aves, tomó en cuenta diferentes aspectos que salvaguarde la vida de cada individuo de modo que las personas que intervinieron en la investigación tomaron las siguientes medidas, además que se contó con los permisos de colecta emitidos por el SERNAMP (ver anexo 7):

- Se manejó cada ave de manera cuidadosa, suave, callada, con respeto y en el menor tiempo.
- Se cerraron las trampas o redes de neblina cuando observamos depredadores en el área y condiciones climáticas adversas.
- Se evaluó y reviso frecuentemente la condición de las trampas y redes de neblina.

En el caso del laboratorio se tomó en cuenta lo siguiente:

- Se dio seguimiento de las normas de bioseguridad en el laboratorio
- Se trabajo con cautela al momento de la extracción de ADN.

CAPITULO IV: RESULTADOS

Comparar protocolos de aislamiento del ADN genómico de parásitos de los géneros Plasmodium, Haemoproteus, Leucocytozoon causantes de la malaria aviar en la Región Loreto

Al comparar los protocolos estandarizados para la extracción del ADN genómico de hemoparásitos causantes de la malaria aviar, a partir de muestras sanguíneas conservadas de diferentes maneras, por el método de precipitación por sales (Salting out) y aislamiento de células sanguíneas por gradiente de densidades.

Las muestras colectadas por papeles Whatman aplicando el método de precipitación de sales han mostrado mejores resultados en cuanto a su elevada concentración y ratios de calidad (A_{260nm}/A_{230nm} de 2 a 2,1 y de A_{260nm}/A_{280nm} de 1,8 a 1,9) (Anexo 8), estos análisis espectrofotométricos nos indican que el ADN obtenido no presenta contaminantes comunes como compuestos fenólicos, proteínas y/o polisacáridos, respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación de protocolos en cuanto a la concentración y ratios de calidad obtenidos.

| Protocolo | Concentración ng/ μ l | Ratios de calidad | |
|-----------|------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| | | A_{260nm}/A_{230nm} | A_{260nm}/A_{280nm} |
| 1 | 3218.05 \pm 1321.07 ^a | 2.245 \pm 0.0645 ^a | 1.875 \pm 0.0208 ^a |
| 2 | 359 \pm 544.08 ^b | 3.2975 \pm 2.2075 ^a | 1.98 \pm 0.1398 ^a |
| 3 | 121.325 \pm 150.59 ^b | 1.97 \pm 0.6883 ^a | 1.805 \pm 0.2130 ^a |

Leyenda: letras distintas en superíndice (a,b) indican diferencias estadísticas significativas con la prueba Kruskal Wallis(Anexo 9)

Así mismo, el análisis electroforético nos muestra que el ADN genómico no presenta degradación, obteniendo ADN integro, ni contaminación de polisacáridos y también no se evidencio retención del material genético en los pocillos (Figura 3).

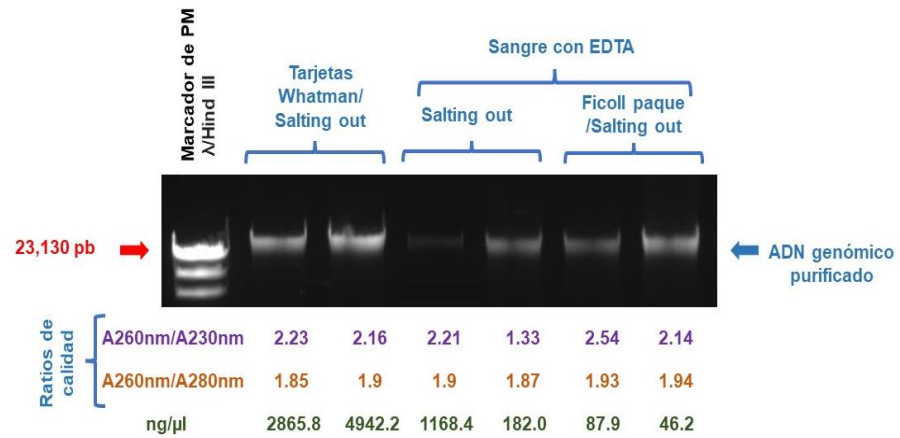


Figura 3. Gel de agarosa al 1% mostrando bandas de ADN genómico según protocolo aplicado.

Finalmente se determinó la eficiencia de la extracción mediante la detección de ADN genómico de aves y parásitos utilizando la Reacción de Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qRCP), permitiéndonos calcular la fluorescencia mediante el número de ciclos (Cq) tanto del parásito como las aves (Figura 4).



Figura 4. Número de ciclos detectados mediante qPCR.

Identificación de aves parasitadas por los géneros Plasmodium, Haemoproteus y o Leucocytozoon causantes de malaria aviar en la Región Loreto.

Se capturó un total de 281 aves, pertenecientes 66 especies, 5 órdenes, y 18 familias tales como: Alcedinidae, Bucconidae, Capitonidae, Cardinalidae, Columbidae, Formicariidae, Furnariidae, Galbulidae, Grallariidae, Onychorhynchidae, Passerellidae, Pipridae, Ramphastidae, Thamnophilidae, Thraupidae, Troglodytidae, Turdidae y Tyrannidae (Tabla 2)(Figura 5).

Tabla 2. Especies identificadas en la Cuenca Alta Río Itaya (CCCARI) de la Universidad Científica del Perú.

| ORDEN | FAMILIA | ESPECIE |
|---------------|------------------|-----------------------------------|
| CORACIIFORMES | ALCEDINIDAE | <i>Chloroceryle aenea</i> |
| CORACIIFORMES | ALCEDINIDAE | <i>Chloroceryle inda</i> |
| COLUMBIFORMES | COLUMBIDAE | <i>Geotrygon montana</i> |
| PICIFORMES | CAPITONIDAE | <i>Capito auratus</i> |
| PICIFORMES | RAMPHASTIDAE | <i>Selenidera reinwardtii</i> |
| PICIFORMES | RAMPHASTIDAE | <i>Pteroglossus azara</i> |
| PICIFORMES | RAMPHASTIDAE | <i>Pteroglossus pluricinctus</i> |
| GALBULIFORMES | BUCCONIDAE | <i>Nonnula brunnea</i> |
| PASSERIFORMES | PIPRIDAE | <i>Ceratopipra erythrocephala</i> |
| PASSERIFORMES | PIPRIDAE | <i>Lepidothrix coronata</i> |
| PASSERIFORMES | PIPRIDAE | <i>Machaeropterus striolatus</i> |
| PASSERIFORMES | PIPRIDAE | <i>Cyanoloxia rothschildii</i> |
| PASSERIFORMES | PIPRIDAE | <i>Pseudopipra pipra</i> |
| PASSERIFORMES | CARDINALIDAE | <i>Cyanocompsa cyanoides</i> |
| PASSERIFORMES | CARDINALIDAE | <i>Habia rubica</i> |
| PASSERIFORMES | FORMICARIIDAE | <i>Formicarius colma</i> |
| PASSERIFORMES | GALBULIDAE | <i>Galbula albirostris</i> |
| PASSERIFORMES | TROGLODYTIDAE | <i>Pheugopedius coraya</i> |
| PASSERIFORMES | TROGLODYTIDAE | <i>Microcerculus marginatus</i> |
| PASSERIFORMES | GRALLARIIDAE | <i>Myrmothera campanisona</i> |
| PASSERIFORMES | PASSERELLIDAE | <i>Ammodramus aurifrons</i> |
| PASSERIFORMES | PASSERELLIDAE | <i>Arremon sp.</i> |
| PASSERIFORMES | ONYCHORHYNCHIDAE | <i>Onychorhynchus coronatus</i> |
| PASSERIFORMES | ONYCHORHYNCHIDAE | <i>Terenotriccus erythrurus</i> |
| PASSERIFORMES | THRAUPIDAE | <i>Sporophila bouvronides</i> |

| | | |
|---------------|----------------|----------------------------------|
| PASSERIFORMES | THRAUPIDAE | <i>Sporophilan sp.</i> |
| PASSERIFORMES | THRAUPIDAE | <i>Tachyphonus curinamus</i> |
| PASSERIFORMES | THRAUPIDAE | <i>Tangara schrankii</i> |
| PASSERIFORMES | THRAUPIDAE | <i>Oryzoborus angolensis</i> |
| PASSERIFORMES | THRAUPIDAE | <i>Ramphocelus carbo</i> |
| PASSERIFORMES | TYRANNIDAE | <i>Zimmerius gracilipes</i> |
| PASSERIFORMES | TYRANNIDAE | <i>Cnipodectes subbrunneus</i> |
| PASSERIFORMES | TYRANNIDAE | <i>Mionectes oleagineus</i> |
| PASSERIFORMES | TYRANNIDAE | <i>Myiarchus tuberculifer</i> |
| PASSERIFORMES | TYRANNIDAE | <i>Platyrinchus saturatus</i> |
| PASSERIFORMES | TURDIDAE | <i>Catharus minimus</i> |
| PASSERIFORMES | TURDIDAE | <i>Catharus ustulatus</i> |
| PASSERIFORMES | FURNARIIDAE | <i>Automolus infuscatus</i> |
| PASSERIFORMES | FURNARIIDAE | <i>Automolus subulatus</i> |
| PASSERIFORMES | FURNARIIDAE | <i>Certhiasomus stictolaemus</i> |
| PASSERIFORMES | FURNARIIDAE | <i>Dendrocicla fuliginosa</i> |
| PASSERIFORMES | FURNARIIDAE | <i>Dendrocicla merula</i> |
| PASSERIFORMES | FURNARIIDAE | <i>Xenops minutus</i> |
| PASSERIFORMES | FURNARIIDAE | <i>Xiphorhynchus elegans</i> |
| PASSERIFORMES | FURNARIIDAE | <i>Xiphorhynchus guttatus</i> |
| PASSERIFORMES | FURNARIIDAE | <i>Glyphorhynchus spirurus</i> |
| PASSERIFORMES | FURNARIIDAE | <i>Philydor pyrrhodus</i> |
| PASSERIFORMES | THAMNOPHILIDAE | <i>Thamnonanes ardesiacus</i> |
| PASSERIFORMES | THAMNOPHILIDAE | <i>Thamnonanes caesius</i> |
| PASSERIFORMES | THAMNOPHILIDAE | <i>Thamnophilus schistaceus</i> |
| PASSERIFORMES | THAMNOPHILIDAE | <i>Willisornis poecilinotus</i> |
| PASSERIFORMES | THAMNOPHILIDAE | <i>Gynnopithys leucaspis</i> |
| PASSERIFORMES | THAMNOPHILIDAE | <i>Hafferia fortis</i> |
| PASSERIFORMES | THAMNOPHILIDAE | <i>Hylophylax naevius</i> |
| PASSERIFORMES | THAMNOPHILIDAE | <i>Hypocnemis peruviana</i> |
| PASSERIFORMES | THAMNOPHILIDAE | <i>Isleria hauxwelli</i> |
| PASSERIFORMES | THAMNOPHILIDAE | <i>Megastictus margaritatus</i> |
| PASSERIFORMES | THAMNOPHILIDAE | <i>Epinecrophylla erythrura</i> |
| PASSERIFORMES | THAMNOPHILIDAE | <i>Epinecrophylla</i> |
| PASSERIFORMES | THAMNOPHILIDAE | <i>haematonata</i> |
| PASSERIFORMES | THAMNOPHILIDAE | <i>Rhegmatorhina</i> |
| PASSERIFORMES | THAMNOPHILIDAE | <i>melanostica</i> |
| PASSERIFORMES | THAMNOPHILIDAE | <i>Myrmotherula menetriesii</i> |
| PASSERIFORMES | THAMNOPHILIDAE | <i>Myrmoborus myotherinus</i> |
| PASSERIFORMES | THAMNOPHILIDAE | <i>Phlegopsis erythroptera</i> |
| PASSERIFORMES | THAMNOPHILIDAE | <i>Pithys albifrons</i> |
| PASSERIFORMES | THAMNOPHILIDAE | <i>Myrmelastes leucostigma</i> |
| PASSERIFORMES | THAMNOPHILIDAE | <i>Mynotherula axillaris</i> |



Figura 5. Algunas familias y especies de aves identificadas en la Concesión de Conservación Cuenca Alta Río Itaya (CCCARI).

Los resultados obtenidos mediante Reacción de Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR) (Figura 6), utilizando primers universales para la detección de los tres tipos de géneros (*Plasmodium*, *Haemoproteus* y o *Leucocytozoon*) causantes de malaria aviar mostraron que 170 individuos resultaron infectados, agrupados en 59 especies positivas a la reacción (Tabla 3).

Tabla 3. Especies positivas a malaria aviar por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).

| ESPECIES | POSITIVOS | NEGATIVOS | TOTAL |
|-----------------------------------|-----------|-----------|-------|
| <i>Ammodramus aurifrons</i> | 1 | 0 | 1 |
| <i>Arremon sp.</i> | 1 | 0 | 1 |
| <i>Automolus infuscatus</i> | 8 | 1 | 9 |
| <i>Automolus subulatus</i> | 2 | 2 | 4 |
| <i>Capito auratus</i> | 1 | 0 | 1 |
| <i>Catharus minimus</i> | 1 | 0 | 1 |
| <i>Catharus ustulatus</i> | 0 | 1 | 1 |
| <i>Ceratopipra erythrocephala</i> | 3 | 1 | 4 |
| <i>Certhiasomus stictolaemus</i> | 1 | 0 | 1 |

| | | | |
|-----------------------------------|----|----|----|
| <i>Chloroceryle aenea</i> | 1 | 0 | 1 |
| <i>Chloroceryle inda</i> | 0 | 1 | 1 |
| <i>Cnipodectes subbrunneus</i> | 1 | 1 | 2 |
| <i>Cyanocompsa cyanooides</i> | 1 | 1 | 2 |
| <i>Cyanoloxia rothschildii</i> | 3 | 0 | 3 |
| <i>Dendrocincla fuliginosa</i> | 0 | 3 | 3 |
| <i>Dendrocincla merula</i> | 3 | 1 | 4 |
| <i>Epinecrophylla erythrura</i> | 2 | 0 | 2 |
| <i>Epinecrophylla haematonata</i> | 1 | 0 | 1 |
| <i>Formicarius colma</i> | 3 | 2 | 5 |
| <i>Galbula albirostris</i> | 1 | 1 | 2 |
| <i>Geotrygon montana</i> | 2 | 2 | 4 |
| <i>Glyphorhynchus spirurus</i> | 10 | 18 | 28 |
| <i>Gynnopithys leucaspis</i> | 1 | 2 | 3 |
| <i>Habia rubica</i> | 1 | 0 | 1 |
| <i>Hafferia fortis</i> | 2 | 4 | 6 |
| <i>Hylophylax naevius</i> | 1 | 0 | 1 |
| <i>Hypocnemis peruviana</i> | 3 | 0 | 3 |
| <i>Isleria hauxwelli</i> | 1 | 3 | 4 |
| <i>Lepidothrix coronata</i> | 21 | 12 | 33 |
| <i>Machaeropterus striolatus</i> | 2 | 2 | 4 |
| <i>Megastictus margaritatus</i> | 3 | 0 | 3 |
| <i>Microcerculus marginatus</i> | 7 | 4 | 11 |
| <i>Mionectes oleagineus</i> | 11 | 10 | 21 |
| <i>Myiarchus tuberculifer</i> | 2 | 0 | 2 |
| <i>Mynotherula axillaris</i> | 2 | 2 | 4 |
| <i>Myrmelastes leucostigma</i> | 5 | 1 | 6 |
| <i>Myrmoborus myotherinus</i> | 7 | 3 | 10 |
| <i>Myrmothera campanisona</i> | 0 | 1 | 1 |
| <i>Myrmotherula menetriesii</i> | 1 | 0 | 1 |
| <i>Nonnula brunnea</i> | 3 | 0 | 3 |
| <i>Onychorhynchus coronatus</i> | 0 | 2 | 2 |
| <i>Oryzoborus angolensis</i> | 1 | 0 | 1 |
| <i>Pheugopedius coraya</i> | 3 | 1 | 4 |
| <i>Philydor pyrrhodus</i> | 1 | 1 | 2 |
| <i>Phlegopsis erythroptera</i> | 1 | 2 | 3 |
| <i>Pithys albifrons</i> | 4 | 5 | 9 |
| <i>Platyrrinchus saturatus</i> | 1 | 0 | 1 |

| | | | |
|----------------------------------|------------|------------|------------|
| <i>Pseudopipra pipra</i> | 3 | 2 | 5 |
| <i>Pteroglossus azara</i> | 4 | 2 | 6 |
| <i>Pteroglossus pluricinctus</i> | 4 | 0 | 4 |
| <i>Ramphocelus carbo</i> | 2 | 2 | 4 |
| <i>Rhegmatorhina melanostica</i> | 1 | 0 | 1 |
| <i>Selenidera reinwardtii</i> | 3 | 1 | 4 |
| <i>Sporophila bouvronides</i> | 1 | 1 | 2 |
| <i>Sporophilan sp.</i> | 2 | 0 | 2 |
| <i>Tachyphonus curinamus</i> | 1 | 1 | 2 |
| <i>Tangara schrankii</i> | 0 | 1 | 1 |
| <i>Terenotriccus erythrurus</i> | 1 | 2 | 3 |
| <i>Thamnonanes ardesiacus</i> | 2 | 0 | 2 |
| <i>Thamnonanes caesius</i> | 6 | 1 | 7 |
| <i>Thamnophilus schistaceus</i> | 2 | 0 | 2 |
| <i>Willisornis poecilinotus</i> | 5 | 4 | 9 |
| <i>Xenops minutus</i> | 2 | 2 | 4 |
| <i>Xiphorhynchus elegans</i> | 0 | 1 | 1 |
| <i>Xiphorhynchus guttatus</i> | 1 | 0 | 1 |
| <i>Zimmerius gracilipes</i> | 0 | 1 | 1 |
| TOTAL GENERAL | 170 | 111 | 281 |

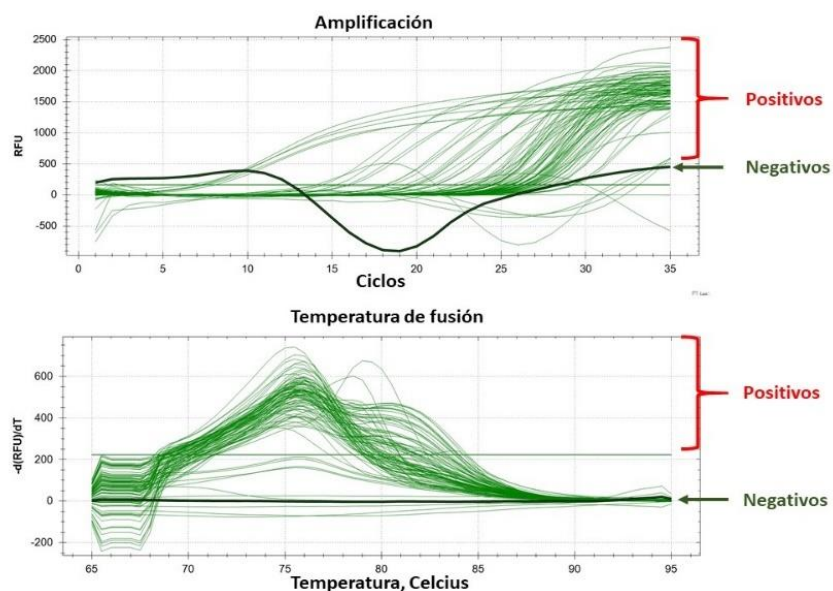


Figura 6. Detección de malaria aviar mediante Reacción de Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real.

El orden con mayor captura fue Passeriforme, con un total de 255 aves, donde 151 resultaron positivos a malaria aviar, en contraposición el orden Caraciiformes registro 2 individuos capturados y con un solo individuo positivo a hemosporios (Figura 7).

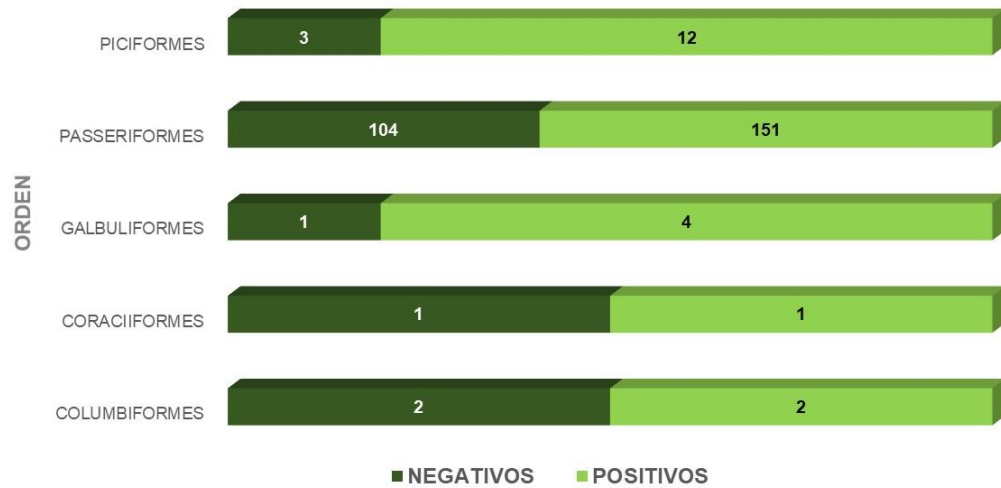


Figura 7. Identificación por órdenes de aves positivos a malaria aviar

Asimismo, en el estudio se puede observar que de las 18 familias solo una no presento infección Grallariidae (n=1, p=0), en contraposición , la que obtuvo mayor número de individuos infectados fue Thamnophilidae (n=77, p=50), seguido de la familia Pipridae (n=49,p=32), Furnariidae (n=57, p=28), Tyraniidae (n=27, p=15), Troglodytidae (n=15, p=10), Ramphastidae (n=14, p=11), Thraupidae (n=12, p=7) y con menor número de capturas e individuos positivos agrupados en otros estuvieron las familias Alcedinidae (n=2, p=1), Bucconidae (n=3, p=3), Capitonidae (n=1, p=1), Cardinalidae (n=3, p=2), Columbidae (n=4, p=2), Formicariidae (n=5, p=3), Galbulidae (n=2, p=1), Passerilidae (n=2, p=2), Turdidae (n=2, p=1) y Onychorhynchidae (n=5, p=1) (Figura 8).

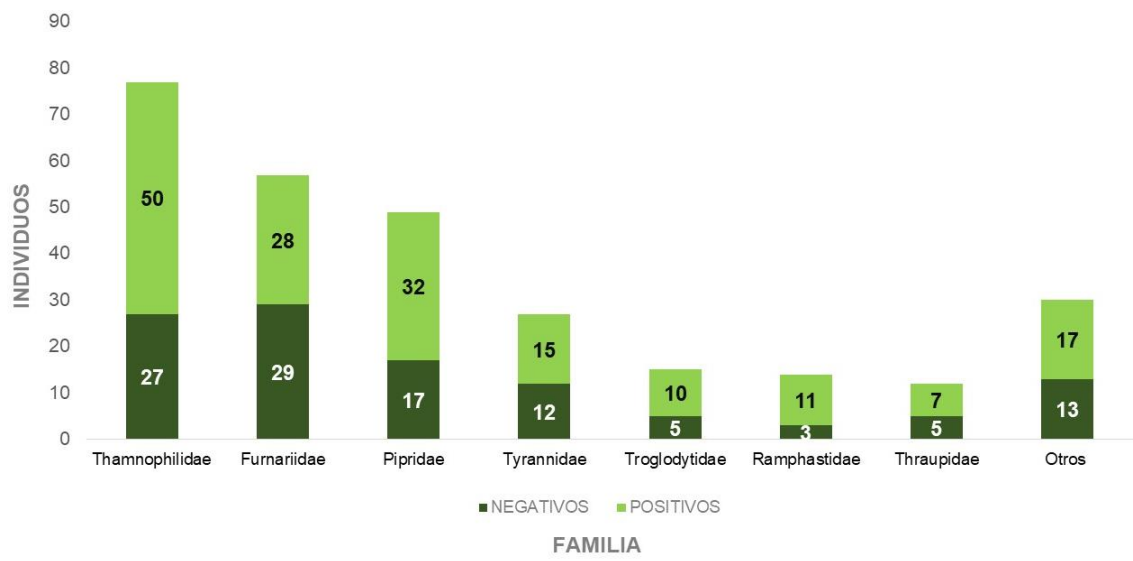


Figura 8. Identificación de familias positivas a malaria aviar.

CAPITULO V: DISCUSIÓN

El estudio de malaria en aves en estas últimas dos décadas ha ido en aumento para comprobar las teorías evolutivas de las interacciones parasito-huésped ^(4,5), para ello se desarrollan protocolos rápidos y de bajo costo para la extracción de ADN genómico, amplificación y cribado ⁽⁷⁾, permitiendo detectar la presencia de estos hemoparásitos y calcular la diversidad, prevalencia u otros índices en un grupo determinado de aves.

En el presente trabajo de investigación se logró estandarizar un protocolo de aislamiento y enriquecimiento de ADN genómico de parásitos causantes de malaria aviar, el éxito en este proceso lo podemos atribuir a los métodos de extracción y purificación probados en base a los protocolos descritos anteriormente por Sunnucks P. et all, Romero y Bell J. A ⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾ trabajados en hemipteros y aves, con ello ha sido posible realizar los análisis moleculares gracias a la obtención de un ADNg caracterizado por su alta calidad y cantidad, con ratios libres de contaminantes, tales como polisacáridos proteínas entre otros metabolitos tal como lo sugiere Sambrook ⁽⁵¹⁾. Asimismo, la amplificación exitosa mediante reacción de cadena de la polimerasa nos permitió detectar la región de ADNr del genoma mitocondrial en aves hemosporidianas, esta región está más conservada que los 478 pb del gen citocromo b que se utiliza en reacción en cadena de la polimerasa convencional, esto hizo posible que se detecte los tres géneros en una sola reacción lo que hace que sea más eficiente, disminuya el tiempo y costo de detección, a comparación de otras técnicas moleculares ampliamente utilizadas ⁽⁴⁹⁾.

Por otro lado el método convencional utilizado para la extracción de ADN donde se realizaba un lavado por medio de sales mencionado anteriormente a pesar de ser eficiente también es económico a comparación del uso de kits que son más costosos, sin embargo estos últimos son utilizados frecuentemente en investigaciones en el extranjero, es por ello que en estos últimos años se han registrado estudios donde utilizan los kits de Qiagen ⁽⁵²⁾⁽⁵³⁾, obtenido resultados muy parecidos a los nuestros y el éxito de la amplificación de estas, donde no solo trabajan con fluidos sino también con órganos de aves que habían sido sacrificadas.

Los resultados obtenidos mediante PCR en tiempo real nos muestra que de las 281 aves capturadas, pertenecientes a 66 especies, 5 órdenes y 18 familias, 170 individuos resultaron positivos a malaria aviar, éstos difieren con un estudio realizado en la Reserva Nacional Allpahuayo Mishana (RNAM) donde en un total de 240 individuos capturados solo 39 de estos resultaron positivos ⁽⁵⁴⁾, sin embargo este último fue detectado por PCR convencional. Así mismo en nuestro estudio la familia Grallaridae no presentó infección a comparación de la familia Thamnophilidae que fue la que más individuos positivos ha tenido ($p=50$), seguida de la familia Pipridae ($p32$), en el estudio mencionado anteriormente difiere con ello siendo la familia Icteridae la que más individuos positivos obtuvo y sin embargo dentro del nuestro este grupo de aves no fue capturada, debiendo asociarse al tipo de bosque donde se colocaron las redes.

Existe un estudio realizado en malaria en aves en Amazonia ⁽⁴⁷⁾; donde se tomaron muestras en 4 puntos del eje de la carretera Iquitos-Nuata, y solo estudiaron una familia en particular; siendo esta la Icteridae, indicando que,

de los 84 individuos capturados, 74 de estas fueron positivos, guardando cierta similitud con los resultados obtenidos en nuestra investigación donde más del 50% de las aves capturadas resultaron positivas.

Por otro lado existen otros estudios en zonas tropicales y sub tropicales como es el caso de un estudio realizado en Panamá ⁽⁵⁵⁾, en donde colectaron muestras sanguíneas de 126 aves y solo 24 de ellas resultaron positivas, la diferencia es muy representativa en cuanto a nuestros resultados, sin embargo; podríamos inferir que el tipo de ensayo utilizado para el diagnóstico de malaria siendo esta microscopia, no es la más recomendable frente a métodos moleculares que arrojan resultados más confiables, sensibles y específicos.

Por tanto, contar con un protocolo estandarizado basado en aproximaciones de biología molecular es de gran importancia, porque nos permite detectar de manera rápida y específica la malaria en aves, proporcionándonos así la información necesaria y oportuna para implementar medidas sanitarias requeridas para dar soporte a los planes de conservación de la ornitofauna y asimismo conocer la diversidad y prevalencia de los parásitos hemosporidarios en la Amazonia Peruana.

CAPITULO VI: CONCLUSIONES

1. El método de concentración de sales resultó eficiente en cuanto al método de aislamiento de células sanguíneas por gradientes de densidades, caracterizándose por su elevada concentración de ADN y ratios de calidad apropiados, permitiendo así estandarizar de manera exitosa el protocolo para el aislamiento y enriquecimiento de ADN genómico de parásitos causantes de malaria aviar en la región Loreto, siendo una herramienta valiosa en el campo en rápida expansión de la investigación de estos hemoparásitos.
2. Se identificaron 170 aves parasitadas con malaria aviar según la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, agrupadas en 59 especies, siendo el orden Passeriforme y la familia *Thamnophilidae* los grupos con mayor número de aves infectadas. De 18 familias identificadas solo una no presentó infección siendo la *Grallariidae*

CAPITULO VII: RECOMENDACIONES

- Realizar evaluaciones de malaria aviar a nivel molecular a largo plazo, para aceptar o descartar los impactos negativos, con respecto a las variables que puedan poner en peligro la supervivencia de las especies encontradas en la zona.
- Aplicar análisis moleculares para la obtención de resultados sensibles y específicos en la detección de malaria aviar.
- Estudiar diversas familias de aves para poder estimar y comprar con mayor precisión los resultados sobre incidencia de infección de malaria.

CAPITULO VIII: FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Valkiunas G. Avian malaria parasites and other Haemosporidia. Boca Raton London New York Washington, D.C.: Editorial CRC Press; 2005. 947 p.
2. Bell JA, Weckstein JD, Fecchio A, Tkach VV. A new real-time PCR protocol for detection of avian haemosporidians. 19 July 2015. 2015;9.
3. Sehgal RNM. Deforestation and avian infectious diseases. J Exp Biol. 15 de marzo de 2010;213(6):955-60.
4. Ricklefs RE, Fallon SM. Diversification and host switching in avian malaria parasites. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 7 de mayo de 2002;269(1494):885-92.
5. Olsson-Pons S, Clark NJ, Ishtiaq F, Clegg SM. Differences in host species relationships and biogeographic influences produce contrasting patterns of prevalence, community composition and genetic structure in two genera of avian malaria parasites in southern Melanesia. Gaillard J-M, editor. J Anim Ecol. julio de 2015;84(4):985-98.
6. Bensch S, Stjernman M, Hasselquist D, Örjan Ö, Hansson B, Westerdahl H, et al. Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 7 de agosto de 2000;267(1452):1583-9.
7. Hellgren O, Waldenström J, Bensch S. A new pcr assay for simultaneous studies of Leucocytozoon, Plasmodium, and Haemoproteus from avian blood. J Parasitol [Internet]. agosto de 2004 [citado 10 de septiembre de 2019];90(4):797-802. Disponible en: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/GE-184R1>

8. Jovani R, Tella JL. Parasite prevalence and sample size: misconceptions and solutions. *Trends Parasitol.* mayo de 2006;22(5):214-8.
9. Freed LA, Cann RL. On Polymerase Chain Reaction Tests for Estimating Prevalence of Malaria in Birds. *J Parasitol.* diciembre de 2003;89(6):1261-4.
10. Kamau E, Alemayehu S, Feghali KC, Juma DW, Blackstone GM, Marion WR, et al. Sample-ready multiplex qPCR assay for detection of malaria. *Malar J.* diciembre de 2014;13(1):158.
11. Harl J, Himmel T, Valkiūnas G, Weissenböck H. The nuclear 18S ribosomal DNAs of avian haemosporidian parasites. *Malar J.* diciembre de 2019;18(1):305.
12. Meixell BW, Arnold TW, Lindberg MS, Smith MM, Runstadler JA, Ramey AM. Detection, prevalence, and transmission of avian hematozoa in waterfowl at the Arctic/sub-Arctic interface: co-infections, viral interactions, and sources of variation. *Parasit Vectors.* diciembre de 2016;9(1):390.
13. Super PE, Riper C van. A comparison of avian Hematozoan epizootiology in two California Coastal Scrub Communities. *J Wildl Dis.* octubre de 1995;31(4):447-61.
14. Belo NO, Passos LF, Júnior LMC, Goulart CE, Sherlock TM, Braga EM. Avian malaria in captive psittacine birds: Detection by microscopy and 18S rRNA gene amplification. *Prev Vet Med.* marzo de 2009;88(3):220-4.
15. Scheuerlein A, Ricklefs RE. Prevalence of blood parasites in European passeriform birds. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 7 de julio de 2004;271(1546):1363-70.

16. Belo NO, Pinheiro RT, Reis ES, Ricklefs RE, Braga ÉM. Prevalence and Lineage Diversity of Avian Haemosporidians from Three Distinct Cerrado Habitats in Brazil. Gursky-Doyen S, editor. PLoS ONE. 8 de marzo de 2011;6(3):e17654.
17. Zehtindjiev P, Ilieva M, Križanauskienė A, Oparina O, Oparin M, Bensch S. Occurrence of haemosporidian parasites in the paddyfield warbler, *Acrocephalus agricola* (Passeriformes, Sylviidae). *Acta Parasitol* [Internet]. 1 de enero de 2009 [citado 30 de junio de 2020];54(4). Disponible en: <https://www.degruyter.com/doi/10.2478/s11686-009-0052-0>
18. Rodríguez OA, Moya H, Matta NE. Parásitos sanguíneos de aves en el Parque Nacional Natural Chingaza: Andes de Colombia. *El Hornero*. agosto de 2008;024(01):001-6.
19. Merino S, Moreno Juan, Vásquez RA, Martínez J, Sánchez-Monsálvez I, Estades CF, et al. Haematozoa in forest birds from southern Chile:
20. Krone O, Waldenström J, Valkiūnas G, Lessow O, Müller K, Iezhova TA, et al. Haemosporidian Blood Parasites in European Birds of Prey and Owls. *J Parasitol*. junio de 2008;94(3):709-15.
21. Marzal A, Ricklefs RE, Valkiūnas G, Albayrak T, Arriero E, Bonneaud C, et al. Diversity, Loss, and Gain of Malaria Parasites in a Globally Invasive Bird. Fleischer RC, editor. PLoS ONE. 11 de julio de 2011;6(7):e21905.
22. 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*. julio de 2007;43(3):382-98.

23. Beadell JS, Gering E, Austin J, Dumbacher JP, Peirce MA, Pratt TK, et al. Prevalence and differential host-specificity of two avian blood parasite genera in the Australo-Papuan region: host-specificity of avian Haematozoa. *Mol Ecol.* 15 de noviembre de 2004;13(12):3829-44.
24. Atkinson CT, Thomas NJ, Hunter DB, editores. *Parasitic Diseases of Wild Birds* [Internet]. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2008 [citado 2 de julio de 2020]. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780813804620>
25. Knowles SCL, Wood MJ, Alves R, Wilkin TA, Bensch S, Sheldon BC. Molecular epidemiology of malaria prevalence and parasitaemia in a wild bird population: Molecular epidemiology of avian malaria. *Mol Ecol.* marzo de 2011;20(5):1062-76.
26. Greiner EC, Bennett GF, White EM, Coombs RF. Distribution of the avian hematozoa of North America. *Can J Zool.* 1 de diciembre de 1975;53(12):1762-87.
27. Padilla DP, Illera JC, Gonzalez-Quevedo C, Villalba M, Richardson DS. Factors affecting the distribution of haemosporidian parasites within an oceanic island. *Int J Parasitol.* marzo de 2017;47(4):225-35.
28. Valkiunas G. *Avian Malarial Parasites and Other Haemosporidia* [Internet]. 1.^a ed. CRC Press; 2004 [citado 30 de junio de 2020]. Disponible en: <http://gen.lib.rus.ec/book/index.php?md5=3eaa79614fe53405e9f0fe06a9c47cb4>
29. Bennett GF. Phylogenetic distribution and possible evolution of the avian species of the Haemoproteidae. *Syst Parasitol.* septiembre de 1993;26(1):39-44.

30. Bennett GF, Witt H, White EM. Blood parasites of some Jamaican birds. *J Wildl Dis.* enero de 1980;16(1):29-38.
31. Atkinson CT, Thomas NJ, Hunter DB, editores. *Parasitic Diseases of Wild Birds.* Edición: 1. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell; 2009. 592 p.
32. Galen SC, Witt CC. Diverse avian malaria and other haemosporidian parasites in Andean house wrens: evidence for regional co-diversification by host-switching. *J Avian Biol.* julio de 2014;45(4):374-86.
33. Friend M, Franson JC. Field manual of wildlife diseases: General field procedures and diseases of birds [Internet]. Field manual of wildlife diseases: General field procedures and diseases of birds. Washington, D.C.: U.S. Geological Survey; 1999 [citado 30 de junio de 2020] p. 438. (Information and Technology Report; vols. 1999-0001). Report No.: 1999-0001. Disponible en: <http://pubs.er.usgs.gov/publication/itr19990001>
34. Ritchie BW, Harrison GJ, Harrison LR, editores. *Avian medicine: principles and application.* Lake Worth, Fla: Wingers Pub; 1994. 1384 p.
35. Mena Martínez KE. Determinación de Hemoparásitos en aves silvestres de las familias Trochilidae, Tyrannidae, Furnariidae, Columbidae, en las provincias de Zamora Chinchipe y Pastaza. [Ecuador]: Universidad Central Del Ecuador; 2018.
36. Peirce MA. Distribution and host-parasite check-list of the haematozoa of birds in Western Europe. *J Nat Hist.* junio de 1981;15(3):419-58.
37. 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 Fenn.* noviembre de 2012;49(5-6):331-40.

38. Merino S, Moreno J, José Sanz J, Arriero E. Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). Proc R Soc Lond B Biol Sci. 22 de diciembre de 2000;267(1461):2507-10.
39. Svensson-Coelho M, Blake JG, Loiselle BA, Penrose AS, Parker PG, Ricklefs RE. Diversity, Prevalence, and Host Specificity of Avian *Plasmodium* and *Haemoproteus* in a Western Amazon Assemblage. Ornithol Monogr. junio de 2013;76(1):1-47.
40. Guerrero Tenazoa ML, Tello Orbe AJ. Purificación de ADN genómico y ARN total de tres especies de microalgas oleaginosas *Ankistrodesmus* sp. *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. [Iquitos-Perú]: Universidad Científica del Perú; 2016.
41. Sangama Navas KS. "Diversidad y abundancia de especies de peces Characiformes en tres quebradas de la concesión de conservación Cuenca Alta Rio Itaya, San Juan Bautista, Loreto - Perú". [Iquitos-Perú]: Universidad Científica del Perú; 2019.
42. Schulenberg T, Stotz Douglas, Lane Daniel, O'Neill Jhon, Parker Theodore. *Birds of Peru*. Princeton: Princeton University Press; 2007. 664 p.
43. Plenge M. A., «List of the Birds of Peru»; 2021. 42 p.
44. Ralph CJ, Geupel GR, Pyle P, Martin TE, DeSante DF, Milá B. Manual de métodos de campo para el monitoreo de aves terrestres. Albany, California: Pacific Southwest Research Station; 1996. 51 p.
45. 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.
46. Bennett GF. Simple techniques for making avian blood smears. *Can J Zool.* 1 de mayo de 1970;48(3):585-6.
 47. Romero L. «Prevalencia y análisis filogenético de hemoparásitos en colonias de cacicus cela “paucarensis” linnaeus, 1758 (*Passeriformes: Icteridae*).», Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, Iquitos - Perú, 2019.
 48. Sunnucks P. y Hales D. F. «Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae)», *Mol. Biol. Evol.*, vol. 13, n.o 3, pp. 510-524, Marzo. 1996. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a025612.
 49. Bell J. A., Weckstein J. D., Fecchio A., y Tkach V. V., «A new real-time PCR protocol for detection of avian haemosporidians», *Parasit. Vectors*, vol. 8, n.o 1, p. 383, dic. 2015, doi: 10.1186/s13071-015-0993-0.
 50. Recommended Standard Method for Isolating Mononuclear Cells [Internet]. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/PE/es/technical-documents/protocol/clinical-testing-and-diagnostics-manufacturing/hematology/recommended-standard-method>.
 51. Sambrook J, Frisch E, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
 52. Himmel T, Harl J, Pfanner S, Nedorost N, Nowotny N, Weissenböck H. Haemosporidiosis in wild Eurasian blackbirds (*Turdus merula*) and song thrushes (*T. philomelos*): an in situ hybridization study with emphasis on

- exo-erythrocytic parasite burden. *Malar J.* 12 de febrero de 2020;19(1):69.
53. Harl J, Himmel T, Valkiūnas G, Ilgūnas M, Bakonyi T, Weissenböck H. Geographic and host distribution of haemosporidian parasite lineages from birds of the family Turdidae. *Malar J.* 15 de septiembre de 2020;19(1):335.
54. Ricopa García L, Villa Galarce ZH. Prevalencia y diversidad de hemoparásitos en aves capturadas en la Reserva Nacional Allpahuayo Mishana (RNAM), Iquitos-Perú, 2013. *Univ Nac Amazon Peru [Internet].* 2016; Disponible en: <https://repositorio.unapiquitos.edu.pe/handle/20.500.12737/3291>.
55. Herrera R., Jorge M.; Pérez, Jacinto A.; Fuentes, Yamilka Y.; Gantes,, Carol J. “Endoparásitos en aves residentes y migratorias de puntasanta bárbara,parque nacional darien, Panamá”. *revista colon ciencias tecnologia y negocios.* 2018;5:19.

ANEXOS

Anexo 1. Secuencia de fotos de la Captura e identificación de aves en el área de concesión de la UCP, cuenca Alta Río Itaya



1. Área de concesión de la UCP, cuenca Alta Río Itaya



2. Redes de neblina colocadas a nivel de sotobosque de forma individual o en sistemas de 2 o 3 redes



3. Revisión de las redes en intervalos de 30 minutos



4. Extracción de aves



5. Colocar las aves en bolsas de tela



6. Identificación de aves en el punto de procesamiento

Anexo 2. Secuencia de fotografías de la marcación y procesamiento de aves



1. Identificación de aves



2. Procesamiento del ave



3. Marca en las plumas de la cola

Anexo 3. Secuencia de fotografías de la colecta de muestras sanguíneas



1. Materiales de extracción de sangre



2. Muestra de sangre de la vena braquial



3. Tomamos la muestra de sangre con un capilar

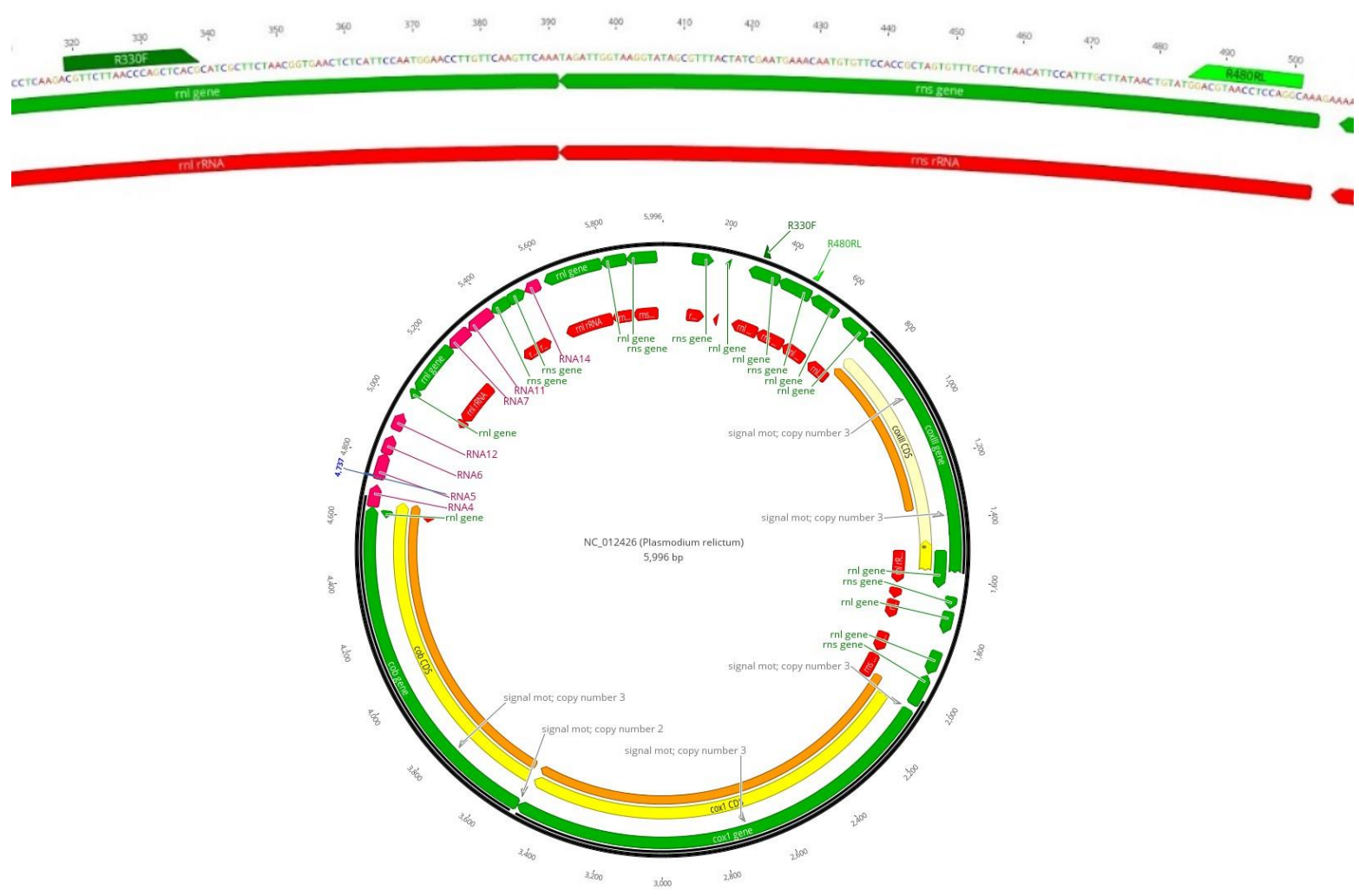


4. Depositamos la sangre en las tarjetas Whatman FTA

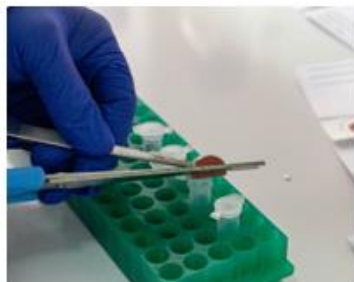


5. Liberación del ave

Anexo 4. Cebadores R330F Y R480RL para protocolos de PCR en tiempo real.



Anexo 5. Extracción de ADN de aves y amplificación de las muestras



1. Cortar las muestras de sangre en microtubos de 1.5 ml



2. Agregar 200ul de TNES y 10 ul de proteinasa K



3. Incubar a 56°C por 5 horas



4. Agregar 85ul de Cloruro de sodio (NaCl) 5 M y vortex por 15 seg.



5. Centrifugar a 21 000xg por 7 min y pasar el sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5ml.



6. Agregar 500ul de isopropanol al 95% y centrifugar a 21 000xg por 15 min.



7. Retirar el sobrenadante, quedarse con el pellet y agregar 500ul de Etanol al



8. Centrifugar a 21 000xg por 10 min.



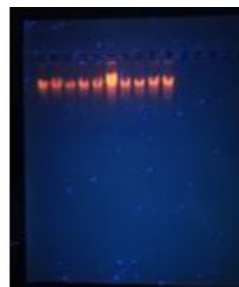
9. Pipetear el Etanol y secar por 5 min al termobloc



10. Agregar de 100ul y resuspender en buffer IDTE.



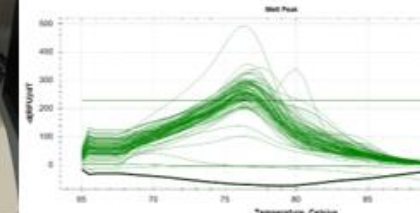
11. Evaluar la calidad y concentración del ADN en el Nanodrop



12. Electroforesis



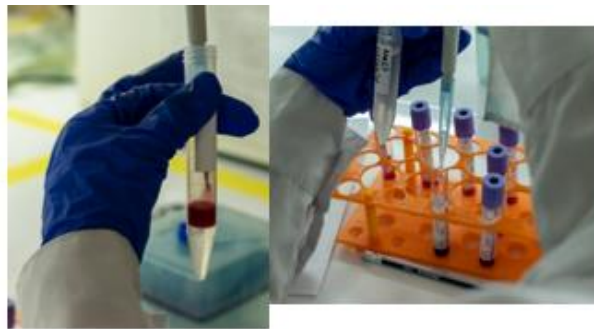
13. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real



Anexo 6. Aislamiento de células sanguíneas de aves por gradientes de densidades

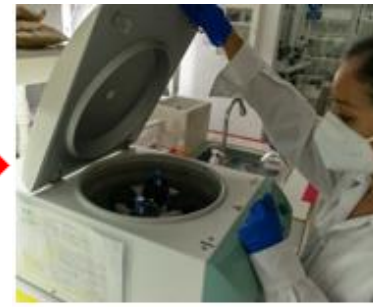


1. Agregar medio Ficoll-Paque (3ml) a un tubo falcon



2. Colocar con cuidado la muestra de sangre diluida (2ml) en la solución medio Ficoll-Paque

DILUCIÓN DE SANGRE:
 Agregar a los tubos vacueteine de sangre 2 ml de NaCl homogenizar por inversión.



3. Centrifugar a 400g durante a 30 min a 4°C



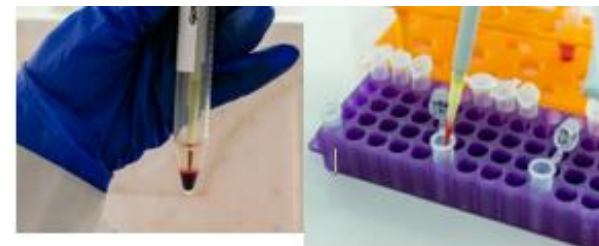
4. Extraer la capa superior que contiene plasma, células mononucleadas y Ficoll-Paque con la ayuda de una pipeta, quedándonos con los eritrocitos.



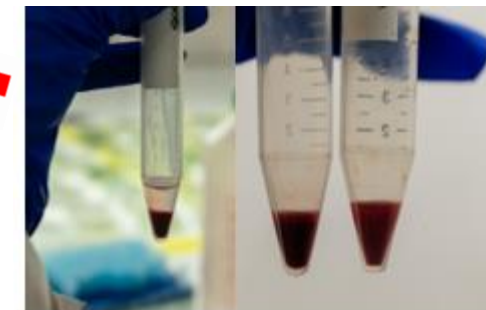
8. Mezclar por 30 min a T_{amb} ambiente hasta que el líquido este claramente rojo.



7. Llenar la capacidad de tubo con solución de lisis fría



6. Alicuotar 100ul de sangre dentro de un microtubo de 1.5 ml.



5. Agregar a la capa de eritrocitos 1 ml de NaCl



9. Centrifugar a 10 000 g x 5 min a 4°C descartar el sobrenadante y quedarse con el pellet, la cual se continuará la extracción del ADN.



10. Spin a 4°C por 10 min a 500xg. Obteniendo un primer pellet y el sobrenadante se pasa a un microtubo de 1.5 ml.

Anexo 7. Permiso de colecta emitido por SERNANP



SERFOR

Formado digitalmente por CERSAN
GUSTAVO URBANO LÓPEZ FLORES
2021/05/13 11:58:02 AM
Cargo: Director General
Nombre: Gustavo URBANO LÓPEZ FLORES
Fecha: 13.05.2021 11:58:02 -05:00

RESOLUCIÓN DE DIRECCIÓN GENERAL

Magdalena Del Mar, 13 de Mayo del 2021

RDG N° D000266-2021-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS

VISTOS:

La solicitud de autorización para realizar investigación científica en fauna silvestre fuera de Áreas Naturales Protegidas - ANP, presentada el día 1 de marzo de 2021 por el señor **Joseph Dylan Maddox** (Expediente N° 2021-0006431), ciudadano de nacionalidad estadounidense, identificado con pasaporte N° 510402774; así como, el Informe Técnico N° D000351-2021-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS-DGSPFFS, de fecha 13 de mayo de 2021; y,

CONSIDERANDO:

Que, mediante el artículo 13 de la Ley N° 29763, Ley Forestal y de Fauna Silvestre, se creó el Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre - SERFOR, como un organismo público técnico especializado con personería jurídica de derecho público interno, como pliego presupuestal adscrito al Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego - MINAGRI; artículo en el que además se señala que el SERFOR es la autoridad nacional forestal y de fauna silvestre, ente rector del Sistema Nacional de Gestión Forestal y de Fauna Silvestre - SINAFOR, constituyendo su autoridad técnico normativa a nivel nacional, encargada de dictar las normas y establecer los procedimientos relacionados a su ámbito;

Que, a través del Decreto Supremo N° 019-2015-MINAGRI, se aprobó el "Reglamento para la Gestión de Fauna Silvestre", vigente desde el 1 de octubre de 2015, reglamento que en el numeral 134.1 de su artículo 134, precisa que la investigación científica del patrimonio se aprueba mediante autorizaciones, salvaguardando los derechos del país, respecto a su patrimonio genético nativo; asimismo, en el numeral 134.5 del citado artículo, se dispone que el desarrollo de actividades de investigación básica taxonómica de fauna silvestre, relacionada con estudios moleculares con fines taxonómicos, sistemáticos, filogeográficos, biogeográficos, evolutivos y de genética de la conservación, entre otras investigaciones sin fines comerciales, son aprobadas a través de autorizaciones de investigación científica;

Que, según el numeral 134.2 del artículo 134 del Reglamento para la Gestión de Fauna Silvestre, es competencia del SERFOR la evaluación de la presente solicitud, toda vez que, se advierte que el proyecto de investigación en la referida solicitud, consiste en una investigación básica taxonómica relacionada con estudios moleculares con fines de taxonómicos y biogeográficos;

Que, de acuerdo al literal g) del artículo 53 del Reglamento de Organización y Funciones - ROF del SERFOR, aprobado por Decreto Supremo N° 007-2013-MINAGRI y modificado por Decreto Supremo N° 016-2014-MINAGRI; la Dirección General de Gestión Sostenible del Patrimonio Forestal y de Fauna Silvestre, tiene por función, entre otras, el otorgar permisos de investigación o de difusión cultural con o sin colecta de flora y fauna silvestre y sus recursos genéticos;

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento electrónico archivado en el Servicio Forestal y de Fauna Silvestre, aplicando lo dispuesto por el Art. 25 de D.S. 030-2013-PCM y la Tercera Disposición Complementaria Final del D.S. 036-2016-PCM. Su autenticidad e integridad pueden ser contrastadas a través de la siguiente dirección web: Url: <https://igd.serfor.gob.pe/validadorDocumental/> Clave: Y0JLY26

Anexo 8. Concentración y ratios de ADN de aves extraído

| CODIGO | Scientific Name | CONCENTRACIÓN | 260/280 | 260/230 |
|---------|---------------------------------|---------------|---------|---------|
| P19-001 | <i>Glyphorynchus spirurus</i> | 2865.8 | 1.85 | 2.23 |
| P19-002 | <i>Philydor pyrrhodus</i> | 4942.2 | 1.88 | 2.16 |
| P19-003 | <i>Glyphorynchus spirurus</i> | 3306 | 1.86 | 2.29 |
| P19-004 | <i>Mionectes oleagineus</i> | 1758.2 | 1.89 | 2.3 |
| P19-005 | <i>Glyphorynchus spirurus</i> | 490 | 1.87 | 2.15 |
| P19-006 | <i>Hyloctistes sublatius</i> | 2393.6 | 1.83 | 2.16 |
| P19-007 | <i>Myrmoborus myotherinus</i> | 4358.7 | 1.86 | 2.25 |
| P19-008 | <i>Automolus infuscatus</i> | 2184.8 | 1.89 | 2.26 |
| P19-009 | <i>Mionectes oleagineus</i> | 1051.6 | 1.9 | 2.32 |
| P19-010 | <i>Glyphorynchus spirurus</i> | 905.4 | 1.88 | 2.29 |
| P19-011 | <i>Dixiphia pipra</i> | 2444.1 | 1.89 | 2.29 |
| P19-013 | <i>Phlegopsis erythroptera</i> | 800.8 | 1.9 | 2.21 |
| P19-014 | <i>Glyphorynchus spirurus</i> | 208.1 | 1.87 | 2.09 |
| P19-015 | <i>Xenops minutus</i> | 48.9 | 1.87 | 1.77 |
| P19-016 | <i>Pithys albifrons</i> | 471.1 | 1.89 | 2.16 |
| P19-017 | <i>Xenops minutus</i> | 582 | 1.87 | 2.14 |
| P19-018 | <i>Glyphorynchus spirurus</i> | 218.6 | 1.83 | 2.08 |
| P19-020 | <i>Machaeropterus regulus</i> | 2382 | 1.85 | 2.27 |
| P19-021 | <i>Willisornis poecilinotus</i> | 534.9 | 1.89 | 2.09 |
| P19-023 | <i>Lepidothrix coronata</i> | 217.7 | 1.91 | 2.29 |
| P19-024 | <i>Glyphorynchus spirurus</i> | 429.3 | 1.81 | 2.14 |
| P19-025 | <i>Philydor pyrrhodus</i> | 2624.1 | 1.86 | 2.25 |
| P19-026 | <i>Willisornis poecilinotus</i> | 675 | 1.83 | 1.89 |
| P19-029 | <i>Lepidothrix coronata</i> | 1519.6 | 1.86 | 2.26 |
| P19-030 | <i>Selenidera reinwardtii</i> | 885.3 | 1.83 | 2.08 |
| P19-031 | <i>Pithys albifrons</i> | 816 | 1.89 | 2.07 |
| P19-032 | <i>Myrmeciza fortis</i> | 978.9 | 1.91 | 2.1 |
| P19-033 | <i>Pithys albifrons</i> | 1000.2 | 1.9 | 2.06 |
| P19-034 | <i>Cyanocompsa cyanoides</i> | 293.1 | 1.91 | 2.2 |
| P19-035 | <i>Hyloctistes sublatius</i> | 587.9 | 1.86 | 2.12 |
| P19-036 | <i>Selenidera reinwardtii</i> | 652.8 | 1.82 | 1.6 |
| P19-037 | <i>Mionectes oleagineus</i> | 105.3 | 1.91 | 2.09 |
| P19-038 | <i>Dixiphia pipra</i> | 626.3 | 1.81 | 2.07 |
| P19-040 | <i>Myrmeciza fortis</i> | 571.7 | 1.6 | 1.56 |
| P19-041 | <i>Chloroceryle aenea</i> | 742.1 | 1.88 | 1.89 |
| P19-042 | <i>Gynnopithys leucaspis</i> | 514.1 | 1.8 | 1.89 |
| P19-043 | <i>Dixiphia pipra</i> | 3117 | 1.84 | 2.24 |
| P19-044 | <i>Myrmoborus myotherinus</i> | 415.9 | 1.89 | 2.16 |
| P19-045 | <i>Lepidothrix coronata</i> | 279.7 | 1.9 | 2.21 |
| P19-046 | <i>Myrmoborus myotherinus</i> | 326.8 | 1.89 | 2.02 |

| | | | | |
|---------|----------------------------------|--------|------|------|
| P19-048 | <i>Microcerculus marginatus</i> | 694.8 | 1.77 | 1.93 |
| P19-049 | <i>Formicarius colma</i> | 751.7 | 1.86 | 2.19 |
| P19-050 | <i>Willisornis poecilinotus</i> | 870.9 | 1.84 | 1.96 |
| P19-051 | <i>Myrmeciza fortis</i> | 389.6 | 1.66 | 1.55 |
| P19-052 | <i>Lepidothrix coronata</i> | 329 | 1.85 | 2.13 |
| P19-053 | <i>Glyphorhynchus spirurus</i> | 2128.3 | 1.89 | 2.12 |
| P19-054 | <i>Microcerculus marginatus</i> | 522.9 | 1.83 | 2.12 |
| P19-055 | <i>Willisornis poecilinotus</i> | 603.5 | 1.78 | 1.92 |
| P19-056 | <i>Automolus infuscatus</i> | 942.1 | 1.84 | 2.09 |
| P19-057 | <i>Lepidothrix coronata</i> | 1590.2 | 1.83 | 2.13 |
| P19-058 | <i>Phlegopsis erythroptera</i> | 426.1 | 1.82 | 1.85 |
| P19-059 | <i>Myrmeciza fortis</i> | 357.1 | 1.65 | 1.66 |
| P19-060 | <i>Microcerculus marginatus</i> | 2320.9 | 1.84 | 2.19 |
| P19-061 | <i>Phlegopsis erythroptera</i> | 967.3 | 1.86 | 2.2 |
| P19-062 | <i>Microcerculus marginatus</i> | 653.3 | 1.89 | 2.29 |
| P19-063 | <i>Hypocnemis peruviana</i> | 276.8 | 1.86 | 2.14 |
| P19-064 | <i>Glyphorhynchus spirurus</i> | 349.5 | 1.79 | 1.97 |
| P19-065 | <i>Myrmoborus myotherinus</i> | 567.8 | 1.89 | 1.98 |
| P19-066 | <i>Mionectes oleagineus</i> | 892.2 | 1.88 | 2.23 |
| P19-068 | <i>Microcerculus marginatus</i> | 277.4 | 1.8 | 2.04 |
| P19-070 | <i>Mionectes oleagineus</i> | 688.3 | 1.6 | 1.59 |
| P19-071 | <i>Terenotriccus erythrurus</i> | 13.0 | 1.54 | 0.79 |
| P19-072 | <i>Glyphorhynchus spirurus</i> | 759 | 1.86 | 2.2 |
| P19-073 | <i>Schistocichla leucostigma</i> | 290.5 | 1.91 | 2.17 |
| P19-074 | <i>Glyphorhynchus spirurus</i> | 195.7 | 1.84 | 2.08 |
| P19-075 | <i>Mionectes oleagineus</i> | 273.2 | 1.88 | 2.19 |
| P19-076 | <i>Mionectes oleagineus</i> | 2061.7 | 1.86 | 2.22 |
| P19-077 | <i>Lepidothrix coronata</i> | 35.5 | 0.77 | 0.78 |
| P19-078 | <i>Onychorhynchus coronatus</i> | 521 | 1.86 | 1.95 |
| P19-079 | <i>Lepidothrix coronata</i> | 1144.6 | 1.87 | 2.28 |
| P19-080 | <i>Glyphorhynchus spirurus</i> | 1072.5 | 1.88 | 2.3 |
| P19-081 | <i>Mionectes oleagineus</i> | 2403.7 | 1.87 | 2.26 |
| P19-082 | <i>Lepidothrix coronata</i> | 1791.5 | 1.87 | 2.27 |
| P19-083 | <i>Mionectes oleagineus</i> | 757 | 1.9 | 2.07 |
| P19-084 | <i>Glyphorhynchus spirurus</i> | 771.7 | 1.81 | 1.81 |
| P19-085 | <i>Catharus ustulatus</i> | 4670.6 | 1.87 | 2.18 |
| P19-086 | <i>Thryothorus coraya</i> | 160.2 | 1.88 | 2.17 |
| P19-087 | <i>Myrmotherula hauxwelli</i> | 347.1 | 1.9 | 2.19 |
| P19-088 | <i>Lepidothrix coronata</i> | 61.9 | 1.88 | 2.35 |
| P19-089 | <i>Mynotherula axillaris</i> | 602.5 | 1.91 | 2.03 |
| P19-090 | <i>Mionectes oleagineus</i> | 74.8 | 1.88 | 2.21 |
| P19-091 | <i>Glyphorhynchus spirurus</i> | 575.6 | 1.84 | 2 |

| | | | | |
|---------|---------------------------------|--------|------|------|
| P19-092 | <i>Automolus infuscatus</i> | 4407.9 | 1.87 | 2.23 |
| P19-093 | <i>Galbula albirostris</i> | 619.4 | 1.8 | 1.95 |
| P19-094 | <i>Chloroceryle inda</i> | 1099.1 | 1.85 | 1.89 |
| P19-095 | <i>Onychorhynchus coronatus</i> | 509.8 | 1.77 | 1.93 |
| P19-096 | <i>Mionectes oleagineus</i> | 35.9 | 0.91 | 0.78 |
| P19-097 | <i>Glyphorhynchus spirurus</i> | 984.4 | 1.89 | 2.27 |
| P19-098 | <i>Automolus infuscatus</i> | 549 | 1.85 | 1.99 |
| P19-099 | <i>Microcerculus marginatus</i> | 482.6 | 1.83 | 2.14 |
| P19-100 | <i>Lepidothrix coronata</i> | 484.6 | 1.83 | 2.14 |
| P19-102 | <i>Lepidothrix coronata</i> | 1448.6 | 1.86 | 2.2 |
| P19-103 | <i>Automolus infuscatus</i> | 3.8 | 2.15 | 1.88 |
| P19-105 | <i>Lepidothrix coronata</i> | 335.5 | 1.83 | 2.04 |
| P19-106 | <i>Glyphorhynchus spirurus</i> | 354 | 1.87 | 2.22 |
| P19-107 | <i>Glyphorhynchus spirurus</i> | 2152.1 | 1.86 | 2.2 |
| P19-108 | <i>Hypocnemis peruviana</i> | 231.7 | 1.88 | 2.16 |
| P19-109 | <i>Lepidothrix coronata</i> | 908.8 | 1.86 | 2.17 |
| P19-110 | <i>Microcerculus marginatus</i> | 929 | 1.88 | 2.27 |
| P19-111 | <i>Willisornis poecilinotus</i> | 387.2 | 1.86 | 1.9 |
| P19-112 | <i>Glyphorhynchus spirurus</i> | 264.2 | 2 | 6.26 |
| P19-113 | <i>Mionectes oleagineus</i> | 308.9 | 1.87 | 2.12 |
| P19-114 | <i>Xenops minutus</i> | 548.4 | 1.87 | 2.15 |
| P19-115 | <i>Xiphorhynchus elegans</i> | 533 | 1.74 | 1.96 |
| P19-116 | <i>Dixiphia pipra</i> | 660.4 | 1.89 | 2.19 |
| P19-117 | <i>Mionectes oleagineus</i> | 331.8 | 1.9 | 2.22 |
| P19-118 | <i>Thamnonanes ardesiacus</i> | 580.8 | 1.88 | 2.19 |
| P19-119 | <i>Formicarius colma</i> | 1408.5 | 1.85 | 2.17 |
| P19-120 | <i>Deconychura stictolaena</i> | 681.3 | 1.86 | 2.23 |
| P19-121 | <i>Epinecrophylla erythrura</i> | 1084.5 | 1.77 | 1.95 |
| P19-122 | <i>Mionectes oleagineus</i> | 526.7 | 1.86 | 2.18 |
| P19-123 | <i>Pithys albifrons</i> | 322 | 1.87 | 2.15 |
| P19-124 | <i>Lepidothrix coronata</i> | 523.6 | 1.82 | 2.06 |
| P19-126 | <i>Glyphorhynchus spirurus</i> | 1683.3 | 1.86 | 2.25 |
| P19-127 | <i>Nonnula brunnea</i> | 404.1 | 1.84 | 1.86 |
| P19-128 | <i>Myrmoborus myotherinus</i> | 384.1 | 1.89 | 2.16 |
| P19-129 | <i>Thamnonanes caesius</i> | 638.6 | 1.67 | 1.62 |
| P19-130 | <i>Dendrocincla fuliginosa</i> | 1199.8 | 1.87 | 2.27 |
| P19-131 | <i>Glyphorhynchus spirurus</i> | 235.7 | 1.86 | 2.18 |
| P19-133 | <i>Pipra erythrocephala</i> | 54.9 | 1.78 | 1.89 |
| P19-134 | <i>Glyphorhynchus spirurus</i> | 386.4 | 1.79 | 2.04 |
| P19-135 | <i>Lepidothrix coronata</i> | 179.5 | 1.78 | 2.03 |
| P19-136 | <i>Mionectes oleagineus</i> | 213.5 | 1.84 | 2.08 |
| P19-137 | <i>Mynotherula axillaris</i> | 375.9 | 1.87 | 2.17 |

| | | | | |
|---------|-----------------------------------|--------|------|------|
| P19-138 | <i>Myrmoborus myotherinus</i> | 354.5 | 1.82 | 2.01 |
| P19-139 | <i>Lepidothrix coronata</i> | 457.5 | 1.85 | 2.17 |
| P19-140 | <i>Myrmotherula hauxwelli</i> | 510.4 | 1.88 | 2.16 |
| P19-141 | <i>Dixiphia pipra</i> | 757.5 | 1.88 | 2.18 |
| P19-142 | <i>Pithys albifrons</i> | 915.9 | 1.88 | 2.44 |
| P19-143 | <i>Microcerculus marginatus</i> | 306.1 | 1.86 | 2.23 |
| P19-144 | <i>Machaeropterus regulus</i> | 459.5 | 1.85 | 2.13 |
| P19-145 | <i>Formicarius colma</i> | 535.8 | 1.83 | 2.13 |
| P19-146 | <i>Automolus infuscatus</i> | 497.6 | 1.84 | 2.13 |
| P19-147 | <i>Epinecrophylla erythrura</i> | 387.6 | 1.76 | 1.92 |
| P19-148 | <i>Pteroglossus pluricinctus</i> | 296.3 | 1.52 | 1.3 |
| P19-149 | <i>Pteroglossus pluricinctus</i> | 476.3 | 1.71 | 1.61 |
| P19-150 | <i>Pteroglossus pluricinctus</i> | 12.1 | 1.82 | 2.14 |
| P19-151 | <i>Mionectes oleagineus</i> | 320.7 | 1.72 | 1.91 |
| P19-153 | <i>Myrmeciza fortis</i> | 554 | 1.91 | 2.11 |
| P19-154 | <i>Pipra erythrocephala</i> | 99.1 | 1.85 | 2.04 |
| P19-155 | <i>Xenops minutus</i> | 142.5 | 1.83 | 2.06 |
| P19-156 | <i>Epinecrophylla haematonata</i> | 225.6 | 1.74 | 1.8 |
| P19-157 | <i>Gynnopithys leucaspis</i> | 1449 | 1.87 | 2.15 |
| P19-158 | <i>Machaeropterus regulus</i> | 462.3 | 1.85 | 2.13 |
| P19-159 | <i>Megastictus margaritatus</i> | 818.2 | 1.73 | 1.87 |
| P19-160 | <i>Megastictus margaritatus</i> | 701.9 | 1.72 | 1.86 |
| P19-162 | <i>Pithys albifrons</i> | 717.6 | 1.84 | 2.51 |
| P19-163 | <i>Dendrocincla merula</i> | 567.5 | 1.64 | 1.65 |
| P19-164 | <i>Megastictus margaritatus</i> | 309.3 | 1.81 | 1.98 |
| P19-165 | <i>Willisornis poecilinotus</i> | 247.2 | 1.77 | 1.88 |
| P19-166 | <i>Hyloctistes subblatus</i> | 430 | 1.74 | 1.64 |
| P19-167 | <i>Thamnonanes caesius</i> | 311 | 1.5 | 1.53 |
| P19-168 | <i>Glyphorhynchus spirurus</i> | 249.7 | 1.8 | 1.93 |
| P19-169 | <i>Schistocichla leucostigma</i> | 409.1 | 1.8 | 2.04 |
| P19-170 | <i>Gynnopithys leucaspis</i> | 515 | 1.54 | 1.58 |
| P19-171 | <i>Guttatus minimus</i> | 270 | 1.73 | 1.77 |
| P19-172 | <i>Myrmoborus myotherinus</i> | 90.3 | 1.89 | 2.06 |
| P19-173 | <i>Thamnonanes ardesiacus</i> | 511.7 | 1.84 | 1.96 |
| P19-174 | <i>Lepidothrix coronata</i> | 1290.6 | 1.76 | 1.87 |
| P19-175 | <i>Myrmoborus myotherinus</i> | 410.9 | 1.87 | 2.02 |
| P19-177 | <i>Lepidothrix coronata</i> | 400.4 | 1.66 | 1.17 |
| P19-178 | <i>Hypocnemis peruviana</i> | 407.4 | 1.81 | 1.94 |
| P19-179 | <i>Hylophylax naevius</i> | 311.2 | 1.88 | 2.12 |
| P19-180 | <i>Mionectes oleagineus</i> | 304.5 | 1.83 | 1.88 |
| P19-181 | <i>Microcerculus marginatus</i> | 317.4 | 1.88 | 2.28 |
| P19-182 | <i>Ramphocelus carbo</i> | 131.6 | 1.9 | 2.25 |

| | | | | |
|---------|----------------------------------|--------|------|------|
| P19-183 | <i>Schistocichla leucostigma</i> | 380.9 | 1.88 | 2.11 |
| P19-184 | <i>Hyloctistes sublatus</i> | 206.2 | 1.79 | 1.94 |
| P19-185 | <i>Lepidothrix coronata</i> | 1397.5 | 1.6 | 1.53 |
| P19-186 | <i>Microcerculus marginatus</i> | 290.1 | 1.85 | 2.2 |
| P19-187 | <i>Mionectes oleagineus</i> | 299.2 | 1.85 | 2.13 |
| P19-188 | <i>Machaeropterus regulus</i> | 745.8 | 1.85 | 2.08 |
| P19-189 | <i>Automolus infuscatus</i> | 406 | 1.52 | 1.79 |
| P19-191 | <i>Cnipodectes subbrunneus</i> | 478 | 1.82 | 1.09 |
| P19-192 | <i>Pithys albifrons</i> | 710.4 | 1.77 | 2.17 |
| P19-193 | <i>Lepidothrix coronata</i> | 1396.9 | 1.85 | 2.11 |
| P19-194 | <i>Myrmothera campanisona</i> | 364.2 | 1.81 | 2.41 |
| P19-195 | <i>Tangara schrankii</i> | 2000.5 | 1.85 | 2.22 |
| P19-196 | <i>Thamnophilus schistaceus</i> | 309.4 | 1.62 | 1.82 |
| P19-197 | <i>Xiphorhynchus guttatus</i> | 499.9 | 1.66 | 1.93 |
| P19-198 | <i>Mynotherula axillaris</i> | 458.1 | 1.75 | 1.83 |
| P19-199 | <i>Lepidothrix coronata</i> | 409.2 | 1.8 | 2.16 |
| P19-200 | <i>Thamnonanes caesius</i> | 368.3 | 1.75 | 1.93 |
| P19-201 | <i>Automolus infuscatus</i> | 369.7 | 1.83 | 2.15 |
| P19-202 | <i>Mionectes oleagineus</i> | 863.9 | 1.87 | 2.42 |
| P19-203 | <i>Lepidothrix coronata</i> | 750.4 | 1.62 | 1.88 |
| P19-204 | <i>Glyphorhynchus spirurus</i> | 1404.9 | 1.88 | 2.37 |
| P19-205 | <i>Lepidothrix coronata</i> | 633.9 | 1.51 | 1.75 |
| P19-206 | <i>Lepidothrix coronata</i> | 353.1 | 1.68 | 2.1 |
| P19-207 | <i>Dendrocincla merula</i> | 867.2 | 1.49 | 1.65 |
| P19-208 | <i>Glyphorhynchus spirurus</i> | 466.7 | 1.86 | 2.48 |
| P19-209 | <i>Glyphorhynchus spirurus</i> | 304.9 | 1.83 | 2.48 |
| P19-210 | <i>Capito auratus</i> | 127.6 | 1.6 | 2.5 |
| P19-211 | <i>Pteroglossus pluricinctus</i> | 314.6 | 1.8 | 2.28 |
| P19-212 | <i>Dendrocincla fuliginosa</i> | 854.5 | 1.78 | 2.21 |
| P19-213 | <i>Dendrocincla merula</i> | 1750.3 | 1.82 | 2.3 |
| P19-214 | <i>Lepidothrix coronata</i> | 145.4 | 1.78 | 2.22 |
| P19-215 | <i>Pipra erythrocephala</i> | 273.6 | 1.84 | 2.5 |
| P19-216 | <i>Selenidera reinwardtii</i> | 1739.4 | 1.81 | 2.12 |
| P19-217 | <i>Thamnonanes caesius</i> | 742.6 | 1.88 | 2.35 |
| P19-219 | <i>Myrmoborus myotherinus</i> | 938.2 | 1.82 | 2.18 |
| P19-220 | <i>Pipra erythrocephala</i> | 660.9 | 1.85 | 2.36 |
| P19-221 | <i>Automolus infuscatus</i> | 92.8 | 0.97 | 0.82 |
| P19-222 | <i>Geotrygon montana</i> | 610.5 | 1.89 | 2.32 |
| P19-223 | <i>Lepidothrix coronata</i> | 499.8 | 1.82 | 2.1 |
| P19-225 | <i>Thamnonanes caesius</i> | 10.5 | 1.61 | 1.3 |
| P19-226 | <i>Glyphorhynchus spirurus</i> | 54.6 | 1.62 | 1.34 |
| P19-227 | <i>Myrmotherula hauxwelli</i> | 144.7 | 0.74 | 0.47 |
| P19-228 | <i>Tachyphonus curinamus</i> | 133.4 | 1.34 | 1.28 |

| | | | | |
|---------|----------------------------------|--------|------|------|
| P19-230 | <i>Pithys albifrons</i> | 21 | 1.09 | 0.95 |
| P19-231 | <i>Willisornis poecilinotus</i> | 453.8 | 1.58 | 1.72 |
| P19-232 | <i>Willisornis poecilinotus</i> | 154.2 | 0.68 | 0.56 |
| P19-233 | <i>Automolus infuscatus</i> | 187 | 1.19 | 1.03 |
| P19-234 | <i>Pithys albifrons</i> | 318.8 | 1.72 | 1.94 |
| P19-235 | <i>Lepidothrix coronata</i> | 106.6 | 1.65 | 1.78 |
| P19-236 | <i>Thamnonanes caesius</i> | 1739.2 | 1.72 | 1.98 |
| P19-237 | <i>Myrmotherula hauxwelli</i> | 2425.9 | 1.75 | 1.95 |
| P19-238 | <i>Thamnonanes caesius</i> | 668.8 | 1.77 | 2.0 |
| P19-239 | <i>Willisornis poecilinotus</i> | 465.5 | 1.88 | 2.2 |
| P19-240 | <i>Lepidothrix coronata</i> | 616.6 | 1.6 | 1.75 |
| P19-241 | <i>Myrmeciza fortis</i> | 1377.2 | 1.61 | 1.67 |
| P19-242 | <i>Geotrygon montana</i> | 154.9 | 1.68 | 1.52 |
| P19-243 | <i>Manacus manacus</i> | 172.6 | 1.85 | 2.1 |
| P19-244 | <i>Mynotherula axillaris</i> | 247.7 | 1.7 | 1.91 |
| P19-245 | <i>Terenotriccus erythrurus</i> | 52.4 | 1.69 | 1.39 |
| P19-247 | <i>Dendrocincla fuliginosa</i> | 42.6 | 1.01 | 0.78 |
| P19-248 | <i>Cnipodectes subbrunneus</i> | 120.8 | 1.74 | 1.6 |
| P19-249 | <i>Thamnophilus schistaceus</i> | 676.6 | 1.86 | 2.25 |
| P19-250 | <i>Nonnula brunnea</i> | 661 | 1.86 | 2.14 |
| P19-251 | <i>Nonnula brunnea</i> | 98.6 | 1.87 | 2.07 |
| P19-252 | <i>Mionectes oleagineus</i> | 232.2 | 1.84 | 2.19 |
| P19-253 | <i>Dendrocincla merula</i> | 974.6 | 1.69 | 1.88 |
| P19-254 | <i>Cyanocompsa cyanoides</i> | 1002.6 | 1.8 | 2.12 |
| P19-255 | <i>Ramphocelus carbo</i> | 995 | 1.69 | 1.96 |
| P19-256 | <i>Myrmoborus myotherinus</i> | 394.4 | 1.86 | 2.02 |
| P19-257 | <i>Schistocichla leucostigma</i> | 209.5 | 1.84 | 2.09 |
| P19-258 | <i>Selenidera reinwardtii</i> | 509.7 | 1.85 | 2.14 |
| P19-260 | <i>Sporophila bouvronides</i> | 179.9 | 1.79 | 2.06 |
| P19-261 | <i>Ramphocelus carbo</i> | 630.8 | 1.77 | 2.01 |
| P19-262 | <i>Lepidothrix coronata</i> | 1033.7 | 1.86 | 2.35 |
| P19-263 | <i>Ramphocelus carbo</i> | 516 | 1.72 | 1.89 |
| P19-264 | <i>Ammodramus aurifrons</i> | 469 | 1.64 | 1.84 |
| P19-265 | <i>Terenotriccus erythrurus</i> | 97.3 | 1.57 | 1.26 |
| P19-266 | <i>Lepidothrix coronata</i> | 232.3 | 1.86 | 2.25 |
| P19-268 | <i>Sporophilan sp.</i> | 1560 | 1.86 | 2.27 |
| P19-270 | <i>Microcerculus marginatus</i> | 92.5 | 1.79 | 1.98 |
| P19-271 | <i>Sporophilan sp.</i> | 1599.1 | 1.82 | 2.24 |
| P19-273 | <i>Glyphorynchus spirurus</i> | 168.6 | 1.84 | 2.21 |
| P19-274 | <i>Tachyphonus curinamus</i> | 209.2 | 1.64 | 1.68 |
| P19-275 | <i>Rhegmatorhina melanostica</i> | 533.3 | 1.64 | 1.84 |
| P19-276 | <i>Platyrinchus saturatus</i> | 1688.4 | 1.72 | 1.9 |

| | | | | |
|---------|----------------------------------|--------|------|-------|
| P19-277 | <i>Myiarchus tuberculifer</i> | 262.5 | 1.82 | 2.17 |
| P19-278 | <i>Myiarchus tuberculifer</i> | 1035.5 | 1.86 | 2.32 |
| P19-279 | <i>Lepidothrix coronata</i> | 110.2 | 1.86 | 2.1 |
| P19-280 | <i>Geotrygon montana</i> | 323.7 | 1.89 | 2.22 |
| P19-281 | <i>Schistocichla leucostigma</i> | 123.4 | 1.85 | 2.14 |
| P19-282 | <i>Geotrygon montana</i> | 867.7 | 1.74 | 2.07 |
| P19-283 | <i>Manacus manacus</i> | 195.8 | 1.72 | 1.85 |
| P19-285 | <i>Sporophila bouvronides</i> | 342.8 | 1.82 | 2.19 |
| P19-286 | <i>Zimmerius gracilipes</i> | 587 | 1.71 | 1.94 |
| P19-289 | <i>Glyphorhynchus spirurus</i> | 90.3 | 1.86 | 2.47 |
| P19-290 | <i>Thryothorus coraya</i> | 302.2 | 1.8 | 2.13 |
| P19-291 | <i>Formicarius colma</i> | 785.8 | 1.82 | 2.19 |
| P19-292 | <i>Thryothorus coraya</i> | 427.6 | 1.76 | 2.06 |
| P19-293 | <i>Pteroglossus azara</i> | 108 | 1.76 | 1.75 |
| P19-294 | <i>Pteroglossus azara</i> | 48.9 | 1.5 | 1.36 |
| P19-295 | <i>Pteroglossus azara</i> | 209.6 | 1.81 | 1.9 |
| P19-296 | <i>Pteroglossus azara</i> | 145.3 | 1.72 | 1.62 |
| P19-297 | <i>Lepidothrix coronata</i> | 376.7 | 1.87 | 2.29 |
| P19-298 | <i>Galbula albirostris</i> | 828.9 | 1.87 | 2.31 |
| P19-299 | <i>Pteroglossus azara</i> | 313.3 | 1.81 | 1.92 |
| P19-300 | <i>Pteroglossus azara</i> | 149.9 | 1.65 | 1.67 |
| P19-303 | <i>Myrmotherula menetriesii</i> | 317.8 | 1.77 | 2.06 |
| P19-304 | <i>Lepidothrix coronata</i> | 963.9 | 1.89 | 2.54 |
| P19-306 | <i>Oryzoborus angolensis</i> | 2254.4 | 1.86 | 2.27 |
| P19-308 | <i>Mionectes oleagineus</i> | 638.6 | 1.8 | 2.22 |
| P19-309 | <i>Manacus manacus</i> | 266.1 | 1.79 | 2.34 |
| P19-310 | <i>Schistocichla leucostigma</i> | 178.5 | 1.74 | 1.96 |
| P19-311 | <i>Habia rubica</i> | 1161.6 | 1.83 | 2.22 |
| P19-312 | <i>Formicarius colma</i> | 1360 | 1.76 | 1.97 |
| P19-314 | <i>Thryothorus coraya</i> | 8.3 | 2.34 | -4.19 |
| P19-315 | <i>Arremon sp.</i> | 2449.1 | 1.85 | 2.23 |

Anexo 9. Prueba de Kruskal Wallis a Protocolos utilizados.

Resumen de contrastes de hipótesis

| Protocolos | Hipótesis nula | Prueba | Sig. | Decisión |
|------------|---|---|-------|-----------------------------|
| 1 | La distribución de Concentración es la misma entre categorías de Tratamiento. | Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes | 0.023 | Rechace la hipótesis nula. |
| 2 | La distribución de Ratio1 es la misma entre categorías de Tratamiento. | Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes | 0.626 | Conserve la hipótesis nula. |
| 3 | La distribución de Ratio2 es la misma entre categorías de Tratamiento. | Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes | 0.295 | Conserve la hipótesis nula. |

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,050.

| Resumen de prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes | |
|---|--------------------|
| N total | 12 |
| Estadístico de prueba | 7,538 ^a |
| Grado de libertad | 2 |
| Sig. asintótica (prueba bilateral) | ,023 |

a. Las estadísticas de prueba se ajustan para empates.

Comparaciones por parejas de Tratamiento

| Sample 1-Sample 2 | Estadístico de prueba | Desv. Error | Desv. Estadístico de prueba | Sig. | Sig. ajustada ^a |
|-------------------|-----------------------|-------------|-----------------------------|------|----------------------------|
| 3-2 | 1,000 | 2,550 | ,392 | ,695 | 1,000 |
| 3-1 | 6,500 | 2,550 | 2,550 | ,011 | ,032 |
| 2-1 | 5,500 | 2,550 | 2,157 | ,031 | ,093 |

Cada fila prueba la hipótesis nula que las distribuciones de la Muestra 1 y la Muestra 2 son iguales.

Se visualizan las significaciones asintóticas (pruebas bilaterales). El nivel de significación es de .05.

a. Los valores de significación se han ajustado mediante la corrección Bonferroni para varias pruebas.