



**UNAP**



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN ECOLOGÍA**  
**AMAZÓNICA**

**TESIS**

**CARACTERIZACIÓN DEL GENOMA APICOPLÁSTICO DE**  
***Plasmodium* sp. CAUSANTE DE MALARIA AVIAR**  
**CUENCA ALTA RÍO ITAYA LORETO**  
**PERÚ**

**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE DOCTORA EN CIENCIAS**  
**CON MENCIÓN EN ECOLOGÍA AMAZÓNICA**

**PRESENTADO POR: LLAQUELI APUELA GUERRA**

**ASESORES: BLGA. MARIANELA COBOS RUÍZ DRA.**  
**BLGO. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ DR.**

**IQUITOS, PERÚ**

**2023**



**UNAP**



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DOCTORADO EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN ECOLOGÍA  
AMAZÓNICA**

**TESIS**

**CARACTERIZACIÓN DEL GENOMA APICOPLÁSTICO DE  
*Plasmodium* sp. CAUSANTE DE MALARIA AVIAR  
CUENCA ALTA RÍO ITAYA LORETO  
PERÚ**

**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE DOCTORA EN CIENCIAS  
CON MENCIÓN EN ECOLOGÍA AMAZÓNICA**

**PRESENTADO POR: LLAQUELI APUELA GUERRA**

**ASESORES: BLGA. MARIANELA COBOS RUÍZ DRA.  
BLGO. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ DR.**

**IQUITOS, PERÚ**

**2023**



**UNAP**

Escuela de Postgrado  
"Oficina de Asuntos  
Académicos de la Amazonía"



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS  
N°160-2023-OAA-EPG-UNAP**

En Iquitos, en el auditorio de la Escuela de Postgrado (EPG) de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP), a los siete días del mes de diciembre de 2023 a horas 10:00 a.m., se dio inicio a la sustentación de la tesis denominada "CARACTERIZACIÓN DEL GENOMA APICOPLÁSTICO DE *Plasmodium sp. CAUSANTE DE MALARIA AVIAR CUENCA ALTA RIO ITAYA LORETO PERÚ*", aprobado con Resolución Directoral N°1525-2023-EPG-UNAP, presentado por la egresada **LLAQUELI APUELA GUERRA**, para optar el **Grado Académico de Doctora en Ciencias con mención en Ecología Amazónica**, que otorga la UNAP de acuerdo a la Ley Universitaria 30220 y el Estatuto de la UNAP.

El jurado calificador designado mediante Resolución Directoral N°1386-2023-EPG-UNAP, está conformado por los profesionales siguientes:

Blgo. Roberto Pezo Díaz, Dr.	(Presidente)
Blgo. Jorge Luis Marapara del Águila, Dr.	(Miembro)
Blgo. Rommel Roberto Rojas Zamora, Dr.	(Miembro)

Después de haber escuchado la sustentación y luego de formuladas las preguntas, éstas fueron respondidas: salifactoriamente

Finalizado la evaluación; se invitó al público presente y a la sustentante abandonar el recinto; y, luego de una amplia deliberación por parte del jurado, se llegó al resultado siguiente:

La sustentación pública y la tesis han sido: aprobado con calificación Buena.

A continuación, el Presidente del Jurado da por concluida la sustentación, siendo las 11:15 del siete de diciembre de 2023; con lo cual, se le declara a la sustentante apta para recibir el **Grado Académico de Doctora en Ciencias con mención en Ecología Amazónica**.

Blgo. Roberto Pezo Díaz, Dr.  
Presidente

Blgo. Jorge Luis Marapara del Águila, Dr.  
Miembro

Blgo. Rommel Roberto Rojas Zamora, Dr.  
Miembro

Blga. Mariana Cebos Ruiz, Dra.  
Asesora

Blgo. Juan Carlos Castro Gómez, Dr.  
Asesor



TESIS APROBADA EN SUSTENTACIÓN PÚBLICA EL DÍA 07 DE DICIEMBRE DE 2023 EN EL AUDITORIO DE LA ESCUELA DE POSTGRADO DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA, EN LA CIUDAD DE IQUITOS-PERÚ.



---

BLGO. ROBERTO PEZO DÍAZ, DR.  
PRESIDENTE



---

BLGO. JORGE LUIS MARAPARA DEL AGUILA, DR.  
MIEMBRO



---

BLGO. ROMMEL ROBERTO ROJAS ZAMORA, DR.  
MIEMBRO



---

BLGA. MARIANELA COBOS RUIZ, DRA.  
ASESORA



---

BLGO. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ, DR.  
ASESOR

NOMBRE DEL TRABAJO

**EPG\_DOCTORADO\_TESIS\_APUELA GUERRA.pdf**

AUTOR

**LLAQUELI APUELA GUERRA**

RECuento de palabras

**10984 Words**

Recuento de caracteres

**59747 Characters**

Recuento de páginas

**41 Pages**

Tamaño del archivo

**1.4MB**

Fecha de entrega

**Jul 10, 2023 10:23 AM GMT-5**

Fecha del informe

**Jul 10, 2023 10:24 AM GMT-5**

● **10% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos

- 10% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 4% Base de datos de trabajos entregados
- 1% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

● **Excluir del Reporte de Similitud**

- Material bibliográfico
- Coincidencia baja (menos de 10 palabras)

*A Juan Imerio y Mariana Dalila;  
con amor. A María Virgilia Guerra  
Maynas; con infinita gratitud.*

## AGRADECIMIENTO

- A Jehová Dios, por la fortaleza de su espíritu en mi ser.
- A la Dra. Marianela Cobos Ruiz y al Dr. Juan Carlos Castro Gómez, asesores de la presente tesis, por su apoyo y orientación durante el proceso de ejecución del trabajo de investigación.
- A los docentes de la Escuela de Post Grado de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana del Programa de Doctorado en Ciencias con mención en Ecología Amazónica, que impartieron conocimientos y experiencias, durante mi formación profesional.
- A tod@s mis compañer@s del Doctorado en Ciencias con mención en Ecología Amazónica – Promoción II-2019; especialmente a María Elena Bendayán, Hilda Soplín, Gladis Atías, Rosana Gonzáles, Magaly García, Carlos Dávila, Luis García, Pablo Puertas, Alberto Bazán y César Delgado.
- A la Universidad Científica del Perú, Universidad Nacional de la Amazonía Peruana y al Museo de Historia Natural de Chicago por la oportunidad que me brindaron en la ejecución de la presente tesis.
- 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- Convenio 044 – 2019-FONDECYT-BM-INC-INV.
- Al Ph.D. Joseph Dylan Maddox, investigador de Pritzker Laboratory for Molecular Systematics and Evolution, Museo de Historia Natural del Chicago.
- A Paula Alessandra Gálvez; tesista también del proyecto, por su apoyo y colaboración.
- A Milagros Costa, Koseth Marianela Bardales y Marianela Cobos; por ayudarme a conservar una amistad desde hace muchos años y también por ser mujeres profesionales ejemplares.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Páginas
Carátula	i
Contracarátula	ii
Acta de sustentación	iii
Jurados	iv
Resultado del Informe de similitud	v
Dedicatoria	vi
Agradecimiento	vii
Índice de contenidos	viii
Indice de tablas	x
Índice de figuras	xi
Resumen	xii
Abstract	xiii
Resumo	xiv
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO</b>	<b>3</b>
1.1. Antecedentes	3
1.2. Bases teóricas	11
1.3. Definición de términos básicos	18
<b>CAPÍTULO II: VARIABLES E HIPÓTESIS</b>	<b>22</b>
2.1. Variables y su operacionalización	22
2.2. Formulación de la hipótesis	23
<b>CAPÍTULO III: METODOLOGÍA</b>	<b>24</b>
3.1. Tipo y diseño de la investigación	24
3.2. Población y muestra	24
3.3. Técnicas e instrumentos	25
3.4. Procedimientos de recolección de datos	27
3.5. Técnicas de procesamiento y análisis de datos	28
3.6. Aspectos éticos	28
<b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS</b>	<b>30</b>
<b>CAPÍTULO V: DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS</b>	<b>34</b>
<b>CAPÍTULO VI: PROPUESTA</b>	<b>37</b>
<b>CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES</b>	<b>39</b>
<b>CAPÍTULO VIII: RECOMENDACIONES</b>	<b>40</b>
<b>CAPÍTULO IX: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>41</b>



## **ANEXOS**

1. Permiso aprobado con RDG. N° D000266-2021-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS; que autoriza la colecta de muestras de sangre de aves.
2. Captura de aves.
3. Toma de muestras de sangre de aves
4. Procedimientos para purificación de ADN de muestras de sangre de aves.
5. Características de los genomas apicoplásticos de diferentes especies de apicomplejos depositados en el GenBank.
6. Lista de aves capturadas
7. Matriz de consistencia.
8. Tabla de operacionalización de la variable.

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Páginas</b>
<b>Tabla N° 1.</b> Lista de genes identificados en el genoma apicoplástico de <i>Plasmodium</i> sp. causante de malaria aviar en la cuenca alta del río Itaya.	32

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Páginas</b>
<b>Figura N° 1.</b> Ciclo de vida de malaria aviar.	14
<b>Figura N° 2.</b> Diagrama de tipo y diseño de investigación.	24
<b>Figura N° 3.</b> Tamaño y organización estructural del genoma apicoplástico secuenciado, ensamblado y anotado de <i>Plasmodium</i> sp. de malaria aviar en la cuenca alta del río Itaya.	30
<b>Figura N° 4.</b> Genes presentes en el genoma apicoplástico secuenciado, ensamblado y anotado de <i>Plasmodium</i> sp. causante de malaria aviar en la cuenca alta del río Itaya.	31
<b>Figura N° 5.</b> Relación filogenética basada en la secuencia completa del gen ribosomal 28S del genoma apicoplástico del <i>Plasmodium</i> sp. causante de malaria aviar en la cuenca alta del río Itaya y otras especies de parásitos del grupo de apicomplejos.	33

## RESUMEN

El presente estudio se desarrolló entre el 2020 y 2021 en el área de Concesión de la Universidad Científica del Perú-UCP, en la cuenca alta del río Itaya, en los laboratorios de Biotecnología y Bioenergética de la misma y el Centro de Investigación de Recursos Naturales de la Amazonía Peruana – CIRNA (UNAP) respectivamente. Es preciso señalar que las investigaciones sobre malaria aviar indican que algunas especies de parásitos apicomplejos causantes de esta enfermedad son invasoras y son responsables de la pérdida de la diversidad de la avifauna en todo el mundo. El control de estas parasitosis ha sido limitado, en parte a la falta del conocimiento básico a nivel molecular, toda vez que los recursos genómicos de estos parásitos son muy limitados. Para ayudar a cubrir estos vacíos en el conocimiento, el principal objetivo de esta investigación fue caracterizar el genoma apicoplástico de *Plasmodium* sp. causante de malaria aviar en la cuenca alta del río Itaya Loreto Perú. Para ello, se purificó el ADN genómico a partir de muestras de sangre de aves infectadas. Posteriormente, se prepararon y secuenciaron las librerías de ADN con tecnología de última generación (next seq 550). Las secuencias obtenidas fueron ensambladas y anotadas funcionalmente con varias herramientas bioinformáticas para obtener el genoma apicoplástico. Los resultados mostraron que el genoma ensamblado y anotado tiene forma circular, es compacto, su tamaño es de 29,36 kb y presenta un alto contenido de A+T (86,9%). Asimismo, se han identificado 56 genes con una distribución típica de apicomplejos del género *Plasmodium*, la mayoría de ellos participan en la síntesis de ARN y de proteínas. Finalmente, de acuerdo a los análisis filogenéticos, el parásito estudiado pertenece a la especie *Plasmodium relictum*, uno de los principales causantes de malaria aviar en la amazonia peruana y varias regiones del Perú. En conclusión, se ha logrado ensamblar y anotar funcionalmente el genoma apicolástico de un parásito apicomplejo del género *Plasmodium* que causa malaria en aves de la cuenca alta del río Itaya.

**Palabras clave:** Apicomplejos, apicoplasto, genes, genómica, malaria aviar, secuenciamiento de ADN.

## ABSTRACT

The present study was carried out between 2020 and 2021 in the Concession area of the Scientific University of Peru-UCP, in the upper basin of the Itaya river, in its Biotechnology and Bioenergetics laboratories and the Natural Resources Research Center of the Peruvian Amazon – CIRNA (UNAP) respectively. It should be noted that research on avian malaria indicates that some species of apicomplex parasites that cause this disease are invasive and are responsible for the loss of bird diversity worldwide. Control of these parasites has been limited, partly due to the lack of basic knowledge at the molecular level, since the genomic resources of these parasites are very limited. To help fill these knowledge gaps, the main objective of this research was to characterize the apicoplastic genome of *Plasmodium* sp. cause of avian malaria in the upper basin of the river Itaya Loreto Peru. To do this, genomic DNA was purified from blood samples of infected birds. Subsequently, the DNA libraries were prepared and sequenced with state-of-the-art technology (next seq 550). The obtained sequences were assembled and functionally annotated with several bioinformatic tools to obtain the apicoplastic genome. The results showed that the assembled and annotated genome is circular in shape, compact, 29.36 kb in size, and has a high A+T content (86.9%). Likewise, 56 genes with a typical distribution of apicomplexes of the genus *Plasmodium* have been identified, most of them participate in the synthesis of RNA and proteins. Finally, according to phylogenetic analyses, the parasite studied belongs to the *Plasmodium relictum* species, one of the main causes of avian malaria in the Peruvian Amazon and several regions of Peru. In conclusion, it has been possible to assemble and functionally annotate the apicholastic genome of an apicomplex parasite of the genus *Plasmodium* that causes malaria in birds from the upper Itaya river basin.

**Keywords:** Apicomplexes, apicoplast, genes, genomics, avian malaria, DNA sequencing.

## RESUMO

O presente estudo foi realizado entre 2020 e 2021 na área de Concessão da Universidade Científica do Peru-UCP, na bacia superior do rio Itaya, em seus laboratórios de Biotecnologia e Bioenergética e no Centro de Pesquisa de Recursos Naturais do Peru. Amazônia – CIRNA (UNAP), respectivamente. As pesquisas sobre a malária aviária indicam que algumas espécies de parasitas apicomplexos que causam a doença são invasivas e são responsáveis pela perda da diversidade de aves em todo o mundo. O controle desses parasitas tem sido limitado, em parte devido à falta de conhecimento básico em nível molecular, uma vez que os recursos genômicos desses parasitas são muito limitados. Para ajudar a preencher essas lacunas de conhecimento, o objetivo principal desta pesquisa foi caracterizar o genoma apicoplástico de *Plasmodium* sp. causa da malária aviária na bacia alta do rio Itaya Loreto Peru. O DNA genômico foi purificado a partir de amostras de sangue de aves infectadas. Posteriormente, as bibliotecas de DNA foram preparadas e sequenciadas com tecnologia de ponta (next seq 550). As sequências obtidas foram montadas e anotadas funcionalmente com diversas ferramentas de bioinformática para obtenção do genoma apicoplástico. Os resultados mostraram que o genoma montado e anotado é circular, compacto, com tamanho de 29,36 kb e alto teor de A+T (86,9%). Da mesma forma, foram identificados 56 genes com distribuição típica de apicomplexos do gênero *Plasmodium*, a maioria deles participa da síntese de RNA e proteínas. Finalmente, de acordo com análises filogenéticas, o parasita estudado pertence à espécie *Plasmodium relictum*, uma das principais causas da malária aviária na Amazônia peruana e em várias regiões do Peru. Em conclusão, foi possível montar e anotar funcionalmente o genoma apicolástico de um parasita apicomplexo do gênero *Plasmodium*, causador da malária em aves da bacia do alto rio Itaya.

**Palavras-chave:** Apicomplexos, apicoplasto, genes, genômica, malária aviária, sequenciamento de DNA.

## INTRODUCCIÓN

La conservación de la megabiodiversidad de la amazonía peruana conlleva a tratar múltiples aspectos tales como; culturales, científicos, tecnológicos y ambientales, a fin de garantizar su existencia en las próximas generaciones. Diversos estudios sobre aves y específicamente relacionados a malaria aviar indican que algunas especies de parásitos de la malaria aviar son invasoras y responsables de la pérdida de diversidad en todo el mundo <sup>(1-3)</sup>. Así mismo nos ayudan a comprender el impacto de las actividades humanas sobre el ambiente natural que nos rodea. Además, indica la calidad ambiental en una región.

En ese contexto, en los últimos años, se han secuenciado ampliamente los genomas aviáres, por ejemplo, actualmente existe un proyecto donde se están secuenciando 10 000 especies de aves <sup>(4)</sup>. Sin embargo, a la fecha solo se han secuenciado tres genomas de parásitos que causan malaria aviar, a pesar de que se han identificado > 3100 linajes únicos. Esta disparidad existe debido a la dificultad de separar las células del parásito del huésped. El genoma de las aves es aproximadamente 50 veces más grande que el de los parásitos de la malaria y debido a que la parasitemia es con frecuencia <0.01% y los glóbulos rojos de las aves están nucleados, las extracciones de ADN están compuestas casi en su totalidad por el huésped. Lo cual significa que, a partir de estas muestras, se necesitarían unos 98 mil millones de lecturas de Illumina para secuenciar un genoma único con una cobertura de 20x <sup>(4)</sup>. Sin embargo, el método utilizado para identificar linajes de parásitos durante los últimos 20 años sigue siendo el mismo. En consecuencia, nuestra capacidad para delimitar especies, construir filogenias robustas, documentar distribuciones espaciales de especies y determinar eventos de cambio de huésped es limitada.

Por tanto, la falta de recursos genómicos es significativa por varias razones. Primero, la mayoría de los estudios filogenéticos de la malaria aviar han usado el mismo gen Citocromo b (Cyt) usado para el código de barras para construir filogenias, aunque su poder para resolver tales relaciones es limitado. Por ejemplo, se describieron linajes casi idénticos basados en haplotipos de Cyt b como especies diferentes cuando solo se incorporaron 7 loci nucleares en el

análisis <sup>(5,6)</sup>. En segundo lugar, sabemos muy poco sobre cómo la diversidad de Cyt b es indicativa de la diversidad de todo el genoma. Por lo tanto, los patrones de diversificación descritos basados en Cyt b pueden no describir con precisión los patrones de todo el genoma. Tercero, los genomas ensamblados y anotados proporcionan información valiosa para los estudios de expresión génica, porque los ensamblajes de transcriptoma de *novo* son intrínsecamente más complicados de construir cuando los genomas de referencia tanto del huésped como de los parásitos relacionados son inexistentes. Cuarto, los genomas de alta calidad permiten que otros estudios realicen escaneos genómicos completos de baja cobertura de numerosas muestras. Finalmente, las tecnologías de vanguardia son difíciles de aplicar cuando no hay suficientes recursos genómicos disponibles.

Por los motivos expuestos, planteamos la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuáles son las características del genoma apicoplástico de *Plasmodium sp.* causante de malaria aviar en la cuenca alta del río Itaya, Loreto-Perú?

Por tal razón, para el desarrollo de la investigación se ha considerado determinar los siguientes objetivos: Caracterizar el genoma apicoplástico de *Plasmodium sp.* causante de malaria en aves de la amazonía peruana. Obtener las secuencias del genoma apicoplástico de *Plasmodium sp.* causante de malaria en aves de la amazonía peruana y ensamblar y anotar el genoma apicoplástico de *Plasmodium sp.* causante de malaria en aves de la amazonía peruana.



## CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

### 1.1. Antecedentes

En el 2000, se realizó un estudio sobre especificidad del huésped en parásitos sanguíneos aviarios: Un estudio de ADN mitocondrial de *Plasmodium* y *Haemoproteus* amplificado de aves; en el que se señala que se amplificó un fragmento del gen del citocromo b mitocondrial de la malaria aviar (géneros *Haemoproteus* y *Plasmodium*) a partir de muestras de sangre de 12 especies de aves paseriformes de los géneros *Acrocephalus*, *Phylloscopus* y *Parus*. Al secuenciar 478 nucleótidos de los fragmentos obtenidos, encontramos 17 haplotipos mitocondriales diferentes de *Haemoproteus* o *Plasmodium* entre las 12 especies de aves investigadas. Solo uno de los 17 haplotipos se encontró en más de una especie hospedadora, siendo esta excepción un haplotipo detectado tanto en herrerillos (*Parus caeruleus*) como en carboneros (*Parus major*). El árbol filogenético que se construyó agrupó las secuencias en dos clados, probablemente representando a *Haemoproteus* y *Plasmodium*, respectivamente. Encontraron de dos a cuatro haplotipos de ADN mitocondrial (ADNmt) de parásitos diferentes en cuatro especies de aves. El árbol filogenético obtenido a partir del mtDNA de los parásitos coincidía mal con el árbol filogenético del ave hospedante. Por ejemplo, las dos especies de herrerillos y la curruca del sauce (*Phylloscopus trochilus*) portaban parásitos que diferían en solo un 0,6% de divergencia de secuencia, lo que sugiere que *Haemoproteus* cambia tanto entre especies dentro del mismo género como entre especies de diferentes familias. Por lo tanto, los cambios de hospedador parecen haber ocurrido repetidamente en este sistema parásito-hospedador <sup>(7)</sup>.

En el 2001, se realizó estudios sobre el paludismo en la era posgenómica en el que se señalan sobre análisis del genoma de *Plasmodium falciparum* que se han identificado en total 424 genes codificadores de proteínas predichos y 3 genes de ARNt en los cromosomas 2 y 3, los dos cromosomas cuya secuencia se ha

completado <sup>(8,9)</sup>. Aproximadamente, el 37% (158) de esos genes poseen un homólogo fácilmente identificable en otras especies. Esta similitud permite suponer una función y, efectivamente, muchos de los genes identificados participan en el metabolismo del parásito. Al comparar las secuencias codificadoras de proteínas predichas con sus homólogas de otras especies, resulta interesante comprobar que la mayoría de las proteínas de *P. falciparum* presentan inserciones de secuencias de baja complejidad, a menudo series de un mismo aminoácido (generalmente asparagina, lisina o ácido glutámico), o repeticiones en tándem de la secuencia correspondiente a un péptido corto. Se habían identificado con anterioridad ejemplos de este tipo de regiones, que muestran polimorfismo entre los distintos aislamientos del parásito <sup>(10)</sup>.

Según la revisión de parasitología ecológica de 2009, en la era de la genética molecular, el estudio de la ecología de las relaciones parásito-huésped se ha beneficiado hace poco del uso de procedimientos moleculares para hacer un diagnóstico y detectar parásitos. Estas técnicas, fundamentadas en la amplificación y secuenciación de un fragmento de ADN del parásito, no solo simplifican de enorme manera el descubrimiento de la infección, sino que abren un nuevo campo de exploración sobre la diversidad de estos parásitos, por lo general crípticos, su prevalencia y modelos de divergencia evolutiva o sus propiedades ecológicas. Este procedimiento dio impulso a la parasitología ecológica, que creció exponencialmente en la más reciente década por medio de la tecnología molecular <sup>(11)</sup>.

Un estudio de 2014 sobre anomalías de salud en tres sitios de anidación de loros australianos (*Melopsittacus undulatus*) en Nueva Zelanda confirmó una notable continuidad entre un poliovirus único y la infección por malaria aviar. Se tomaron muestras de sangre de 90 loros vivos de tres sitios de reproducción en la Isla Norte de Nueva Zelanda. Usando un procedimiento de PCR anidado que amplifica el gen VP1 para la principal proteína de la cápside del poliomavirus, los investigadores estimaron una consistencia general del 22%. El examen filogenético del

gen VP1 mostró un exclusivo aislado de poliomavirus con un 32% de divergencia de secuencia en relación a cepas antes asociadas con la patología de periquito y un 33% de divergencia en relación a un aislado de pinzón neozelandés descrito hace poco. Todos los periquitos brindaron negativo en las pruebas de descubrimiento de la patología del pico y las plumas, y la PCR mostró una continuidad global del 30% de malaria aviar. La secuenciación señaló la presencia de cepas recurrentes de paludismo, de esta forma como de una cepa de *Plasmodium relictum* probablemente dañina. El estudio llegó a la conclusión que el poliomavirus aviar y el paludismo aviar estaban presentes en periquitos australianos superiores en Nueva Zelanda, lo que pone de relieve la necesidad de llevar a cabo más indagaciones para entender si estos patógenos presentes en localidades de aves cautivas suponen una amenaza para las especies endémicas y la fauna aviar amenazada de Nueva Zelanda, y si se requieren métodos de prevención y control <sup>(12)</sup>.

Según una investigación de 2014 titulada "Identificación molecular de genes de quitinasa en *Plasmodium relictum*", los parásitos de la malaria necesitan quitinasa para atravesar la membrana peritrófica, que se forma alrededor del intestino medio del mosquito, con el fin de completar su ciclo vital. El gen de la quitinasa se encuentra en copia grande o corta en las especies de malaria de los mamíferos. *Plasmodium gallinaceum*, un parásito de la malaria aviar, tiene ambas copias, lo que implica que una duplicación del gen en el ancestro de estas especies existentes antes de la pérdida de la copia larga o corta en los parásitos *Plasmodium* de mamíferos. *Plasmodium gallinaceum* no es el parásito aviar más común ni el más peligroso. Ésta es la primera investigación que busca y localiza el gen de la quitinasa en *Plasmodium relictum*, uno de los parásitos de la malaria aviar más comunes. Para ello, se diseñaron cebadores utilizando ambas copias de la quitinasa de *P. gallinaceum* como secuencias de referencia. El árbol filogenético del gen de la quitinasa se construyó utilizando varios genomas de *Plasmodium* spp. El gen de la quitinasa se descubrió en aislados de *P. relictum* de dos linajes

mitocondriales (SGS1 y GRW4). Estos dos linajes tienen quitinasa tanto larga (PrCHT1) como corta (PrCHT2). Las variaciones genéticas descubiertas entre SGS1 y GRW4 en la copia larga del gen de la quitinasa fueron superiores a la diferencia encontrada en el gen del citocromo b. Por último, el descubrimiento de ambas copias en *P. relictum* aporta información sobre la conexión evolutiva del gen de la quitinasa de *Plasmodium*. El gen de la quitinasa, debido a su gran diversidad, podría emplearse para analizar la estructura genética de poblaciones en aislados de diversas especies hospedadoras y zonas geográficas <sup>(13)</sup>.

En el 2015, se llevó a cabo una investigación sobre la malaria aviar invasora como enfermedad parasitaria emergente en aves nativas peruanas, indicando que algunas especies de parásitos de la malaria aviar son invasoras y responsables de la pérdida de biodiversidad mundial. Una investigación sobre la incidencia y las características genéticas de la malaria aviar y los parásitos hemosporidianos asociados en aves neotropicales de dos lugares distintos de Perú halló una prevalencia global del 32,4%, con 12 especies de aves afectadas. *Plasmodium relictum* SGS1 fue el parásito más común en ambos sitios, infectando a 8 especies hospedadoras. Hasta donde sabemos, la primera aparición de un virus invasor en las Américas, lo que supone una amenaza para más de un tercio de todas las especies de aves del mundo <sup>(14)</sup>.

En el 2017, se realizó un estudio sobre caracterización molecular y distribución de *Plasmodium matutinum*, un parásito común de la malaria aviar en el que se indica que las especies de *Plasmodium* (*Plasmodiidae*, *Haemosporidae*), indica que éstas están muy extendidas y causan paludismo, que puede ser grave en los huéspedes aviares. Los marcadores moleculares son esenciales para detectar e identificar parásitos, pero aún están ausentes para muchas especies de paludismo aviar y especies de hemosporidias relacionadas. Aquí, proporcionamos la primera caracterización molecular de *Plasmodium matutinum*, un

agente común de la malaria aviar. Este parásito se aisló de un ruiseñor *Luscinia luscinia* (*Muscicapidae*) infectado naturalmente. Se obtuvieron fragmentos de genomas mitocondriales, apicoplasto y nuclear. Los canarios domésticos *Serinus canaria* fueron susceptibles después de la inoculación de sangre infectada y la parasitemia leve de larga duración se desarrolló en dos aves expuestas. No se informaron signos clínicos de enfermedad. Se proporcionan ilustraciones de los estadios sanguíneos de *P. matutinum* (pLINN1), y el análisis filogenético identificó las especies de *Plasmodium* aviar estrechamente relacionadas. La filogenia basada en secuencias parciales del citocromo b (cyt b) sugiere que este parásito está más estrechamente relacionado con *Plasmodium tejerai* (linaje cyt b pSPMAG01), un parásito común de la malaria en las aves americanas. Ambos parásitos pertenecen al subgénero *Haemamoeba* y sus estadios sanguíneos son similares morfológicamente, particularmente debido a la marcada *vacuolización* del citoplasma en merontes eritrocíticos en crecimiento. Los datos moleculares muestran que la transmisión de *P. matutinum* (pLINN1) ocurre ampliamente en el holártico, y es probable que el parásito tenga una distribución cosmopolita <sup>(15)</sup>.

En el 2018, se realizó un estudio sobre los genomas completos del parásito de la malaria aviar en el que se revelan características asociadas con la evolución específica del linaje en aves y mamíferos en el que se señala que los parásitos de la malaria aviar prevalecen en todo el mundo e infectan a una amplia diversidad de especies de aves. En este estudio se realizó la secuenciación y el análisis de secuencias genómicas preliminares de alta calidad para dos especies de malaria aviar, *Plasmodium relictum* y *Plasmodium gallinaceum*. Identificándose 50 genes que son específicos de la malaria aviar, ubicados en un núcleo conservado del genoma que comparte la sintenia de genes. Con todos los demás genomas de malaria secuenciados. El análisis filogenético sugiere que las especies de malaria aviar forman un grupo externo a las especies de *Plasmodium* de mamíferos, y utilizando la divergencia de aminoácidos entre especies, estimamos que los linajes - infecciosos de

aves y mamíferos divergieron en el orden de hace 10 millones de años. De acuerdo con su posición filogenética, identificamos ortólogos de genes que previamente parecían estar restringidos a los clados de parásitos que contienen *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*, las especies con mayor impacto en la salud humana. A partir de estos ortólogos, exploramos la selección de diversificación diferencial en todo el género y mostramos que el linaje aviar es notable en la medida en que evolucionan los genes relacionados con la invasión. Los subtelómeros de los genomas de *P. relictum* y *P. gallinaceum* contienen varias familias de genes novedosos, incluida una familia multigénica de surf ampliada. También identificamos una expansión de homólogos de proteínas de unión a reticulocitos en *P. relictum*, y dentro de estas proteínas, detectamos distintas regiones que son específicas de los huéspedes de primates no humanos, humanos, roedores y aves. Por primera vez en el linaje de *Plasmodium*, encontramos evidencia de elementos transponibles, incluidos varios cientos de fragmentos de retrotransposones LTR en ambas especies y un retrotransposón LTR aparentemente completo en el genoma de *P. gallinaceum* <sup>(16)</sup>.

En el 2022, se realizó un estudio sobre captura de secuencia genómica de *Plasmodium relictum* en aves infectadas experimentalmente, en el que se señala que la secuenciación de genomas de parásitos en presencia de ADN del huésped es un desafío. Por tal razón, en este estudio se describió un conjunto de sondas de captura de secuencia diseñadas para apuntar a 1035 genes (c. 2.5 Mbp) del parásito hemosporidiano aviar distribuido globalmente, *Plasmodium relictum*. El mismo que ha demostrado que el éxito de la secuenciación depende de la parasitemia. Es decir que el éxito de la secuenciación fue bajo para las aves con niveles bajos de parasitemia (< 1 % de glóbulos rojos infectados) y alto para las aves con niveles más altos de parasitemia. *Plasmodium relictum* se compone de múltiples linajes definidos por su haplotipo de ADN mitocondrial, incluidos tres que están muy extendidos (SGS1, GRW11 y GRW4); las sondas aislaron con éxito el ADN de los tres. Además, utilizaron datos de 25 genes para describir la variación

genética tanto entre como dentro del linaje. Por ejemplo, dos muestras de SGS1 aisladas de diferentes especies huésped diferían en 11 sustituciones entre esos 25 genes. Lo que llevó a la conclusión que el enfoque de captura de secuencias que describimos permitirá la generación de datos genómicos que contribuirán a nuestra comprensión de la estructura genética de la población y la historia evolutiva de *P. relictum*, un generalista huésped extremo y un parásito generalizado <sup>(17)</sup>.

En tal sentido, en estudios recientes han informado de secuencias de ADN de parásitos de la malaria aviar, lo que indica una rica diversidad genética y la posible existencia de muchas especies no descritas. Sin embargo, la mayoría de los linajes de *Plasmodium* reportados permanecen sin identificar a nivel de especie, y la caracterización molecular no está disponible para la mayoría de los parásitos de *Plasmodium* descritos. Durante los últimos 15 años, numerosos nuevos - *Plasmodium* se han descrito. Sin embargo, las claves para su identificación no están disponibles o están incompletas. La identificación de los parásitos de la malaria aviar sigue siendo una tarea difícil incluso para los expertos, y esto impide el desarrollo de la malariología aviar, particularmente en la vida silvestre. Este estudio muestra que 55 especies descritas de *Plasmodium* aviar pueden identificarse fácilmente utilizando características morfológicas de sus estadios sanguíneos. Estos fueron incorporados en las claves <sup>(18)</sup>.

En cuanto a la caracterización de *Plasmodium relictum*, un agente cosmopolita de la malaria aviar se puede mencionar que, dentro del amplio espectro de huéspedes vertebrados, mosquitos vectores y condiciones ecológicas, diferentes linajes de *P. relictum* exhiben formas morfológicas marcadamente variables e indistinguibles. Los parásitos de los mismos linajes a menudo se desarrollan de manera diferente en diferentes especies de aves. Más aún, la variación de las propiedades biológicas (dinámica de la parasitemia, patología sanguínea, período prepatente) en diferentes aislamientos del mismo linaje podría ser mayor

que la variación en diferentes linajes durante el desarrollo en la misma especie de aves, lo que indica un valor taxonómico insignificante de tales características. La información de linaje disponible es excelente para el diagnóstico de parásitos, pero es limitada en las predicciones sobre las relaciones en ciertas asociaciones huésped-parásito. Una combinación de experimentos, observaciones de campo, diagnósticos microscópicos y moleculares es esencial para comprender el papel de los diferentes linajes de *P. relictum* en la salud de las aves <sup>(19)</sup>.

Las aves autóctonas superaron en número a las no autóctonas en un estudio <sup>(20)</sup>. Las aves nativas infectadas tenían un 95 % de parasitemia por eritrocitos circulantes, un 16 % de anemia aguda, una rápida disminución de la condición corporal y una mortalidad del 40 % al 100 % dentro de los 5 y 15 días de exposición <sup>(21)</sup>. También encontraron que las infecciones por el virus de la malaria y la viruela eran más comunes de lo esperado. Debido a que el virus de la viruela se transmite a través del mismo vector, los patrones de transmisión altitudinal son comparables, a pesar de su menor prevalencia <sup>(20)</sup>.

La investigación microscópica ha demostrado que *Plasmodium relictum* es el agente más común de la malaria aviar. Estudios moleculares recientes confirmaron esta conclusión e identificaron varios linajes de mtDNA, lo que sugiere la existencia de una variación genética significativa intraespecie o especiación críptica. La mayoría de los linajes identificados tienen una amplia gama de huéspedes y distribución geográfica <sup>(22)</sup>.

Recientes estudios, señalan un incremento en la prevalencia de infección por malaria en aves, especialmente en África y Europa, debido al cambio global, al cambio climático, a la alteración del hábitat natural entre otros factores. Los mismos que afectaron directamente a la ecología de diferentes enfermedades, muchas de ellas causadas por patógenos transmitidos por vectores, alterando las intensidades de las interacciones vector-hospedador, vector-patógeno o patógeno-



hospedador. Los parásitos de la malaria aviar, tienen efectos adversos sobre el estado de salud, éxito reproductor y probabilidad de supervivencia de las aves silvestres y causan infecciones crónicas. Por lo que la biodiversidad, entendida como riqueza de especies (número de especies diferentes en una localidad), puede jugar un papel fundamental en el control de las epidemias, reduciendo la circulación de patógenos; esta afirmación generó un gran debate sobre la importancia de la biodiversidad en el funcionamiento de los ecosistemas. Sin embargo, modelos teóricos recientes sugieren que una mayor biodiversidad de hospedadores puede producir tanto un efecto de dilución (disminución del riesgo de transmisión a humanos u otros organismos focales) como un efecto de amplificación (aumentando el riesgo de transmisión) dependiendo de las características de los patógenos, los reservorios y el comportamiento de los vectores <sup>(23)</sup>.

## **1.2. Bases teóricas**

La propagación de enfermedades infecciosas en humanos y fauna salvaje es uno de los efectos de la acción humana y el cambio global. Las consecuencias negativas de los patógenos pueden ser graves, diezmar las poblaciones naturales y, posiblemente, desencadenar la extinción de especies. Por ello, es fundamental conocer mejor los procesos y estrategias que utilizan estos agentes a lo largo de su ciclo vital, así como las respuestas inmunológicas y metabólicas que muestran sus huéspedes naturales durante la interacción huésped-patógeno.

Ahora sabemos algo más sobre las cascadas bioquímicas y las respuestas inmunológicas que se producen durante la interacción huésped-patógeno gracias a la llegada de enfoques moleculares como la genómica y el análisis del transcriptoma <sup>(24)</sup>.

Los parásitos haemospóridios, entre los que se encuentra el parásito del paludismo aviar, constituyen un sistema huésped-parásito bien estudiado. Estos parásitos se propagan por medio de vectores dípteros y pueden causar una elevada incidencia de enfermedad y muerte en

poblaciones salvajes, influyendo notablemente en la historia vital de sus hospedadores. <sup>(25)</sup> Su ciclo vital es complicado porque necesitan un hospedador invertebrado (vector) para la fase sexual del ciclo y un hospedador vertebrado (ave) para la fase asexual.

Sin embargo, la razón de que estos protozoos sean tan abundantes en la naturaleza se debe sobre todo a su gran flexibilidad, como demuestra la gran variedad de especies o linajes que se encuentran entre los hemosporidios. Hasta la fecha, se han identificado más de 4000 linajes, con capacidad para infectar a más de 1500 especies de aves <sup>(26)</sup>. La flexibilidad de cada una de estas especies les permite consumir y disponer de los recursos de sus hospedadores, así como adaptarse a los cambios fisiológicos e inmunológicos del hospedador <sup>(27,28)</sup>.

En consecuencia, analizar y estudiar las expresiones genómicas de estos organismos es fundamental para comprender cómo se adaptan a nuevos individuos y/o a diversas especies de aves, así como para determinar las vías moleculares que tanto el hospedador como el parásito emplean a lo largo de su asociación.

Excepto en las regiones polares <sup>(29)</sup>, los hemosporidios aviares son abundantes y diversos en muchas especies de aves. *Plasmodium* puede propagarse entre los taxones de aves y, en general, se cree que infecta a muchos huéspedes en cada hábitat, como lo indica su distribución global <sup>(30)</sup>, aunque en los últimos años se ha demostrado que infecta a subgrupos filogenéticamente relacionados <sup>(31)</sup>.

#### **a) Descripción de la especie**

##### ***Plasmodium***

Las infecciones producidas por especies de *Plasmodium* en aves se conocen como paludismo aviar, que es una enfermedad transmitida por mosquitos con una amplia gama de hospedadores y una enorme distribución geográfica. Las especies de *Plasmodium* que afectan a las aves comparten características morfológicas y de desarrollo con

los parásitos hemosporidios de los géneros *Haemoproteus* y *Leucocytozoon*, pero se distinguen de ellos por la presencia de la fase reproductora asexual en los eritrocitos circulantes <sup>(32)</sup>.

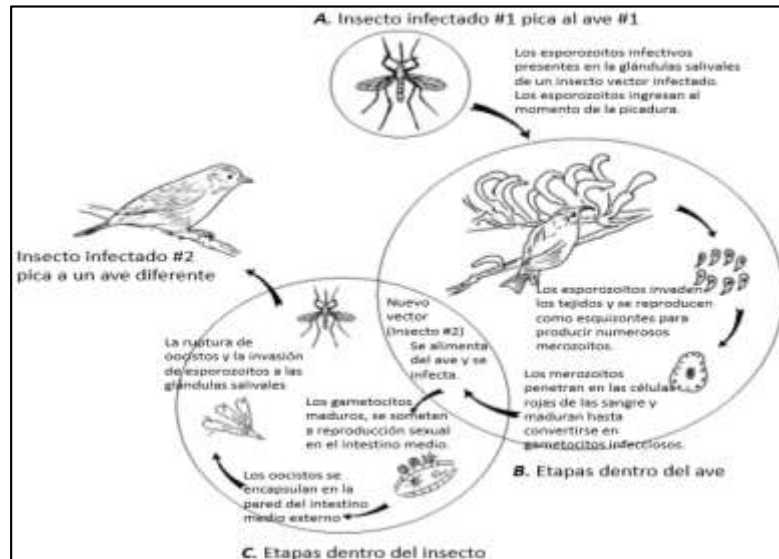
### **Distribución**

Las especies de *Plasmodium* que infectan a las aves están presentes en casi todas las zonas *zoogeográficas* del planeta, a excepción de la Antártida, donde no se encuentran los vectores responsables de la transmisión. Los informes sobre *Plasmodium* en Australia son sustancialmente más bajos que en otras zonas del mundo. Se han registrado siete especies de *Plasmodium*, cada una con un rango de hospedadores diverso, y al menos 67 hospedadores aviares <sup>(33)</sup>.

### **Ciclo de vida**

Los hemoparásitos tienen un hospedador invertebrado (vector) y un hospedador vertebrado (ave). La patología difiere según el parásito y el hospedador. Los parásitos escapan de los eritrocitos aviares hacia los intestinos del díptero cuando el vector se alimenta de un ave infectada. Se produce la gametogénesis y la reproducción sexual, seguidas de la reproducción asexual (esporogonía), que comienza en estadios de extensión conocidos como esporozoítos. Los esporozoítos en desarrollo, que son infecciosos para las aves, atraviesan el hemocoelo del vector y llegan a sus glándulas salivales. La transmisión al hospedador aviar se produce cuando el bicho se alimenta de la sangre de un ave apropiada. Los esporozoítos penetran en las células de los tejidos conectados y se dividen asexualmente, creando merontes o esquizontes pocos días después de la infección. Los merontes dan lugar a los merozoítos, que son las fases asexuales de dispersión en el interior del cuerpo del hospedador, tras numerosas rondas de división múltiple (esquizogonia o merogonia, según el parásito de que se trate). Los merozoítos abandonan los tejidos fijos, viajan por la circulación y se infiltran en los eritrocitos. Pueden seguir la

merogonia/esquizogonia (*Plasmodium*) o crecer directamente hasta convertirse en gametocitos de ambos géneros (*Haemoproteus* y *Leucocytozoon*), que son infecciosos para los vectores <sup>(34)</sup>.



**Figura N° 1.** Ciclo de vida de malaria aviar. Fuente Atkinson

**b) Detección microscópica de hemoparásitos**  
***Plasmodium***

Parasita primordialmente eritrocitos, pero además trombocitos, leucocitos y células endoteliales. Los trofozoítos adolescentes se parecen a *Haemoproteus*. La existencia de esquizontes y gametocitos en los eritrocitos de la sangre periférica brinda dos indicadores para la identificación del parásito. Los esquizontes son inclusiones intracitoplasmáticas circulares u ovals que tienen dentro merozoítos pigmentados de oscuro. Los gametocitos tienen dentro pigmentos refractarios granulares y comúnmente llenan menos del 50% del citoplasma de la célula parasitada, lo que hace el movimiento del núcleo eritrocitario <sup>(35)</sup>.

***Plasmodium relictum***

Se descubrió *Plasmodium relictum* en 127 especies diferentes de aves de 11 órdenes diferentes <sup>(30)</sup>. Hay referencias sobre prevalencia de *Plasmodium* en aves paseriformes, sobre todo en gorriones <sup>(36)</sup>, aunque esto puede estar relacionado con la simplicidad de captura

de estas especies, lo que supone que fueron muchísimo más investigadas <sup>(30)</sup>.

Los gorriones (*Passer domesticus*) son comunes en la región mediterránea y otros climas cálidos de Europa y Asia Central, pero en los últimos siglos se han extendido a todos los continentes. Considerando la distribución global de *P. relictum*, se planteó la hipótesis de que este parásito se propagó junto con los gorriones, facilitando su invasión al reducir las aves nativas susceptibles a la infección <sup>(37)</sup>.

*Plasmodium relictum* figura en la lista de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza como una de las 100 especies invasoras más peligrosas de todo el mundo, dado a sus efectos catastróficos sobre ecosistemas aislados <sup>(38)</sup>.

#### **c) Detección molecular**

El uso de la PCR para detectar la variación en el gen del citocromo b del parásito define linajes que superan con mucho la morfoespecie estándar. Esta variación mitocondrial está vinculada a la variación del ADN nuclear, y estos linajes no parecen recombinarse incluso cuando coocurren dentro del mismo hospedador. En consecuencia, podrían considerarse especies diferentes. Estos enfoques moleculares mejoran el diagnóstico de las infecciones parasitarias de baja intensidad <sup>(39)</sup>. Sin embargo, se ha desarrollado una nueva tecnología, la PCR anidada, que mejora en gran medida la tasa de detección superior y permite la detección de infecciones de baja intensidad.

#### **d) Linajes de hemoparásitos aviares**

Muchas especies de aves albergan numerosos linajes de parásitos sanguíneos. Algunos de ellos son compartidos por distintas especies de hospedadores. Para comprender estos complejos sistemas, es

fundamental reconocer que múltiples linajes, especies y familias de parásitos pueden coexistir en la misma población, así como en el mismo individuo, y que estos parásitos pueden competir o interactuar entre sí <sup>(40)</sup>. Los distintos linajes de parásitos están relacionados con una determinada ecología vectorial; este aspecto puede explicar las variaciones en la distribución geográfica de los linajes de hemoparásitos descubiertos.

Según investigaciones anteriores, la presencia o ausencia de especies hospedadoras específicas es probablemente el factor más importante que influye en la aparición de linajes de parásitos y en el predominio general de éstos. Del mismo modo, la similitud en la diversidad de parásitos entre distintos lugares podría atribuirse a la gran variedad de aves silvestres que se encuentran en estas zonas. En consecuencia, es más probable que la existencia o ausencia de un linaje de parásitos dependa de la disponibilidad de especies hospedadoras compatibles que de cualidades ecológicas específicas, independientemente del hospedador <sup>(41)</sup>.

- e) **Ácidos nucleicos:** Son macromoléculas de gran importancia en biología. Todas las especies vivas tienen ácidos nucleicos en forma de ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN), mientras que algunos virus sólo tienen ADN y otros sólo tienen ARN <sup>(42)</sup>.

### **El ácido desoxirribonucleico (ADN)**

Se distribuye en pares de cromosomas, todos heredados de uno de los padres. Como resultado, cada gen objetivo tiene dos copias, conocidas como alelos, una en cada par de cromosomas. En los animales, los genes están dispuestos a lo largo de los cromosomas y separados por largas secuencias de ADN, a menudo repetitivas. Los intrones separan los segmentos de codificación (exones) de los genes. Estos últimos no contienen información de codificación de proteínas, aunque son útiles para regular la expresión génica. Las reglas codificadas por los genes son activadas por dos mecanismos.

El primero es la transcripción (copia) de la información genética en otro tipo de ácido nucleico <sup>(43)</sup>.

### **Métodos de extracción de ácidos nucleicos**

Para obtener ácidos nucleicos desde material biológico, es requisito lisis de las células, inactivar las nucleasas celulares y dividir los ácidos nucleicos de los restos celulares. El desarrollo de lisis óptimo acostumbra radicar en una conjunción de enfoques lo bastante poderosos como para descomponer el complejo material de partida (por ejemplo, un tejido) y lo bastante delicados como para retener el ácido nucleico. Entre las técnicas típicas de lisis se tienen a las siguientes:

Rotura mecánica (trititación, lisis hipotónica, etc.).

Tratamiento químico (detergentes, agentes caotrópicos, reducción con tioles, etc.).

Digestión enzimática (Proteinasa K, etc.). Es concebible desgarrar la membrana celular e inactivar de forma simultánea las nucleasas intracelulares.

Entre otras cosas, puede contener detergentes que disuelven las membranas celulares y sales caotrópicas fuertes que desactivan las enzimas intracelulares. Los desechos celulares se eliminan fácilmente después de la lisis celular y la activación de la nucleasa <sup>(44)</sup>.

### **f) Importancia de las técnicas de extracción**

La célula es la unidad estructural y funcional primaria de génesis en todas las especies; todas contienen esencialmente la misma maquinaria bioquímica y codificación genética. La secuencia directa de los cuatro nucleótidos que componen la molécula de ADN contiene toda la información genética de un organismo vivo. Para generar bandas definidas, así como sitios diana para los cebadores.

Por lo tanto, se requieren métodos apropiados de restricción y polimerasa Taq. El ADN de alta calidad es necesario para las

técnicas de biología molecular como la toma de huellas dactilares del ADN (que utiliza secuencias muy repetitivas llamadas minisatélites para permitir la identificación genética de individuos) y la PCR (para detectar secuencias de ADN específicas mediante cebadores), pero ADN fragmentado que no preserva la integridad de los fragmentos de restricción preservados de las muestras de campo es crítico y puede afectar significativamente la calidad del extracto. Es importante obtener ácido desoxirribonucleico (ADN) humano de alta pureza a partir de glóbulos blancos para su uso en estudios genéticos moleculares que involucren hibridación y técnicas de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa <sup>(44, 45)</sup>.

### 1.3. Definición de términos básicos

#### **Aves silvestres**

Un ave silvestre es una clase nativa cuya vida comúnmente se lleva a cabo en su hábitat o ámbito natural, dentro los parámetros de su lugar de nacimiento <sup>(46)</sup>.

**Caracterización genómica:** Es el procedimiento de laboratorio en el que se utiliza una muestra de tejido, sangre u otro líquido corporal para conseguir información acerca de todos los genes de un individuo o de un tipo de célula específica, de esta forma como la manera en que esos genes interactúan entre sí y con el ámbito <sup>(47)</sup>.

**Genoma:** Complemento de la información genética exclusivo para cada clase de organismo <sup>(48)</sup>.

**Malaria aviar:** Es una patología ocasionada por parásitos sanguíneos transmitidos por mosquitos <sup>(49)</sup>.

**Género *Plasmodium*:** Es un género de protistas del filo Apicomplexa, clase Aconoidasida, orden Haemosporida y familia Plasmodiidae con más de 175 especies. Hasta esta época se conocen 5 especies de *Plasmodium* que causan malaria en el ser humano: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malaria* and *P. knowlesi* <sup>(50)</sup>.



**Secuenciación del genoma:** La secuenciación de genomas terminados es un procedimiento poderoso para la ligera identificación de genes en un organismo, y sirve como utilidad elemental para posteriores exámenes funcionales de los recientes genes descubiertos. La secuencia genómica provee de un grupo de virtualmente todas las proteínas que el organismo puede expresar <sup>(51)</sup>.

**Anotación de genomas:** Es la identificación de las primordiales propiedades del genoma. La anotación de genomas comprende dos etapas fundamentales: La anotación estructural (predicción de zonas codificantes) y la anotación servible (asignación de información biológica a los genes antes predichos) <sup>(51)</sup>.

**Ensamblaje del genoma:** Proceso de transcribir la secuencia del genoma a partir de pequeños extractos de ADN con información agregada utilizable se denomina ensamblaje del genoma. Las tácticas de ensamblaje del genoma se pueden dividir en dos categorías: Ensamblaje de referencia, donde el genoma se usa como referencia; y el ensamblaje de *novo*, donde solo se utiliza información de la secuenciación para reconstruir dicho genoma sin conocimiento previo de su organización <sup>(52)</sup>.

**Apicoplasto:** Un apicoplasto (plástido apicomplejo) es un vestigio plástido encontrado en parásitos pertenecientes al filo Apicomplexa. Los plástidos son mejor conocido como el verde, subcelular compartimiento de plantas y algas en el que se produce la fotosíntesis. Los apicoplastos no son fotosintéticos <sup>(53)</sup>.

**ADN:** Constituye el depósito primordial de la información genética. Esta información es copiada y transcripta en las moléculas de ARN, cuyas secuencias de nucleótidos incluyen el código para las secuencias típicas de aminoácidos <sup>(42)</sup>.

**ARN:** El ARN se localiza tanto en el núcleo, donde se forma, como en el citoplasma, donde tiene lugar la síntesis proteica <sup>(42)</sup>.

**Nucleótidos:** Monómero de ácidos nucleicos, cada uno con tres partes: Un azúcar (ribosa y desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada; el fosfato está unida al azúcar y al carbono 5' y a la base del carbono 1' <sup>(48)</sup>.

**Genes:** En términos no moleculares, unidad de herencia que gobierna las propiedades de un rango especial. En términos moleculares, segmento de DNA que contiene la información para solo una molécula de polipéptido o de RNA incluyendo regiones transcritas, pero no codificada <sup>(48)</sup>.

**Cromosomas:** Fibras de DNA nuclear que contienen la información genética en las células eucariotas <sup>(48)</sup>.

**Plástidos:** Son organelos citoplasmáticos especiales que están presentes en las células vegetales <sup>(42)</sup>.

**Especie endémica:** Es la que se restringe a un sector geográfico específico. El sector geográfico puede definirse por los parámetros políticos, así como países o departamentos o por parámetros ecológicos <sup>(54)</sup>.

**Librería:** Una librería de DNA es una recopilación de clones de vectores que tienen dentro extractos de DNA creada de tal forma que, por medio de un preciso sistema de selección, se tienen la posibilidad de llegar a dividir los clones de interés <sup>(55)</sup>.

Finalmente, el presente trabajo de investigación es de suma importancia para determinar características de *Plasmodium* sp., causante de malaria aviar ya que en los últimos años se han secuenciado un sin número de genomas aviares, sin embargo a la fecha solo se han secuenciado 03 genomas de malaria aviar, lo cual implica la necesidad de obtener mayores conocimientos mediante el desarrollo de la presente investigación, siguiendo las metodologías y protocolos para tal fin.

Con el presente trabajo de investigación se logrará un importante avance en la identificación del genoma apicoplástico de *Plasmodium* sp., causante de malaria aviar, además de producir recursos genómicos,

esta investigación servirá para realizar otros estudios de investigación que permitirán desarrollar una aplicación de biosensores. Esto permitirá a los investigadores en campo determinar la prevalencia de la malaria rápidamente y sin equipos especializados; estos podrían ser especialmente valiosos, para inventarios biológicos rápidos en la región Loreto y en todo el Perú. Asimismo, esta aplicación, podría ser de gran importancia para funcionarios de aduanas para detectar aves infectadas que entran o salen del país.

## CAPÍTULO II: VARIABLES E HIPÓTESIS

### 2.1. Variable y su operacionalización

- **Variable**

Características del genoma apicoplástico de *Plasmodium sp.*

- **Definición Conceptual**

Son las características del genoma apicoplástico determinados por su secuencia, por el tamaño, número de genes, organización de los genes y sus funciones.

- **Definición Operacional**

Las actividades u operaciones a realizar para medir las variables e interpretar los datos, son los siguientes:

- Identificación de genes genómicos construidos.
- Construcción de librerías genómicas secuenciadas.
- Ensamblado y anotación funcional del genoma apicoplástico.

- **Indicadores:**

- Tamaño del genoma.
- Número de genes.
- Organización de los genes.
- Funciones de los genes.

- **Items**

- ¿Cuál es el ADN del genoma apicoplástico de *Plasmodium sp.*?
- ¿Cuáles son las secuencias del genoma apicoplástico de *Plasmodium sp.*, que permitirá caracterizarlo?

- **Instrumentos**

- Secuenciadores de última generación y el NextSeq 550.
- Termociclador (Eppendorf MX Nexus Gradient)
- Cámaras electroforéticas, espectrofotómetro UV/visible y Nano Drop 2000 C.
- Fichas de registro de recolección de datos.

## **2.2. Formulación de la hipótesis**

Es posible caracterizar el genoma apicoplástico de *Plasmodium* sp. causante de malaria en aves de la amazonía peruana.

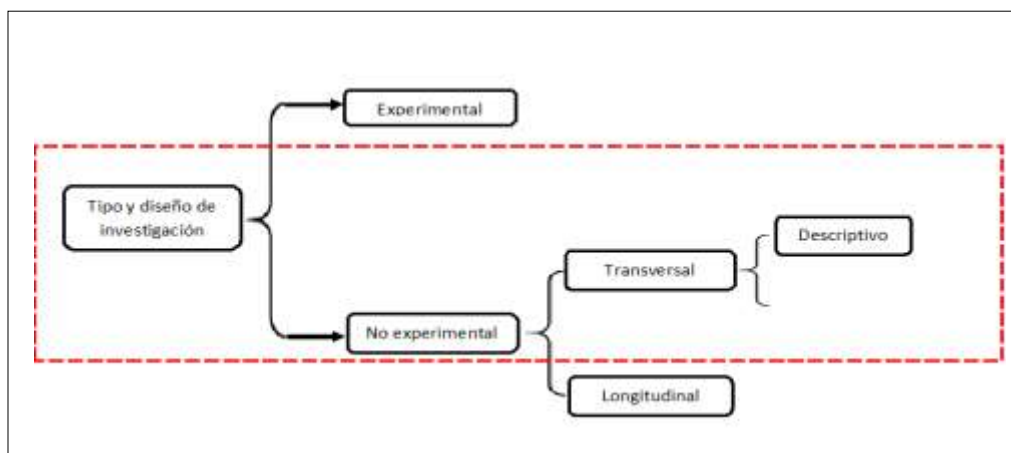
## CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

### 3.1. Tipo y diseño de la investigación

El tipo de investigación fue no experimental, transversal.

Se empleó el diseño descriptivo porque consistió en secuenciar el genoma apicoplástico de *Plasmodium* sp., que causan la malaria en aves de la amazonia peruana.

**Figura N° 2.** Diagrama de tipo y diseño de investigación



### 3.2. Población y muestra

#### **Población**

Estuvo constituida por 281 muestras de sangre de diferentes aves de diferentes especies de la cuenca alta río Itaya - Loreto.

#### **Muestra**

Lo constituyeron 170 muestras de sangre de diferentes aves de diferentes especies que dieron positivo a malaria aviar.

#### **Tipo de muestreo y procedimiento de selección de muestra**

No probabilístico y a conveniencia del investigador.

## **Criterios de selección**

### **- Criterios de inclusión**

Muestras de sangre obtenidas de diferentes especies de aves de la cuenca alta río Itaya, que presenten cantidades apropiadas para los análisis moleculares (~ 100 µL)

Muestras de sangre obtenidas de diferentes especies de aves de la cuenca alta río Itaya, que estén en buen estado de conservación.

Muestras de sangre obtenidas de diferentes especies de aves de la cuenca alta río Itaya que estén infectadas por parásitos del género *Plasmodium*.

### **- Criterios de exclusión**

Muestras de sangre obtenidas de diferentes especies de aves de la cuenca alta río Itaya, que no presentan cantidades apropiadas para los análisis moleculares (~ 100 µL)

Muestras de sangre obtenidas de diferentes especies de aves de la cuenca alta río Itaya, que no estén en buen estado de conservación.

Muestras de sangre obtenidas de diferentes especies de aves de la cuenca alta río Itaya que no estén infectadas por parásitos del género *Plasmodium*.

## **3.3. Técnicas e instrumentos**

La captura de aves (Anexo 2), se realizó en el Área de Concesión para la Conservación en la cuenca alta río Itaya de la Universidad Científica del Perú-UCP; ubicado en el distrito de San Juan Bautista, Maynas, Loreto. La captura de aves se realizó colocando redes de neblina a nivel de sotobosque (3 m de altura sobre la superficie) en forma individual o en sistemas de 2 a 3 redes, luego se revisaba las redes con un intervalo de 30 minutos. Cuando se observaba la caída de las aves en la red de neblina se procedía a sacarlas cuidadosamente y las colocábamos en bolsas de tela para ser trasladadas al lugar de procesamiento de información, para luego identificarlas morfológicamente empleando los

libros Birds of Perú de Schulenberg, *et al.* <sup>(46)</sup> y a nivel de especie List of the Birds of Peru de Plenge <sup>(56)</sup>.

Para la toma de muestras de sangre de aves (Anexo 3), se utilizó alcohol para la desinfección de manos y para la extracción de sangre se utilizó agujas calibre 22, capilares heparinizados y tarjetas Whatman FTA. El procedimiento consistió en realizar una punción en la vena braqueal del ave y con la ayuda del capilar procedíamos a tomar la muestra de sangre del ave e impregnar en la tarjeta Whatman FTA. Finalmente, realizábamos la liberación de las aves.

Del total de 281 aves capturadas (Anexo 6), 170 aves estuvieron infectadas con malaria aviar lo que representa el 60%, mientras que 111 aves no estuvieron infectados lo que representa el 40%.

Las aves infectadas con malaria aviar, pertenecen a 5 órdenes, de las cuales el orden de las aves con mayores casos de malaria aviar fue el orden Passeriformes con un total de 151 aves, seguido del orden Piciformes con 12 aves infectadas, el orden Galbuliformes con 4 aves infectadas, el orden Columbiformes con 2 aves infectadas y el orden Coraciformes con una sola ave infectada.

De 18 familias de aves capturadas, solo una familia no estuvo infectada con malaria aviar siendo esta la familia Grallariidae.

La familia con mayor número de aves infectadas fue la familia Tamnophiliidae (50 aves), seguido de la familia Pipridae (32 aves), furnariidae (28 aves), Tyraniidae (15 aves), troglodytidae (10 aves), Ramphastidae (11 aves), Thraupidae (7 aves), Alcedinidae (1 ave), bucconidae (3 aves), Capitonidae (1 ave), Cardinalidae (2 aves), Columbidae (2 aves), Formicariidae (3 ave), Galbulidae (1 ave), Passerilidae (2 aves), Turdidae (1 ave) y Onychorhynchidae (1 ave).

La caracterización del genoma apicoplástico de *Plasmodium* sp., se realizó en el Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú.



La técnica empleada fue la observación y los instrumentos que se emplearon fueron los siguientes: Ficha de registro de aves colectadas y ficha de registro de recolección de datos, registro de datos de secuenciamiento generados con el secuenciador NextSeq 550, datos de amplificación en tiempo real producidos por el termociclador CFX96 Deep Well (BioRad) y lecturas de absorbancia obtenidas con el espectrofotómetro UV/visible NanoDrop 2000.

### **3.4. Procedimientos de recolección de datos**

#### **Purificación de ADN de muestras de sangre de aves**

Para coleccionar las muestras de sangre de aves se obtuvo un permiso de la entidad correspondiente (RDG N° D000266-2021-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS). Anexo 1.

Los procedimientos realizados en el laboratorio fueron los siguientes (Anexo 4):

1. Se obtuvo segmentos del papel Whatman impregnado con las muestras de sangre de las aves infectadas por *Plasmodium* y se transfirió a microtubos de 1,5 ml.
2. Se agregó 300  $\mu\text{L}$  del tampón TNES con 10  $\mu\text{L}$  de proteinasa K (10 mg/ml) y se incubó a 56 °C por 5 h.
3. Se agregó 85  $\mu\text{L}$  de cloruro de sodio (NaCl) 5M y homogenizó en un vortex por 15 s.
4. Se centrifugó a 21 000 x g por 7 min y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 1.5 ml.
5. Se agregó 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol y se homogenizó suavemente invirtiendo los microtubos.
6. Se centrifugó a 21 000 x g por 15 min para precipitar el ADN y se descartó el sobrenadante.
7. Se agregó 500  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% para lavar el ADN precipitado.
8. Se centrifugó a 21 000 x g por 10 min y se descartó el sobrenadante.
9. Finalmente, se agregó 100  $\mu\text{L}$  de tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) para disolver el ADN y se almacenó a -20 °C.

### **Construcción de librerías y secuenciamiento del genoma apicoplástico de *Plasmodium sp.***

Después de purificar el ADN, las librerías se construyeron utilizando el kit Nextera Flex (Illumina, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante y luego fueron secuenciados en la plataforma NextSeq550 (Illumina, EE. UU.), del laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú.

#### **3.5. Técnicas de procesamiento y análisis de datos**

Para el ensamblado y anotación se emplearon diversas herramientas bioinformáticas como Trimomatic<sup>(57)</sup> para eliminar los adaptadores y los extremos de las secuencias de baja calidad y limpiar las secuencias sin procesar, el programa Novoplastic<sup>(58)</sup> para el ensamblaje del genoma apicoplasto y el programa Geneious Prime v2022.1.1<sup>(59)</sup> para la anotación del genoma,

Para la construcción del árbol filogenético se empleó una herramienta bioinformática llamada Geneious tree builder, con el “Método de Construcción de Árboles” de Neighbor-joining, utilizando el Modelo de Distancia Genética de Tamura - Nei.

#### **3.6. Aspectos éticos**

En la investigación se empleó aves de experimentación, solo para extraer muestras de sangre y detectar parásitos sanguíneos.

Los aspectos éticos fueron los siguientes:

En el campo, se manejó directamente las aves, en salvaguarda de la vida de cada ave tomando las siguientes medidas:

- Se manejó las aves colectadas de manera cuidadosa, suave, en silencio, con respeto y en el menor tiempo.
- Se capturó y procesó solo las aves que se pudo manejar con seguridad.
- Se cerró las trampas o redes de niebla cuando hubo depredadores en el área.

- Se evaluó frecuentemente la condición de las trampas y redes de niebla.
- Se revisó las redes de niebla frecuentemente según lo permitían las condiciones climáticas.

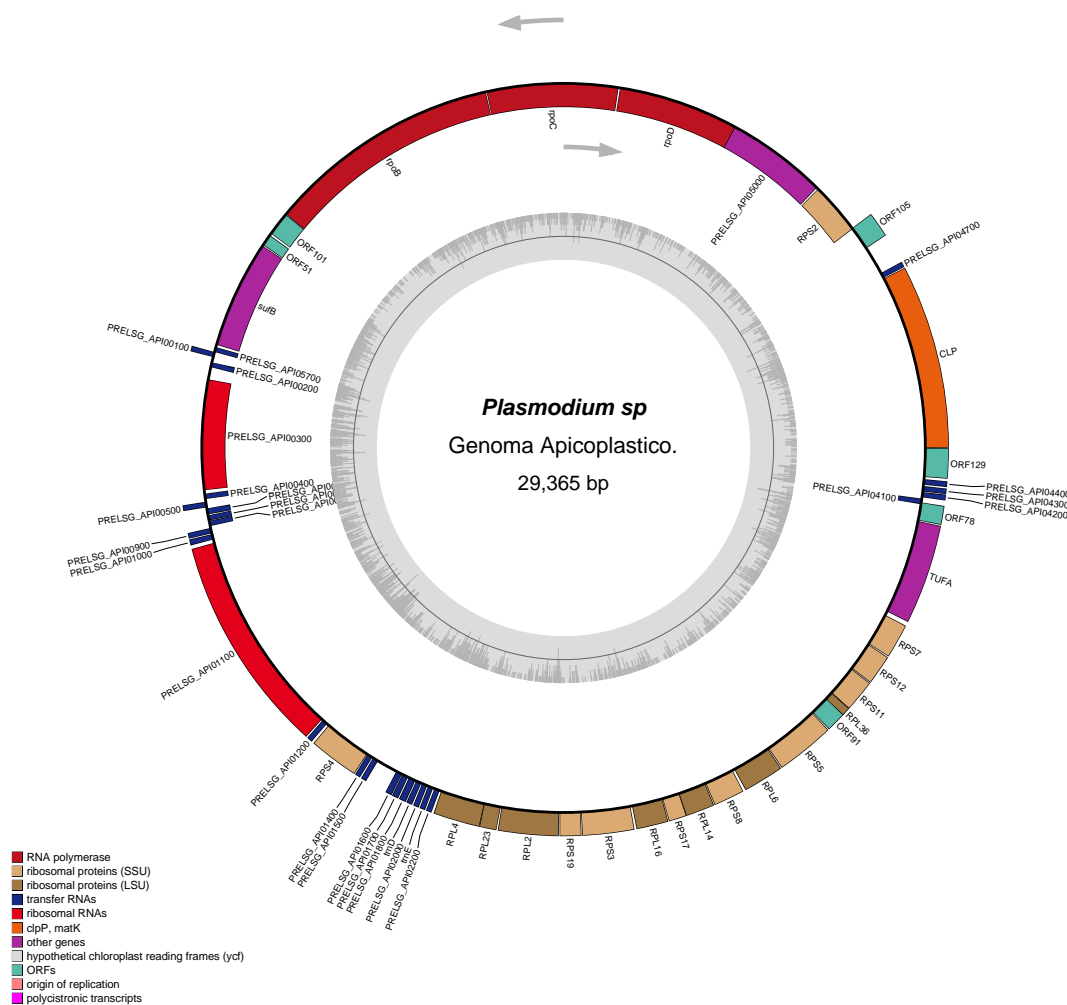
En el laboratorio, se ejecutó los procedimientos de recolección de datos tomando las siguientes medidas:

- Cumpliendo estrictamente las normas de bioseguridad a fin de evitar y minimizar los riesgos.
- Utilizando con responsabilidad y cuidado los diferentes kits de extracción de ADN, construcción de librerías, secuenciamiento, ensamblaje y anotación del genoma apicoplástico de *Plasmodium* sp.

## CAPÍTULO IV: RESULTADOS

### 4.1. Secuenciamiento y ensamblado del genoma apicoplástico de *Plasmodium* sp.

El genoma apicoplástico secuenciado y ensamblado de *Plasmodium* sp., se caracterizó por tener forma circular, ser compacto y presentar un tamaño de 29,365 pb (29,36 kb). Asimismo, el genoma apicoplástico se caracteriza por tener un alto contenido de adeninas y timinas (AT% = 86,9%) y bajo contenido de guaninas y citosinas (GC% = 13,1%). El peso molecular de este genoma apicoplástico es  $\sim 1,8 \times 10^4$  KDa. Como se muestra en la Figura N° 3, los genes pueden ser transcritos en ambas direcciones (horario y antihorario) de las hebras del ADN genómico.



**Figura N°3.** Tamaño y organización estructural del genoma apicoplástico secuenciado, ensamblado y anotado de *Plasmodium* sp., causante de malaria aviar en la cuenca alta del río Itaya.

#### 4.2. Identificación de los genes presentes en el genoma apicoplástico de *Plasmodium* sp.

En el genoma apicoplástico secuenciado, ensamblado y anotado de *Plasmodium* sp., se han identificado 56 genes (Figura N° 3, Figura N° 4 y Tabla N° 1), de los cuales dos son genes ribosomales (ARNr), el de 28S y 18S, los mismos que forman parte de las subunidades mayor y menor del ribosoma, respectivamente. También, fueron identificados 24 genes que codifican para los ARNs de transferencia (ARNt), específicos para los 20 aminoácidos que participan en la síntesis de proteínas. Cabe indicar que en el genoma apicoplástico se encontró hasta dos copias de los genes que codifican ARNt para los aminoácidos arginina (Arg), glicina (Gly), isoleucina (Ile) y metionina (Met).



**Figura N°4.** Genes presentes en el genoma apicoplástico secuenciado, ensamblado y anotado de *Plasmodium* sp. causante de malaria aviar en la cuenca alta del río Itaya.

Además, como se detalla en la Tabla N°1 se han identificado 30 genes que codifican para proteínas, entre estos tenemos el gen *clp* que codifica para una enzima proteasa, también hay siete genes que codifican proteínas con función biológica desconocida (ORF50, ORF51, ORF78, ORF91, ORF101, ORF105 y ORF129). Adicionalmente, se han identificado genes que codifican proteínas de las subunidades mayor <sup>(24)</sup> y menor del ribosoma <sup>(9)</sup>. También, están presentes los genes que codifican las subunidades de la enzima ARN polimerasa y el factor de transcripción sigma, que en conjunto participan en la transcripción de los

genes del apicoplasto. Finalmente, se registra la presencia de los genes *sufB* y *tufA*, que participan en la movilización de azufre y como un factor de elongación de la síntesis de proteínas, respectivamente.

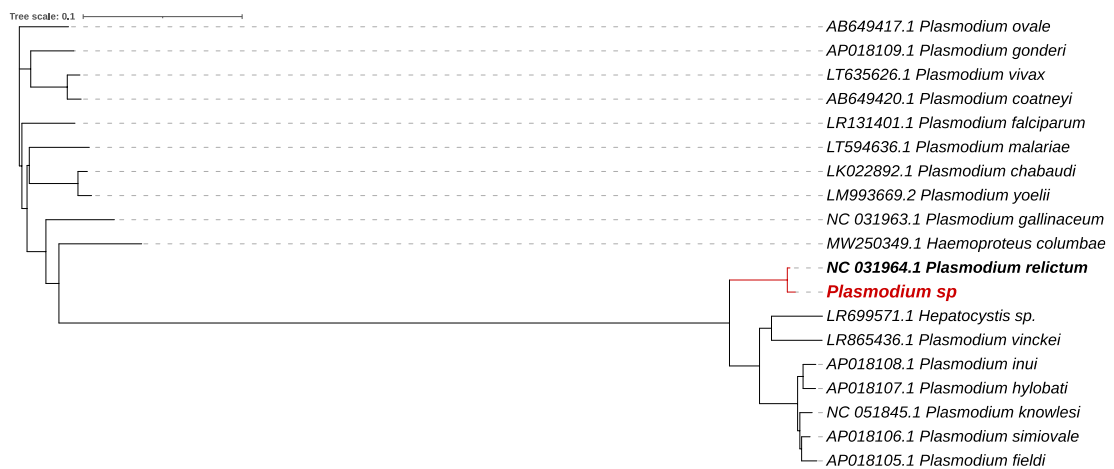
**Tabla N° 1.** Lista de genes identificados en el genoma apicoplástico de *Plasmodium* sp. causante de malaria aviar en la cuenca alta del río Itaya.

Nro.	Nombre del gen	Tipo	Producto	Ubicación en el genoma		Tamaño (pb)	Dirección de transcripción
				Inicio	Termino		
1	<i>ARNr 28S</i>	ARNr	ARN de la subunidad mayor del ribosoma	15913	18605	2693	Horario
2	<i>ARNr 18S</i>	ARNr	ARN de la subunidad menor del ribosoma	13796	15227	1432	Antihorario
3	<i>ARNt-Ala</i>	ARNt	ARN de transferencia	15270	15341	72	Antihorario
4	<i>ARNt-Arg</i>	ARNt	ARN de transferencia	15716	15786	71	Horario
5	<i>ARNt-Arg</i>	ARNt	ARN de transferencia	15549	15620	72	Antihorario
6	<i>ARNt-Asn</i>	ARNt	ARN de transferencia	15376	15447	72	Horario
7	<i>ARNt-Asp</i>	ARNt	ARN de transferencia	20061	20134	74	Horario
8	<i>ARNt-Cys</i>	ARNt	ARN de transferencia	19434	19507	74	Horario
9	<i>ARNt-Gln</i>	ARNt	ARN de transferencia	28730	28800	71	Horario
10	<i>ARNt-Glu</i>	ARNt	ARN de transferencia	20232	20302	71	Horario
11	<i>ARNt-Gly</i>	ARNt	ARN de transferencia	2268	2339	72	Horario
12	<i>ARNt-Gly</i>	ARNt	ARN de transferencia	28806	28876	71	Horario
13	<i>ARNt-Hys</i>	ARNt	ARN de transferencia	19349	19420	72	Horario
14	<i>ARNt-Ile</i>	ARNt	ARN de transferencia	13438	13506	69	Horario
15	<i>ARNt-Ile</i>	ARNt	ARN de transferencia	13571	13642	72	Antihorario
16	<i>ARNt-Leu</i>	ARNt	ARN de transferencia	15461	15541	81	Antihorario
17	<i>ARNt-Lys</i>	ARNt	ARN de transferencia	20147	20219	73	Horario
18	<i>ARNt-Met</i>	ARNt	ARN de transferencia	19777	19860	84	Horario
19	<i>ARNt-Met</i>	ARNt	ARN de transferencia	15796	15869	74	Horario
20	<i>ARNt-Phe</i>	ARNt	ARN de transferencia	28641	28712	72	Antihorario
21	<i>ARNt-Pro</i>	ARNt	ARN de transferencia	20317	20388	72	Horario
22	<i>ARNt-Ser</i>	ARNt	ARN de transferencia	19960	20051	92	Horario
23	<i>ARNt-Thr</i>	ARNt	ARN de transferencia	18621	18693	73	Horario
24	<i>ARN-Tip</i>	ARNt	ARN de transferencia	28893	28964	72	Horario
25	<i>ARN-Tyr</i>	ARNt	ARN de transferencia	19865	19948	84	Horario
26	<i>ARNt-Val</i>	ARNt	ARN de transferencia	15622	15693	72	Antihorario
27	<i>clp</i>	GCP	Proteasa caseinolítica	1	2259	2259	Horario
28	<i>orf50</i>	GCP	Proteína con función desconocida	3714	5036	1323	Antihorario
29	<i>orf51</i>	GCP	Proteína con función desconocida	11769	11924	156	Antihorario
30	<i>orf78</i>	GCP	Proteína con función desconocida	28431	28664	234	Horario
31	<i>orf91</i>	GCP	Proteína con función desconocida	25574	25849	276	Horario
32	<i>orf101</i>	GCP	Proteína con función desconocida	11431	11745	315	Antihorario
33	<i>orf105</i>	GCP	Proteína con función desconocida	2708	3025	318	Horario
34	<i>orf129</i>	GCP	Proteína con función desconocida	28993	29364	372	Horario
35	<i>rpl2</i>	GCP	Proteína de la subunidad mayor del ribosoma	21220	21966	747	Horario
36	<i>rpl4</i>	GCP	Proteína de la subunidad mayor del ribosoma	20413	20994	582	Horario
37	<i>rpl6</i>	GCP	Proteína de la subunidad mayor del ribosoma	24322	24828	507	Horario
38	<i>rpl14</i>	GCP	Proteína de la subunidad mayor del ribosoma	23539	23901	363	Horario
39	<i>rpl16</i>	GCP	Proteína de la subunidad mayor del ribosoma	22914	23312	399	Horario
40	<i>rpl23</i>	GCP	Proteína de la subunidad mayor del ribosoma	20991	21206	216	Horario
41	<i>rpl36</i>	GCP	Proteína de la subunidad mayor del ribosoma	25815	25925	111	Horario
42	<i>rps2</i>	GCP	Proteína de la subunidad menor del ribosoma	3012	3695	684	Antihorario
43	<i>rps3</i>	GCP	Proteína de la subunidad menor del ribosoma	22250	22891	642	Horario
44	<i>rps4</i>	GCP	Proteína de la subunidad menor del ribosoma	18721	19341	621	Horario
45	<i>rps5</i>	GCP	Proteína de la subunidad menor del ribosoma	24837	25565	729	Horario
46	<i>rps7</i>	GCP	Proteína de la subunidad menor del ribosoma	26713	27141	429	Horario
47	<i>rps8</i>	GCP	Proteína de la subunidad menor del ribosoma	23908	24294	387	Horario
48	<i>rps11</i>	GCP	Proteína de la subunidad menor del ribosoma	25922	26323	402	Horario
49	<i>rps12</i>	GCP	Proteína de la subunidad menor del ribosoma	26330	26704	375	Horario
50	<i>rps17</i>	GCP	Proteína de la subunidad menor del ribosoma	23318	23542	225	Horario
51	<i>rps19</i>	GCP	Proteína de la subunidad menor del ribosoma	21974	22243	270	Horario
52	<i>rpoB</i>	GCP	Subunidad de la ARN polimerasa	8353	11430	3078	Antihorario
53	<i>rpoC</i>	GCP	Subunidad de la ARN polimerasa	6627	8345	1719	Antihorario
54	<i>rpoD</i>	GCP	Factor de transcripción sigma	5017	6609	1593	Antihorario
55	<i>sufB</i>	GCP	Proteína B para la movilización de azufre	11934	13343	1410	Antihorario
56	<i>tufA</i>	GCP	Factor de elongación Tu	27191	28420	1230	Horario

**Leyenda:** GCP: Gen que codifica proteína, ARNr: ARN ribosomal, ARNt: ARN de transferencia.

#### 4.3. Relación filogenética de *Plasmodium sp.*, con otras especies de apicomplejos

El análisis filogenético de la secuencia completa del gen ribosomal 28S (Figura N° 5), muestra que *Plasmodium sp.* causante de malaria aviar en la cuenca alta del río Itaya presenta una alta similitud genética (~99.9%) con *Plasmodium relictum*, sugiriéndonos que pertenece a esta especie. El árbol filogenético también nos muestra que *Plasmodium sp.* tiene diferencias genéticas con otras especies de los géneros *Plasmodium*, *Haemoproteus* y *Hepatocystis*.



**Figura N° 5.** Relación filogenética basada en la secuencia completa del gen ribosomal 28S del genoma apicoplástico de *Plasmodium sp.* causante de malaria aviar en la cuenca alta del río Itaya y otras especies de parásitos del grupo de apicomplejos.

## CAPÍTULO V: DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

### 5.1. Secuenciamiento y ensamblado del genoma apicoplástico de *Plasmodium* sp.

Este estudio reporta por primera vez el genoma apicoplástico de una especie de apicomplejo del género *Plasmodium* que parasita aves de la amazonia peruana. Este genoma apicoplástico presenta similitudes con los correspondientes genomas de otras especies de apicomplejos. En primer lugar, todos los genomas reportados a la fecha tienen forma circular, son compactos y presentan un tamaño promedio de  $34,87 \pm 6,75$  kb (Anexo 1), el cual varía de 24,24 a 53,27 kb <sup>(60-61)</sup>.

Asimismo, el alto contenido de AT% y bajo contenido de GC% se encuentran en el rango registrado para los apicomplejos <sup>(62,63-64)</sup>, que varían de 71,98 a 87,60% y de 12,40 a 28,02% para el contenido de AT% y GC%, respectivamente (Anexo 1). Sin embargo, una característica que contrasta con los genomas apicoplásticos de algunas especies de apicomplejos es la ausencia de una región repetida invertida (región duplicada). Este tipo de región suele incluir a los dos genes ribosomales 18 y 28S y algunos genes que codifican ARNt. Los apicomplejos que presentan la particularidad de contar con esta región repetida invertida incluyen a *P. ovale* <sup>(63)</sup> *P. falciparum*, <sup>(65)</sup> *P. vivax*, <sup>(66)</sup> *Leucocytozoon caulleryi* <sup>(62)</sup>.

Aunque el repertorio y arreglo de los genes en el genoma apicoplástico difiere marcadamente entre los apicomplejos, sin embargo, dentro del género *Plasmodium* estos son casi conservados <sup>(67)</sup>. De acuerdo a análisis comparativos los rearrreglos que han ocurrido en diferentes etapas de la evolución de los apicoplastos, incluyen la pérdida de los genes que participan en la fotosíntesis. <sup>(68)</sup> En conjunto, estos reportes nos indican que el contenido, la orientación y la distribución de los genes en los genomas apicoplásticos varían entre las especies de apicomplejos.



## 5.2. Identificación de los genes presentes en el genoma apicoplástico de *Plasmodium sp.*

La mayoría de los genes identificados en el genoma apicoplástico de *Plasmodium sp.*, están involucrados principalmente en dos procesos moleculares fundamentales, la síntesis de moléculas de ARN (transcripción) y la síntesis de proteínas (traducción). Para la transcripción participan algunos de los genes que codifican las subunidades de la ARN polimerasa y el factor de transcripción sigma. Por otra parte, para la traducción participan la mayoría de los genes que codifican los dos ARN ribosomales (18 y 28S), los que codifican las proteínas de las subunidades menor y mayor del ribosoma, los ARN de transferencia y el factor de elongación Tu (codificado por el gen *tufA*). Estos mismos genes, con algunas variaciones, en el número y distribución se han reportado en todos los genomas apicoplásticos reportados hasta la fecha <sup>(60,69,63,65,66,67)</sup>, indicando la alta conservación evolutiva de este tipo de genomas.

Cabe indicar que, en el apicoplasto, además de las funciones moleculares descritas, se llevan a cabo diversos procesos metabólicos complejos. Estos incluyen la replicación del genoma apicoplástico, transporte de diversas moléculas y diversos procesos bioquímicos complejos como el metabolismo de ácidos grasos, metabolismo de ácido lipoico, biosíntesis de proteínas Fe-S, metabolismo de isoprenoides, entre otros bioquímicos <sup>(70-71)</sup>. Sin embargo, las proteínas y enzimas requeridas para realizar estos procesos bioquímicos indispensables no son codificados por los genes del genoma apicoplástico. Estas proteínas son codificadas por genes nucleares, los que son transcritos a nivel nuclear y traducidos a nivel del retículo endoplasmático rugoso, para luego ser transferidos al apicoplasto por un complejo sistema de importación de proteínas <sup>(72-73)</sup>.

### 5.3. Relación filogenética de *Plasmodium* sp. con otras especies de apicomplejos

En base al análisis filogenético reportado en esta investigación podemos indicar que el parásito analizado pertenece a la especie *Plasmodium relictum*. Esta especie de parásito ha sido catalogada como parásito generalista en nuestro país, toda vez que infecta hasta cinco especies de aves filogenéticamente distantes y el parásito se distribuye en cinco ecoregiones distintas del Perú, tales como Yungas, desierto de Sechura, la varzea de Iquitos, bosques húmedos del suroeste amazónico y en bosques húmedos de Ucayali <sup>(74)</sup>.

También, de acuerdo al análisis filogenético se evidencia que *Plasmodium* sp. forma un grupo vinculado genéticamente con parásitos apicomplejos que infectan a aves tales como *P. gallinaceum*, *H. columbae* y *P. relictum* y a primates que incluyen a *Hepatocystis* sp., *P. vinckei*, *P. inui*, *P. hylobati*, entre otros <sup>(75-76)</sup>. En conjunto estas investigaciones nos sugieren que los genomas apicoplásticos están altamente conservados dado que la mayoría de estos microorganismos son parásitos intracelulares obligados <sup>(64,77,67,68)</sup>.

## CAPÍTULO VI: PROPUESTA

El estudio de los recursos genómicos en aves, tiene gran relevancia debido a la incipiente disponibilidad de información sobre la caracterización del mismo, ya que sirve de base para dar solución al riesgo de la disminución y pérdida de la diversidad de población aviar silvestre en la amazonía peruana. Por consiguiente, realizar la caracterización del genoma apicoplástico de *Plasmodium* sp. causante de malaria aviar en la amazonia peruana, constituye una herramienta fundamental en la búsqueda de alternativas para prevenir y reducir el riesgo latente sobre la pérdida no solo en cantidad de individuos sino también de especies nativas que habitan nuestros ecosistemas amazónicos.

Los resultados de la investigación realizada, nos proporciona valiosa información sobre el secuenciamiento, ensamblaje y anotación del genoma apicoplástico del *Plasmodium* sp. causante de malaria aviar en determinadas especies de aves, el cual dará origen a nuevos estudios relacionados con el tema a nivel de la amazonía.

Además, este estudio junto a otras investigaciones de parásitos de malaria aviar está orientado al desarrollo de un biosensor portátil y versátil basado en el sistema CRISPR/Cas para la realización de nuevas investigaciones que permitirán la detección rápida, sensible, específica y de bajo costo de múltiples patógenos que causan la malaria en aves en la amazonía peruana. Así también este estudio, sirve al personal de aduanas en el país, para la aplicación de biosensores para detectar malaria aviar en muestras de sangre de aves importadas, a fin de evitar cualquier riesgo para las aves de nuestro país.

Asimismo, al Ministerio del Ambiente, en concordancia con su eje de política nacional ambiental; gestión integral de la calidad ambiental, realice la promoción, articulación intergubernamental, apoyo y desarrollo de estudios de investigación enmarcados en el tema de la presente tesis y/o malaria aviar.

También, al Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego a través del Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre, como referencia para que realice monitoreos ambientales permanentes para conocer la salud de nuestros ecosistemas amazónicos.

De igual forma, al Ministerio de Salud, aunque las especies de *Plasmodium* que afectan a las aves son distintas de las que afectan a los humanos, el estudio de la malaria en aves puede ofrecer información relevante para la investigación biomédica y el desarrollo de estrategias para combatir la malaria en humanos.

Finalmente, conocer la presencia de malaria en aves proporciona información valiosa para la investigación científica, la conservación de la biodiversidad, la comprensión de la ecología de la enfermedad y, en última instancia, para el desarrollo de estrategias de control y prevención en diversos contextos.

## CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES

- 7.1.** Se ha logrado por primera vez el secuenciamiento, ensamblado y anotación funcional del genoma apicoplástico de *Plasmodium* sp., un parásito que comúnmente causa malaria en aves de la cuenca alta del río Itaya y probablemente en otras zonas de la amazonia peruana y el Perú. Las características del genoma, tales como su forma circular, ser compacto, su tamaño, contenidos de A+T y G+C, sus genes y distribución en el genoma son similares a otros apicomplejos del género *Plasmodium*.
- 7.2.** El genoma apicoplástico de *Plasmodium* sp. ensamblado y anotado funcionalmente presenta 56 genes, de los cuales el 5,4% están involucrados en el proceso de transcripción y la mayoría de ellos en el proceso de síntesis de proteínas (78,6%). Lo cual nos sugiere que los múltiples procesos bioquímicos que se llevan a cabo en el apicoplasto de estos parásitos, tales como el metabolismo de ácidos grasos y metabolismo de isoprenoides, se atribuye a enzimas importadas, las que son codificadas por genes nucleares.
- 7.3.** El análisis filogenético nos indica que la especie de apicomplejo analizada es *Plasmodium relictum*, un parásito generalista que causa malaria en varias especies de aves de la amazonia peruana y otras regiones del Perú. El análisis filogenético también nos revela que el parásito analizado presenta alta similitud genética con otras especies de apicomplejos que infectan tanto aves como primates.

## CAPÍTULO VIII: RECOMENDACIONES

- 8.1.** Realizar análisis genómicos completos de la especie bajo estudio para disponer de información genética de los genomas mitocondrial y nuclear. También deben efectuarse análisis similares para otras especies de apicomplejos, así como de otros parásitos que infectan las aves y la fauna silvestre de la amazonia peruana.
- 8.2.** Es necesario conducir estudios para estandarizar protocolos para el cultivo *in vitro* y/o *in vivo* de los parásitos apicomplejos para conocer más sobre su fisiología, ciclo biológico, aspectos bioquímicos y moleculares, a fin de establecer estrategias para el control de estas parasitosis que pueden menguar las poblaciones de la avifauna en la amazonia peruana.
- 8.3.** Realizar réplicas del estudio de investigación de la presente tesis, en otras cuencas hidrográficas de la región Loreto.

## CAPÍTULO IX: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LaPointe DA, Atkinson CT, Samuel MD. Ecology and conservation biology of avian malaria. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2012;1249(1):211-26.
2. Scordato ESC, Kardish MR. Prevalence and beta diversity in avian malaria communities: host species is a better predictor than geography. *Journal of Animal Ecology*. 2014;83(6):1387-97.
3. Dutra D de A, Fecchio A, Braga ÉM, Poulin R. Migratory behaviour does not alter cophylogenetic congruence between avian hosts and their haemosporidian parasites. *Parasitology*. junio de 2022;149(7):905-12.
4. Videvall E. Genomic Advances in Avian Malaria Research. *Trends Parasitol*. marzo de 2019;35(3):254-66.
5. Galen S, Nunes R, Sweet P, Perkins S. Integrating coalescent species delimitation with analysis of host specificity reveals extensive cryptic diversity despite minimal mitochondrial divergence in the malaria parasite genus *Leucocytozoon*. *BMC Evolutionary Biology*. 1 de diciembre de 2018;18.
6. Ber JL, Goddard J, Nations TM, Outlaw DC. Survey and Phylogenetic Analysis of *Leucocytozoon* (Apicomplexa: Haemosporida) Parasites in Mississippi Black Flies (Diptera: Simuliidae). *Journal of Medical Entomology*. 1 de mayo de 2022; 59(3):1042-6.
7. 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. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*. 2000; 267(1452):1583-9.
8. 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. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*. 2000; 267(1452):1583-9.
9. Bowman S, Lawson D, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Churcher CM, et al. The complete nucleotide sequence of chromosome 3 of *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 1999;400(6744):532-8
10. Horrocks P, Bowman S, Kyes S, Waters AP, Craig A. La Investigación del paludismo en la era posgenómica. 2001; 4:129-42.
11. Pérez-Tris, J. (2009). La parasitología ecológica en la era de la genética molecular: *Ecosistemas*, 18(1). Recuperado a partir de <https://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/view/76>

12. Hamish R. Baron, Laryssa Howe, Arvind Varsani, Robert J. T. Doneley; Disease Screening of Three Breeding Populations of Adult Exhibition Budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) in New Zealand Reveals a High Prevalence of a Novel Polyomavirus and Avian Malaria Infection. *Avian Dis* 1 March 2014; 58 (1): 111–117. doi: <https://doi.org/10.1637/10604-063013-REG.1>
13. Garcia – Longoria Batanate, Luz Hellgren, Olof y Bensch, Staffan (2014). Molecular identification of the chitinase genes in plasmodium relictum. <http://hdl.handle.net/10662/5068>. DOI.10.1186/1475-2875-13-239
14. Marzal A, García-Longoria L, Cárdenas Callirgos JM, Sehgal RN. Invasive avian malaria as an emerging parasitic disease in native birds of Peru. *Biol Invasions*. 2015; 17(1):39-45.
15. Valkiūnas G, Ilgūnas M, Bukauskaitė D, Palinauskas V, Bernotienė R, Iezhova TA. Molecular characterization and distribution of Plasmodium matutinum, a common avian malaria parasite. *Parasitology*. 2017; 144(13):1726-35.
16. Böhme, Ulrike et al. "Complete avian malaria parasite genomes reveal features associated with lineage-specific evolution in birds and mammals." *Genome research* vol. 28,4 (2018): 547-560. doi:10.1101/gr.218123.116.
17. Ellis, V. A., Kalbskopf, V., Ciloglu, A., Duc, M., Huang, X., Inci, A., Bensch, S., Hellgren, O., & Palinauskas, V. (2022). Genomic sequence capture of Plasmodium relictum in experimentally infected birds. *Parasites & vectors*, 15(1), 267. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05373-w>.
18. Valkiūnas G, Iezhova TA. Keys to the avian malaria parasites. *Malar J*. diciembre de 2018; 17(1):1-24.
19. Valkiūnas, G., Ilgūnas, M., Bukauskaitė, D. et al. Characterization of *Plasmodium relictum*, a cosmopolitan agent of avian malaria. *Malar J* 17, 184 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2325-2>
20. Atkinson, Carter T., y Samuel, M. D. (2010). "Avian malaria Plasmodium relictum in native Hawaiian forest birds: epizootiology and demographic impacts on āpapane Himatione sanguinea". *Journal of Avian Biology*, 41(4), 357–366. <https://doi.org/10.1111/j.1600-048X.2009.04915.x>
21. Atkinson, Carter T., y LaPointe, D. A. (2009). "Introduced avian diseases, climate change, and the future of Hawaiian honeycreepers". *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 23(1), 53–63. <https://doi.org/10.1647/2008-059.1>



22. Valkiūnas, G., Ilgūnas, M., Bukauskaitė, D. *et al.* Characterization of *Plasmodium relictum*, a cosmopolitan agent of avian malaria. *Malar J* **17**, 184 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2325-2>
23. Ferraguti, M. Figuerola B, J, et al. Biodiversity and vector-borne diseases effects of landscape, mosquito and vertebrate communities on the transmission of west Nile virus and avian malaria parasite (2017).
24. García-Longoria L, Ruiz-López MJ. Importancia de la genómica en aves para entender su interacción con patógenos: Ecosistemas. 2020; 29(2):1969-1969.
25. Valkiūnas G. Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia [Internet]. 1.<sup>a</sup> ed. Boca Raton, Estados Unidos: CRC Press; 2004 [citado 28 de junio de 2022]. 932 p. Disponible en: <https://www.taylorfrancis.com/books/mono/10.1201/9780203643792/avian-malaria-parasites-haemosporidia-gediminas-valki%C5%ABnas>
26. Bensch S, Hellgren O, Pérez -Tris J. MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. *Mol Ecol Resour.* 2009;9(5):1353-8.
27. Poulin R. Evolutionary Ecology of Parasites [Internet]. 2<sup>a</sup> ed. Estados Unidos: Princeton University Press; 2011 [citado 28 de junio de 2022]. Disponible en: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/9781400840809/html>
28. Cornet S, Nicot A, Rivero A, Gandon S. Evolution of Plastic Transmission Strategies in Avian Malaria. *PLOS Pathogens.* 2014; 10(9):e1004308.
29. Santiago-Alarcon, D., y Marzal, A. (2020). Avian Malaria and Related Parasites in the Tropics. *Ecology, Evolution and Systematics.* Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-51633-8\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-030-51633-8_9)
30. Fecchio, A., Chagas, C. R. F., Bell, J. A., y Kirchgatter, K. (2020). "Evolutionary ecology, taxonomy, and systematics of avian malaria and related parasites". *Acta Tropica*, 204(January), 105364. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105364>
31. Fecchio, A., Wells, K., Bell, J. A., Tkach, V. V., Lutz, H. L., Weckstein, J. D., Clegg, S. M., y Clark, N. J. (2019). "Climate variation influences host specificity in avian malaria parasites". *Ecology Letters*, 22(3), 547–557. <https://doi.org/10.1111/ele.13215>
32. Atkinson C. Avian Malaria. En: *Parasitic Diseases of Wild Birds*. 1<sup>a</sup> ed. Wiley-Blackwell; 2009. p. 35-53.
33. Hajar G G, Quino A H, Padilla R C, Montoya P Y. Variabilidad genética de *Plasmodium falciparum* en pacientes con malaria grave y malaria no

- complicada en Iquitos - Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. 2002; 19 (3):131-5.
34. Friend M, Franson JC. *Field Manual of Wildlife Diseases - General Field Procedures and Diseases of Birds* [Internet]. CreateSpace Independent Publishing Platform; 2012. 438 p. Disponible en: <https://digitalcommons.unl.edu/zoonoticpub/19>
  35. Ritchie BW, Harrison GJ, Harrison LR. *Avian medicine: principles and application*. Lake Worth, Fla.: Wingers Pub.; 1994. 1384 p.
  36. Smith, J.D. (1965) *Introducción a la parasitología animal*. (1º Edición) Pp. 89-113. México: Editorial Continental, S.A.
  37. Marzal, Alfonso, Ricklefs, R. E., Valkiunas, G., Albayrak, T., Arriero, E., Bonneaud, C., Czirják, G. A., Ewen, J., Hellgren, O., Hořáková, D., Iezhova, T. A., Jensen, H., Križanauskiene, A., Lima, M. R., de Lope, F., Magnussen, E., Martin, L. B., Møller, A. P., Palinauskas, V., ... Bensch, S. (2011). "Diversity, loss, and gain of malaria parasites in a globally invasive bird". *PLoS ONE*, 6(7), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021905>
  38. Hellgren, Olof, Atkinson, C. T., Bensch, S., Albayrak, T., Dimitrov, D., Ewen, J. G., Kim, K. S., Lima, M. R., Martin, L., Palinauskas, V., Ricklefs, R., Sehgal, R. N. M., Valkiunas, G., Tsuda, Y., y Marzal, A. (2015). "Global phylogeography of the avian malaria pathogen *Plasmodium relictum* based on MSP1 allelic diversity". *Ecography*, 38(8), 842–850. <https://doi.org/10.1111/ecog.01158>
  39. Peirce MA. Distribution and host-parasite check-list of the haematozoa of birds in Western Europe. *J Nat Hist*. 1981; 15(3):419-58.
  40. Merino S, Moreno J, Sanz JJ, Arriero E. Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). *Proc Biol Sci*. 22 de diciembre de 2000; 267(1461):2507-10.
  41. 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 - Diversity, Prevalence, and Host Specificity of Avian *Plasmodium* and *Haemoproteus* in a Western Amazon Assemblage. *Ornithological Monographs*. 2013; 76(1):1-47.
  42. De Robertis (h) – Hib – Ponzio. *Biología celular y molecular*. 15ª ed. Buenos Aires. El Ateneo. 2001.
  43. Abu-Jamous B, Fa R, Nandi AK. Central Dogma of Molecular Biology. En: *Integrative Cluster Analysis in Bioinformatics* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2015 [citado 25 de mayo de 2017]. p. 33-52. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118906545.ch4/summary>

44. Sambrook J, Frisch E, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Vol. 2. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
45. Eckert KA, Kunkel TA. DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. *Genome Res.* 991; 1 (1):17-24.
46. Schulenberg TS. Birds of Peru [Internet]. 2<sup>a</sup> ed. Princeton, New Jersey: Princeton University Press; 2010 [citado 28 de junio de 2022]. 664 p. Disponible en: <https://press.princeton.edu/books/paperback/9780691130231/birds-of-peru>
47. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/caracterizacion-genomica>
48. Karp, G. Biología celular y molecular. 1era. Ed. México. Mc Graw – Hill Interamericana.1998
49. Rivero de Aguilar J., Hussing, L. 2020. Malaria aviar y sistema inmunitario: la función del MHC. *Ecosistemas* 29(2):1976. <https://doi.org/10.7818/ECOS.1976>
50. Atkinson C. Avian Malaria. En: *Parasitic Diseases of Wild Birds*. 1<sup>a</sup> ed. Wiley-Blackwell; 2009. p. 35-53.
51. Amala SEaN, Chidiebere Priscilla. Malaria in children, its association with abo blood group and haemoglobin genotype. *International Journal of Development Research*. 2015;5( 11):5958-62
52. Wajid B, Serpedin E. Review of general algorithmic features for genome assemblers for next generation sequencers. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2012; 10(2):58-73.
53. [https://www.cell.com/current-biology/pdf/S0960-9822\(14\)00025-6.pdf](https://www.cell.com/current-biology/pdf/S0960-9822(14)00025-6.pdf)
54. Young, B.E. 2007. Distribución de las especies endémicas en la vertiente oriental de los Andes en Perú y Bolivia. NatureServe, Arlington, Virginia, EE UU.
55. Alejandro Riquelme y Manuel Pinto 1 Grupo de Investigación Enológica (GIE). Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Casilla 1004, Santiago, Chile, manpinto@uchile.cl, www.gie.uchile.cl.
56. Plenge M. A., «List of the Birds of Peru»; 2021. 42 p.
57. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* (Oxford, England). agosto de 2014;30(15):2114-20.
58. 33. Dierckxsens N, Mardulyn P, Smits G. NOVOPlasty: de novo assembly of organelle genomes from whole genome data. *Nucleic Acids Res.* 28 de 2017; 45(4):e18.

- 59.34. Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 15 de junio de 2012; 28(12):1647-9.
60. Apicoplasts Genome List - NCBI [Internet]. [citado 28 de junio de 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse#!/organelles/>
61. Mathur V, Kwong WK, Husnik F, Irwin NAT, Kristmundsson Á, Gestal C, et al. Phylogenomics Identifies a New Major Subgroup of Apicomplexans, Marosporida class nov., with Extreme Apicoplast Genome Reduction. *Genome Biology and Evolution*. 2021; 13(2):evaa244.
62. Imura T, Sato S, Sato Y, Sakamoto D, Isobe T, Murata K, et al. The apicoplast genome of *Leucocytozoon caulleryi*, a pathogenic apicomplexan parasite of the chicken. *Parasitol Res*. Marzo de 2014; 113(3):823-8.
63. Arisue N, Hashimoto T, Mitsui H, Palacpac NMQ, Kaneko A, Kawai S, et al. The Plasmodium Apicoplast Genome: Conserved Structure and Close Relationship of *P. ovale* to Rodent Malaria Parasites. *Mol Biol Evol*. 2012; 29(9):2095-9.
64. Sato S. The apicomplexan plastid and its evolution. *Cell Mol Life Sci*. Abril de 2011; 68(8):1285-96.
65. Wilson (Iain) R. J. M., Denny PW, Preiser PR, Rangachari K, Roberts K, Roy A, et al. Complete Gene Map of the Plastid-like DNA of the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Journal of Molecular Biology*. 1996; 261(2):155-72.
66. Saxena V, Garg S, Tripathi J, Sharma S, Pakalapati D, Subudhi AK, et al. *Plasmodium vivax* apicoplast genome: A comparative analysis of major genes from Indian field isolates. *Acta Tropica*. 2012; 122(1):138-49.
67. Arisue N, Hashimoto T. Phylogeny and evolution of apicoplasts and apicomplexan parasites. *Parasitol Int*. 2015; 64(3):254-9.
68. Huang Y, He L, Hu J, He P, He J, Yu L, et al. Characterization and annotation of *Babesia orientalis* apicoplast genome. *Parasit Vectors*. 16 de octubre de 2015; 8:543.
69. Wang X, Wang J, Liu J, Liu A, He X, Xu J, et al. Comparative analysis of apicoplast genomes of *Babesia* infective to small ruminants in China. *Parasit Vectors*. 24 de junio de 2019; 12(1):312.
70. Kloehn J, Lacour CE, Soldati-Favre D. The metabolic pathways and transporters of the plastid organelle in Apicomplexa. *Curr Opin Microbiol*. 2021; 63:250-8.

71. Kadian K, Gupta Y, Singh HV, Kempaiah P, Rawat M. Apicoplast Metabolism: Parasite's Achilles' Heel. *Curr Top Med Chem*. 2018; 18(22):1987-97.
72. Fellows JD, Cipriano MJ, Agrawal S, Striepen B. A Plastid Protein That Evolved from Ubiquitin and Is Required for Apicoplast Protein Import in *Toxoplasma gondii*. *mBio*. 2017; 8(3):e00950-17.
73. Agrawal S, Chung DWD, Ponts N, Dooren GG van, Prudhomme J, Brooks CF, et al. An Apicoplast Localized Ubiquitylation System Is Required for the Import of Nuclear-encoded Plastid Proteins. *PLOS Pathogens*. 2013; 9(6):e1003426.
74. Garcia-Longoria L, Muriel J, Magallanes S, Villa-Galarce ZH, Ricopa L, Inga-Díaz WG, et al. Diversity and host assemblage of avian haemosporidians in different terrestrial ecoregions of Peru. *Current Zoology*. 2022; 68(1):27.
75. Putaporntip C, Kuamsab N, Seethamchai S, Pattanawong U, Rojrung R, Yanmanee S, et al. Cryptic *Plasmodium inui* and *P. fieldi* infections among symptomatic malaria patients in Thailand. *Clin Infect Dis*. 2021; ciab1060.
76. Eyles DE, Laing AB, Fong YL. *Plasmodium fieldi* sp. nov., a new species of malaria parasite from the pigtailed macaque in Malaya. *Ann Trop Med Parasitol*. 1962; 56:242-7.
77. Cepeda AS, Andreína Pacheco M, Escalante AA, Alzate JF, Matta NE. The apicoplast of *Haemoproteus columbae*: A comparative study of this organelle genome in Haemosporida. *Mol Phylogenet Evol*. 2021; 161:107185.

## **ANEXOS**

1. Permiso aprobado con RDG. N°D000266-2021-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS; que autoriza la colecta de muestra de sangre de aves

INSTITUTO PERUANO DE SERVICIOS FORESTALES Y FAUNA SILVESTRE  
SERFOR  
Calle: Universidad Nacional  
Sede: Lima  
Fecha: 13 de mayo del 2021

**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:**

**SE RESUELVE:**

**Artículo 1°.-** Otorgar la autorización con fines de investigación científica de fauna silvestre fuera de Áreas Naturales Protegidas, al señor **Joseph Dylan Maddox**, ciudadano de nacionalidad estadounidense, identificada con Pasaporte N° 510402774, para la realización de la investigación científica titulada: ***“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”***, en virtud de las consideraciones antes expuestas, correspondiéndole el Código de Autorización N° AUT-IFS-2021-026.

**Artículo 2°.-** La investigación científica autorizada, implica la captura temporal de hasta treinta (30) individuos por cada una de las ciento un (101) especies de aves contempladas en el estudio, para la extracción de muestras de sangre (<75 µL) por cada individuo, según las especies y cantidades descritas en el Anexo N° 2, con el objetivo de realizar análisis parasitológicos y análisis de ADN de los parásitos de las aves, para desarrollar un biosensor portátil y versátil basado en el sistema CRISPR/Cas para la detección de múltiples patógenos que causan la malaria en aves. Asimismo, se indica que el proyecto de investigación no contempla la captura o colecta de especies en categorías de amenaza o CITES.

**Artículo 3°.-** La investigación se circunscribe a la Concesión para Conservación Cuenca Alta del río Itaya, distrito de San Juan Bautista, provincia de Maynas, departamento de Loreto, fuera Áreas Naturales Protegidas, y de territorio de

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. 070-2013-PCM y la Tercera Disposición Complementaria Final del D.S. 026-2016-PCM. Su autenticidad e integridad pueden ser contrastadas a través de la siguiente dirección web: Url: <https://sgd.serfor.gob.pe/validadorDocumental/> Clave: YOJLY26

## 2. Captura de aves



1. Colocar redes de neblina a nivel de sotobosque de forma individual o en sistemas de 2 a 3 redes.



2. Revisar las redes en intervalo de 30 minutos.



3. Sacar a las aves de las redes de neblina



4. Colectar las aves en bolsas de tela.



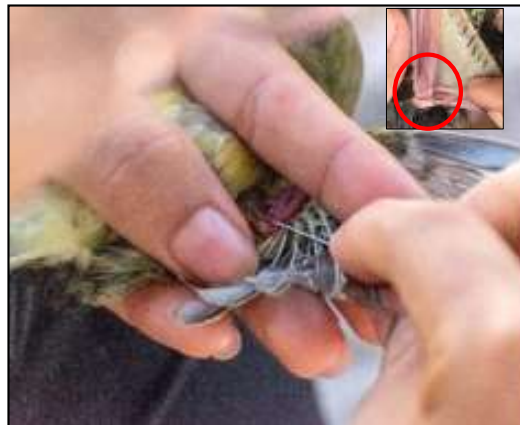
5. identificar las aves.



### 3. Toma de muestras de sangre de aves



1. Materiales para desinfección de manos y extracción de sangre.



2. Punción en la vena braqueal.



3. Tomamos la muestra de sangre con un capilar.



4. Impregnamos las muestras de sangre en las tarjetas Whatman FTA.



5. Liberación de aves.

#### 4. Procedimientos para la purificación de ADN de muestras de sangre de aves.



1. Se obtuvo segmentos de del papel Whatman impregnados con las muestras de sangre de las aves infectadas y se transfirió a microtubos de 1.5 ml.



2. Se agregó 300  $\mu$ l de TNES con 10  $\mu$ l de proteinasa K (10 mg/ml) y se incubó a 56°C por 5 h.



3. Se agregó 85  $\mu$ l de cloruro de sodio (NaCl) 5 M y homogenizó en un vortex por 15 s



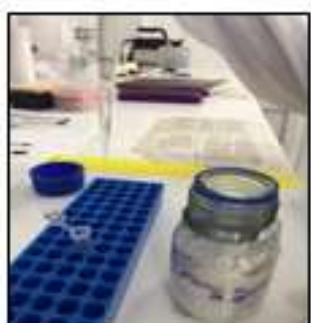
4. Se centrifugó a 21 000 x g por 7 minutos y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 1.5 ml



5. Se agregó 500  $\mu$ l de isopropinol y se homogenizó suavemente invirtiendo los microtubos



6. Se centrifugó a 21 000 x g por 15 minutos para precipitar el ADN y se descartó el sobrenadante.



7. Se agregó 500  $\mu$ l de etanol al 70% para lavar el ADN precipitado.



8. Se centrifugó a 21 000 x g por 10 minutos y se descartó el sobrenadante.



9. Se agregó 100  $\mu$ l de tampón TE (Tris 10 Mm, EDTA 1 Mm) para disolver el ADN y se almacenó a -20 °C.



10. Se verificó la pureza y concentración del ADN en el Nanodrop.

## 5. Características de los genomas apicoplásticos de diferentes especies de apicomplejos depositados en el GenBank

Especie	Cepa	Grupo taxonómico	Bio Muestra	Bio Proyecto	Código GenBank	Tamaño (kb)	AT%	GC%	Nro. Genes que codifican proteínas
<i>Babesia microti</i>	RI	Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMEA3139016	PRJEA172341	NC_034636.1/LK028575.1	28.66	85.94	14.06	31
<i>Babesia orientalis</i>		Eukaryota;Protists;Apicomplexans		PRJNA298196	NC_028029.1/KT428643.1	33.20	79.03	20.97	38
<i>Besnoitia besnoiti</i>	Bb-Ger1	Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMN04330037	PRJNA544713	NW_021703914.1/CM008359.1	35.14	78.34	21.66	27
<i>Cardiosporidium cionae</i>	ESH_2018	Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMN16226513	PRJNA664590	CM027049.1	36.47	71.98	28.02	nr
<i>Cyclospora cayetanensis</i>		Eukaryota;Protists;Apicomplexans		PRJNA305019	NC_028632.1/KP866208.1	34.16	78.05	21.95	28
<i>Eimeria falciformis</i>	Bayer Haberkorn 1970	Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMN02483514	PRJNA232109	CM008276.1	32.17	75.95	24.05	nr
<i>Eimeria tenella</i>		Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMEA7524401	PRJEB43184	HG994977.1	34.75	79.46	20.54	nr
<i>Eimeria tenella</i>	Houghton	Eukaryota;Protists;Apicomplexans		PRJNA263385	NC_004823.1	34.75	79.36	20.64	28
<i>Hepaticystis sp.</i>		Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMEA5861419	PRJEB32891	LR699571.1	27.01	86.58	13.42	27
<i>Leucocytosoon caulleryi</i>	Niigata	Eukaryota;Protists;Apicomplexans		PRJNA226179	NC_022667.1/AP013071.1	34.78	85.08	14.92	30
<i>Plasmodium berghei</i>	SP11 RLL	Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMEA1323895	PRJEB11993	LT608279.1	30.90	85.22	14.78	21
<i>Plasmodium berghei</i>	SP11 Antwerpcl1	Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMEA1323894	PRJEB11993	LT608263.1	30.86	85.20	14.80	22
<i>Plasmodium berghei</i>	NK65 ny	Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMEA1323892	PRJEB11993	LT608151.1	30.86	85.20	14.80	22
<i>Plasmodium berghei</i>	NK65e	Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMEA1323893	PRJEB11993	LT614641.1	30.94	85.18	14.82	22
<i>Plasmodium brasilianum</i>	Bolivian I	Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMN05844987	PRJNA344798	CM007351.2	28.95	87.43	12.57	nr
<i>Plasmodium chabaudi</i>	AS	Eukaryota;Protists;Apicomplexans		PRJNA317457	NC_023293.1	29.62	86.30	13.70	31
<i>Plasmodium cynomolgi</i>	M	Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMEA695046	PRJEB2243	LT841394.1	34.52	85.76	14.24	nr
<i>Plasmodium falciparum</i>		Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMEA3403284	PRJEB8808	LR131385.1	34.24	85.78	14.22	nr
<i>Plasmodium falciparum</i>		Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMEA3448425	PRJEB8808	LR131480.1	34.24	85.78	14.22	nr
<i>Plasmodium falciparum</i>		Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMEA3448424	PRJEB8808	LR131465.1	34.25	85.79	14.21	nr
<i>Plasmodium falciparum</i>		Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMEA3207711	PRJEB8808	LR131305.1	34.25	85.79	14.21	nr
<i>Plasmodium falciparum</i>	HB3	Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMEA3359303	PRJEB8808	LR131353.1	34.25	85.79	14.21	nr
<i>Plasmodium falciparum</i>		Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMEA3184325	PRJEB8808	LR131449.1	43.09	85.87	14.13	nr
<i>Plasmodium falciparum</i>	NF166	Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMN06175826	PRJNA498674	CM019796.1	44.46	84.62	15.38	nr
<i>Plasmodium falciparum</i>	NF54	Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMN06175781	PRJNA498674	CM019799.1	45.35	86.42	13.58	nr
<i>Plasmodium falciparum</i>		Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMEA2697755	PRJEB8808	LR131369.1	45.63	85.11	14.89	nr
<i>Plasmodium falciparum</i>		Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMEA3460432	PRJEB8808	LR131496.1	46.60	84.95	15.05	nr
<i>Plasmodium falciparum</i>	7G8	Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMN06175780	PRJNA498674	CM019770.1	46.79	86.47	13.53	nr
<i>Plasmodium falciparum</i>		Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMEA3403285	PRJEB8808	LR131401.1	51.53	84.93	15.07	nr
<i>Plasmodium falciparum</i>	NF135.C10	Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMN06175888	PRJNA498674	CM019801.1	53.27	84.98	15.02	nr
<i>Plasmodium falciparum</i>	HB3	Eukaryota;Protists;Apicomplexans		PRJNA166973	DQ642846.1	29.53	86.84	13.16	nr
<i>Plasmodium falciparum</i>	KH1	Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMEA3359304	PRJEB8808	LR131433.1	34.25	85.79	14.21	nr
<i>Plasmodium falciparum</i>	NF54	Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMN08196849	PRJNA422809	CM022906.1	34.25	85.78	14.22	28
<i>Plasmodium falciparum</i>	GB4	Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMEA3309817	PRJEB8808	LR131417.1	46.66	84.63	15.37	nr
<i>Plasmodium falciparum</i>	KH2	Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMEA3309819	PRJEB8808	LR131321.1	50.28	84.69	15.31	nr
<i>Plasmodium falciparum</i>	type strain: I	Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMEA2602749	PRJEB8808	LR131337.1	51.09	84.62	15.38	nr
<i>Plasmodium gaboni</i>	SY75	Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMN04053639	PRJNA329100	NW_017385168.1/CM003884.1	29.39	86.84	13.16	29
<i>Plasmodium gallinaceum</i>	8A	Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMEA2074505	PRJNA354190	NC_031963.1/LN835293.1	29.46	87.10	12.90	31
<i>Plasmodium knowlesi</i>	H	Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMEA2272753	PRJNA33651	NC_051845.1/LR761315.1	30.64	85.97	14.03	29
<i>Plasmodium malariae</i>		Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMEA3923181	PRJNA348337	NC_031401.1	34.32	86.30	13.70	30

Especie	Cepa	Grupo taxonómico	Bio Muestra	Bio Proyecto	Código GenBank	Tamaño (kb)	AT%	GC%	Nro. Genes que codifican proteínas
<i>Plasmodium malariae</i>		Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMEA3923181	PRJNA348337	LT594636.1	34.32	86.30	13.70	30
<i>Plasmodium ovale</i>	PocGH01	Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMEA680296	PRJEB14392	LT594596.1	28.30	87.49	12.51	30
<i>Plasmodium ovale</i>	PowCR01	Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMEA2394724	PRJEB14392	LT594519.1	31.16	80.80	19.20	19
<i>Plasmodium reichenowi</i>	SY57	Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMN04053640	PRJNA329100	NW_017962150.1/CM003883.1	24.24	87.60	12.40	30
<i>Plasmodium relictum</i>	SGS1	Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMEA2385706	PRJNA354189	NC_031964.1/LN835310.1	29.37	86.94	13.06	30
<i>Plasmodium vinckei</i>		Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMEA7130172	PRJEB19355	LR865436.1	28.57	86.33	13.67	9
<i>Plasmodium vinckei</i>	vinckei	Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMEA5241084	PRJNA667746	NW_023618544.1/LR215071.1	29.54	86.27	13.73	28
<i>Plasmodium vinckei</i>	lentum	Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMEA7129637	PRJEB19355	LR865377.1	28.57	85.86	14.14	24
<i>Plasmodium vinckei</i>	brucechwatti	Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMEA7128593	PRJEB19355	LR865393.1	29.33	86.26	13.74	24
<i>Plasmodium vivax</i>	North Korean	Eukaryota;Protists;Apicomplexans		PRJNA67239	JQ437259.1	29.35	86.72	13.28	31
<i>Plasmodium vivax</i>	Mauritania I	Eukaryota;Protists;Apicomplexans		PRJNA67237	JQ437258.1	29.40	86.72	13.28	31
<i>Plasmodium vivax</i>	Brazil I	Eukaryota;Protists;Apicomplexans		PRJNA67065	JQ437257.1	29.40	86.72	13.28	31
<i>Plasmodium yoelii</i>	YM	Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMEA655836	PRJEB5705	LK934643.1	29.74	85.93	14.07	30
<i>Plasmodium yoelii</i>	17X	Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMEA1032065	PRJNA317465	NW_019223693.1	29.40	86.07	13.93	30
<i>Theileria parva</i>	Marikebuni_3292	Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMN15466802	PRJNA656581	CM026505.1	37.23	80.45	19.55	nr
<i>Theileria parva</i>	Muguga	Eukaryota;Protists;Apicomplexans		PRJNA16136	NC_007758.1/AAGK01000009.1	39.58	80.52	19.48	44
<i>Toxoplasma gondii</i>	ME49xCTG	Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMN15203634	PRJNA638608	CM033581.1	34.54	78.50	21.50	nr
<i>Toxoplasma gondii</i>	ME49	Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMN15203627	PRJNA638608	CM033582.1	34.78	78.68	21.32	nr
<i>Toxoplasma gondii</i>	RH88	Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMN15203629	PRJNA638608	CM033583.1	34.86	78.85	21.15	nr
<i>Toxoplasma gondii</i>	TR01	Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMN13338796	PRJNA590780	CM019736.1	34.96	78.53	21.47	nr
<i>Toxoplasma gondii</i>	ME49	Eukaryota;Protists;Apicomplexans		PRJNA32719	NC_001799.1	35.00	78.57	21.43	26
<i>Toxoplasma gondii</i>	RH-88	Eukaryota;Protists;Apicomplexans	SAMN12710240	PRJNA279557	CM023094.1	35.03	78.74	21.26	29
<b>Promedio</b>						<b>32.92</b>	<b>82.65</b>	<b>15.75</b>	
<b>Desviación estándar</b>						<b>7.21</b>	<b>11.09</b>	<b>3.72</b>	

## 6. Lista de aves capturadas.

N°	Nombre científico
1	<i>Glyphorynchus spirurus</i>
2	<i>Philydor pyrrhodus</i>
3	<i>Glyphorynchus spirurus</i>
4	<i>Mionectes oleagineus</i>
5	<i>Glyphorynchus spirurus</i>
6	<i>Hyloctistes sublatus</i>
7	<i>Myrmoborus myotherinus</i>
8	<i>Automolus infuscatus</i>
9	<i>Mionectes oleagineus</i>
10	<i>Glyphorynchus spirurus</i>
11	<i>Dixiphia pipra</i>
12	<i>Phlegopsis erythroptera</i>
13	<i>Glyphorynchus spirurus</i>
14	<i>Xenops minutus</i>
15	<i>Pithys albifrons</i>
16	<i>Xenops minutus</i>
17	<i>Glyphorynchus spirurus</i>
18	<i>Machaeropterus regulus</i>
19	<i>Willisornis poecilinotus</i>
20	<i>Lepidothrix coronata</i>
21	<i>Glyphorynchus spirurus</i>
22	<i>Philydor pyrrhodus</i>
23	<i>Willisornis poecilinotus</i>
24	<i>Lepidothrix coronata</i>
25	<i>Selenidera reinwardtii</i>
26	<i>Pithys albifrons</i>
27	<i>Myrmeciza fortis</i>
28	<i>Pithys albifrons</i>
29	<i>Cyanocompsa cyanoides</i>
30	<i>Hyloctistes sublatus</i>

N°	Nombre científico
31	<i>Selenidera reinwardtii</i>
32	<i>Mionectes oleagineus</i>
33	<i>Dixiphia pipra</i>
34	<i>Myrmeciza fortis</i>
35	<i>Chloroceryle aenea</i>
36	<i>Gynnopithys leucaspis</i>
37	<i>Dixiphia pipra</i>
38	<i>Myrmoborus myotherinus</i>
39	<i>Lepidothrix coronata</i>
40	<i>Myrmoborus myotherinus</i>
41	<i>Microcerculus marginatus</i>
42	<i>Formicarius colma</i>
43	<i>Willisornis poecilinotus</i>
44	<i>Myrmeciza fortis</i>
45	<i>Lepidothrix coronata</i>
46	<i>Glyphorynchus spirurus</i>
47	<i>Microcerculus marginatus</i>
48	<i>Willisornis poecilinotus</i>
49	<i>Automolus infuscatus</i>
50	<i>Lepidothrix coronata</i>
51	<i>Phlegopsis erythroptera</i>
52	<i>Myrmeciza fortis</i>
53	<i>Microcerculus marginatus</i>
54	<i>Phlegopsis erythroptera</i>
55	<i>Microcerculus marginatus</i>
56	<i>Hypocnemis peruviana</i>
57	<i>Glyphorynchus spirurus</i>
58	<i>Myrmoborus myotherinus</i>
59	<i>Mionectes oleagineus</i>
60	<i>Microcerculus marginatus</i>

N°	Nombre científico
61	<i>Mionectes oleagineus</i>
62	<i>Terenotriccus erythrurus</i>
63	<i>Glyphorynchus spirurus</i>
64	<i>Schistocichla leucostigma</i>
65	<i>Glyphorynchus spirurus</i>
66	<i>Mionectes oleagineus</i>
67	<i>Mionectes oleagineus</i>
68	<i>Lepidothrix coronata</i>
69	<i>Onychorhynchus coronatus</i>
70	<i>Lepidothrix coronata</i>
71	<i>Glyphorynchus spirurus</i>
72	<i>Mionectes oleagineus</i>
73	<i>Lepidothrix coronata</i>
74	<i>Mionectes oleagineus</i>
75	<i>Glyphorynchus spirurus</i>
76	<i>Catharus ustulatus</i>
77	<i>Thryothorus coraya</i>
78	<i>Myrmotherula hauxwelli</i>
79	<i>Lepidothrix coronata</i>
80	<i>Mynotherula axillaris</i>
81	<i>Mionectes oleagineus</i>
82	<i>Glyphorynchus spirurus</i>
83	<i>Automolus infuscatus</i>
84	<i>Galbula albirostris</i>
85	<i>Chloroceryle inda</i>
86	<i>Onychorhynchus coronatus</i>
87	<i>Mionectes oleagineus</i>
88	<i>Glyphorynchus spirurus</i>
89	<i>Automolus infuscatus</i>
90	<i>Microcerculus marginatus</i>

N°	Nombre científico
91	<i>Lepidothrix coronata</i>
92	<i>Lepidothrix coronata</i>
93	<i>Automolus infuscatus</i>
94	<i>Lepidothrix coronata</i>
95	<i>Glyphorhynchus spirurus</i>
96	<i>Glyphorhynchus spirurus</i>
97	<i>Hypocnemis peruviana</i>
98	<i>Lepidothrix coronata</i>
99	<i>Microcerculus marginatus</i>
100	<i>Willisornis poecilinotus</i>
101	<i>Glyphorhynchus spirurus</i>
102	<i>Mionectes oleagineus</i>
103	<i>Xenops minutus</i>
104	<i>Xiphorhynchus elegans</i>
105	<i>Dixiphia pipra</i>
106	<i>Mionectes oleagineus</i>
107	<i>Thamnonanes ardesiacus</i>
108	<i>Formicarius colma</i>
109	<i>Deconychura stictolaena</i>
110	<i>Epinecrophylla erythrura</i>
111	<i>Mionectes oleagineus</i>
112	<i>Pithys albifrons</i>
113	<i>Lepidothrix coronata</i>
114	<i>Glyphorhynchus spirurus</i>
115	<i>Nonnula brunnea</i>
116	<i>Myrmoborus myotherinus</i>
117	<i>Thamnonanes caesius</i>
118	<i>Dendrocincla fuliginosa</i>
119	<i>Glyphorhynchus spirurus</i>
120	<i>Pipra erythrocephala</i>

N°	Nombre científico
121	<i>Glyphorhynchus spirurus</i>
122	<i>Lepidothrix coronata</i>
123	<i>Mionectes oleagineus</i>
124	<i>Mynotherula axillaris</i>
125	<i>Myrmoborus myotherinus</i>
126	<i>Lepidothrix coronata</i>
127	<i>Myrmotherula hauxwelli</i>
128	<i>Dixiphia pipra</i>
129	<i>Pithys albifrons</i>
130	<i>Microcerculus marginatus</i>
131	<i>Machaeropterus regulus</i>
132	<i>Formicarius colma</i>
133	<i>Automolus infuscatus</i>
134	<i>Epinecrophylla erythrura</i>
135	<i>Pteroglossus pluricinctus</i>
136	<i>Pteroglossus pluricinctus</i>
137	<i>Pteroglossus pluricinctus</i>
138	<i>Mionectes oleagineus</i>
139	<i>Myrmeciza fortis</i>
140	<i>Pipra erythrocephala</i>
141	<i>Xenops minutus</i>
142	<i>Epinecrophylla haematonata</i>
143	<i>Gynnopithys leucaspis</i>
144	<i>Machaeropterus regulus</i>
145	<i>Megastictus margaritatus</i>
146	<i>Megastictus margaritatus</i>
147	<i>Pithys albifrons</i>
148	<i>Dendrocincla merula</i>
149	<i>Megastictus margaritatus</i>
150	<i>Willisornis poecilinotus</i>

N°	Nombre científico
151	<i>Hyloctistes sublatius</i>
152	<i>Thamnonanes caesius</i>
153	<i>Glyphorhynchus spirurus</i>
154	<i>Schistocichla leucostigma</i>
155	<i>Gynnopithys leucaspis</i>
156	<i>Guttatus minimus</i>
157	<i>Myrmoborus myotherinus</i>
158	<i>Thamnonanes ardesiacus</i>
159	<i>Lepidothrix coronata</i>
160	<i>Myrmoborus myotherinus</i>
161	<i>Lepidothrix coronata</i>
162	<i>Hypocnemis peruviana</i>
163	<i>Hylophylax naevius</i>
164	<i>Mionectes oleagineus</i>
165	<i>Microcerculus marginatus</i>
166	<i>Ramphocelus carbo</i>
167	<i>Schistocichla leucostigma</i>
168	<i>Hyloctistes sublatius</i>
169	<i>Lepidothrix coronata</i>
170	<i>Microcerculus marginatus</i>
171	<i>Mionectes oleagineus</i>
172	<i>Machaeropterus regulus</i>
173	<i>Automolus infuscatus</i>
174	<i>Cnipodectes subbrunneus</i>
175	<i>Pithys albifrons</i>
176	<i>Lepidothrix coronata</i>
177	<i>Myrmothera campanisona</i>
178	<i>Tangara schrankii</i>
179	<i>Thamnophilus schistaceus</i>
180	<i>Xiphorhynchus guttatus</i>

N°	Nombre científico
181	<i>Mynotherula axillaris</i>
182	<i>Lepidothrix coronata</i>
183	<i>Thamnonanes caesius</i>
184	<i>Automolus infuscatus</i>
185	<i>Mionectes oleagineus</i>
186	<i>Lepidothrix coronata</i>
187	<i>Glyphorynchus spirurus</i>
188	<i>Lepidothrix coronata</i>
189	<i>Lepidothrix coronata</i>
190	<i>Dendrocincla merula</i>
191	<i>Glyphorynchus spirurus</i>
192	<i>Glyphorynchus spirurus</i>
193	<i>Capito auratus</i>
194	<i>Pteroglossus pluricinctus</i>
195	<i>Dendrocincla fuliginosa</i>
196	<i>Dendrocincla merula</i>
197	<i>Lepidothrix coronata</i>
198	<i>Pipra erythrocephala</i>
199	<i>Selenidera reinwardtii</i>
200	<i>Thamnonanes caesius</i>
201	<i>Myrmoborus myotherinus</i>
202	<i>Pipra erythrocephala</i>
203	<i>Automolus infuscatus</i>
204	<i>Geotrygon montana</i>
205	<i>Lepidothrix coronata</i>
206	<i>Thamnonanes caesius</i>
207	<i>Glyphorynchus spirurus</i>
208	<i>Myrmotherula hauxwelli</i>
209	<i>Tachyphonus curinamus</i>
210	<i>Pithys albifrons</i>

N°	Nombre científico
211	<i>Willisornis poecilinotus</i>
212	<i>Willisornis poecilinotus</i>
213	<i>Automolus infuscatus</i>
214	<i>Pithys albifrons</i>
215	<i>Lepidothrix coronata</i>
216	<i>Thamnonanes caesius</i>
217	<i>Myrmotherula hauxwelli</i>
218	<i>Thamnonanes caesius</i>
219	<i>Willisornis poecilinotus</i>
220	<i>Lepidothrix coronata</i>
221	<i>Myrmeciza fortis</i>
222	<i>Geotrygon montana</i>
223	<i>Manacus manacus</i>
224	<i>Mynotherula axillaris</i>
225	<i>Terenotriccus erythrurus</i>
226	<i>Dendrocincla fuliginosa</i>
227	<i>Cnipodectes subbrunneus</i>
228	<i>Thamnophilus schistaceus</i>
229	<i>Nonnula brunnea</i>
230	<i>Nonnula brunnea</i>
231	<i>Mionectes oleagineus</i>
232	<i>Dendrocincla merula</i>
233	<i>Cyanocompsa cyanoides</i>
234	<i>Ramphocelus carbo</i>
235	<i>Myrmoborus myotherinus</i>
236	<i>Schistocichla leucostigma</i>
237	<i>Selenidera reinwardtii</i>
238	<i>Sporophila bouvronides</i>
239	<i>Ramphocelus carbo</i>
240	<i>Lepidothrix coronata</i>

N°	Nombre científico
241	<i>Ramphocelus carbo</i>
242	<i>Ammodramus aurifrons</i>
243	<i>Terenotriccus erythrurus</i>
244	<i>Lepidothrix coronata</i>
245	<i>Sporophilan sp.</i>
246	<i>Microcerculus marginatus</i>
247	<i>Sporophilan sp.</i>
248	<i>Glyphorynchus spirurus</i>
249	<i>Tachyphonus curinamus</i>
250	<i>Rhegmatorhina melanostica</i>
251	<i>Myiarchus tuberculifer</i>
252	<i>Myiarchus tuberculifer</i>
253	<i>Lepidothrix coronata</i>
254	<i>Geotrygon montana</i>
255	<i>Schistocichla leucostigma</i>
256	<i>Geotrygon montana</i>
257	<i>Manacus manacus</i>
258	<i>Sporophila bouvronides</i>
259	<i>Zimmerius gracilipes</i>
260	<i>Glyphorynchus spirurus</i>
261	<i>Thryothorus coraya</i>
262	<i>Formicarius colma</i>
263	<i>Thryothorus coraya</i>
264	<i>Pteroglossus azara</i>
265	<i>Pteroglossus azara</i>
266	<i>Pteroglossus azara</i>
267	<i>Pteroglossus azara</i>
268	<i>Lepidothrix coronata</i>
269	<i>Galbula albirostris</i>
270	<i>Pteroglossus azara</i>

<b>N°</b>	<b>Nombre científico</b>
271	<i>Pteroglossus azara</i>
272	<i>Myrmotherula menetriesii</i>
273	<i>Lepidothrix coronata</i>
274	<i>Oryzoborus angolensis</i>
275	<i>Mionectes oleagineus</i>
276	<i>Manacus manacus</i>
277	<i>Schistocichla leucostigma</i>
278	<i>Habia rubica</i>
279	<i>Formicarius colma</i>
280	<i>Thryothorus coraya</i>
281	<i>Arremon</i> sp.

**Nota:** Los datos de las especies de aves capturadas son parte del 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- Convenio 044 – 2019-FONDECYT-BM-INC-INV.



## 7. Matriz de consistencia

Título de la investigación	Problema de la investigación	Objetivos de la investigación	Hipótesis	Tipo y diseño de estudio	Población de estudio y procesamiento	Instrumentos de recolección
<p>Caracterización del genoma apicoplástico de <i>Plasmodium sp.</i> causante de malaria aviar, en la cuenca alta del río Itaya. Loreto - Perú - 2021.</p>	<p>¿Cuáles son las características el genoma apicoplástico de <i>Plasmodium sp.</i> causante de malaria aviar, en la cuenca alta del río Itaya. Loreto - Perú - 2021?</p>	<p><b>General:</b></p> <p>Caracterizar el genoma apicoplástico de <i>Plasmodium sp.</i> causante de malaria en aves en la Amazonía Peruana.</p> <p><b>Específicos:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Obtener las secuencias del genoma apicoplástico de <i>Plasmodium sp.</i> causante de malaria en aves de la Amazonía Peruana.</li> <li>• Ensamblar y anotar el genoma apicoplástico de <i>Plasmodium sp.</i> causante de malaria en aves de la Amazonía Peruana.</li> </ul>	<p>Es posible caracterizar el genoma apicoplástico de <i>Plasmodium sp.</i> causante de malaria en aves de la Amazonía Peruana.</p>	<p>Tipo de investigación será no experimental, transversal.</p> <p>El diseño será descriptivo porque consistirá en secuenciar el genoma apicoplástico de <i>Plasmodium sp.</i>, que causan la malaria en aves de la Amazonía Peruana. Esto se hará en base a 250 aves de diferentes especies.</p>	<p><b>Población de estudio:</b></p> <p>Estará constituida por el conjunto de 250 muestras de sangre de aves de diferentes especies en la amazonia peruana.</p> <p><b>Procesamiento:</b></p> <p>Se realizarán con el programa de libre acceso Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST v 2.0, <a href="http://rast.nmpdr.org/">http://rast.nmpdr.org/</a>). Adicionalmente, las secuencias serán mapeadas en la base de datos de vías metabólicas del Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes y analizadas en el KEGG Automatic Annotation Server – KAAS</p>	<p>Extracción de ADN de muestras de sangre de aves.</p> <p>El secuenciamiento del genoma de <i>Plasmodium sp.</i>, se realizará a través de la purificación de ADN de muestras de sangre de aves, construcción de librerías, el ensamblaje y anotación funcional del genoma apicoplástico de <i>Plasmodium sp.</i></p>

### 8. Tabla de operacionalización de la variable

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Indicador	Items	Instrumentos
Características del genoma apicoplástico de <i>Plasmodium sp.</i>	Son las características del genoma apicoplástico determinados por su secuencia, por el tamaño, número de genes, organización de los genes y sus funciones	<p>Identificación de genes genómicos construidos</p> <p>Construcción de librerías genómicas secuenciadas</p> <p>Ensamblado y anotación funcional del genoma apicoplástico</p>	<p>Tamaño del genoma: 50,000-100,000 pb</p> <p>Número de genes: 20-50 genes</p> <p>Organización de los genes: Sentido horario y sentido anti horario</p> <p>Funciones de los genes:            N° de genes estructurales            N° de genes reguladores            N° de genes codantes de enzimas</p>	<p>¿Cuál es el ADN del genoma apicoplástico de <i>Plasmodium sp.</i> ?</p> <p>¿Cuáles son las secuencias del genoma apicoplástico de <i>Plasmodium sp.</i>, que permitirá caracterizarlo?</p>	<p>Secuenciadores de última generación y NextSeq 550.</p> <p>Termociclador (Eppendorf MX Nexus Gradient)</p> <p>Cámaras electroforéticas, espectrofotómetro UV/visible. Nano Drop 2000 C.</p> <p>Fichas de registro de recolección de datos.</p>