



FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

TESIS

**DIVERSIDAD DE HAEMOSPORIDIOS AVIARES EN DOS AREAS NATURALES
PROTEGIDAS DE MADRE DE DIOS**

PARA OPTAR EL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO

**WILSON GIANCARLO INGA DIAZ
BACHILLER EN MEDICINA VETERINARIA**

LIMA – PERÚ

2017

DEDICATORIA

A mis padres Rocio y Wilson, por enseñarme el amor de nuestra Pachamama.

A mi familia: Percy, Manuel, Maruja, Coco, Marieta, Flor, Jesús, Julia, Jorge, Nancy, Ivone, Jonathan; gracias por siempre creer en que puedo lograr mis sueños y darme su apoyo cuando los necesito.

A Priscila, gracias por la motivación y el altruismo en el mundo de la conservación de la Vida Silvestre, por siempre darme tu apoyo y sonrisa.

A Ivanna por la paz y amor que le das a mi vida.

AGRADECIMIENTOS

- En especial, mis agradecimientos al Ing. Vladimir Ramirez y Blgo. David Aranibar, y todo el equipo guardaparque del SERNANP, por darme la viabilidad de conocer y estudiar estos impresionantes bosques de Madre de Dios.
- Al Dr. Alfonso Marzal de la ONG Malaria RCN y la Universidad de Extremadura España, por la confianza, asesoría y la enseñanza de ser un verdadero profesional con humildad y un ejemplo a seguir.
- Al Blgo. Roberto Gutiérrez de la ONG AIDER, por su disposición, apoyo y motivación en el desarrollo del estudio, y por demostrarme una verdadera amistad honesta ante cualquier situación.
- A la ONG AIDER, Ing. Liz Cantaro, Blgo. Erick Huamaní y en especial a mi amiga Ing. Vannesa Hilares y por permitirme ser parte del sistema de monitoreo biológico de la Reserva Nacional Tambopata y darme la oportunidad de desarrollarme haciendo conservación.
- Al Blgo. Mauricio Ugarte Lewis y el departamento de Ornitología del Museo de Historia Natural de la Universidad San Agustín de Arequipa (MUSA), por los consejos, entrenamiento y discusiones, de todo sobre de las aves en el campo.
- A la Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios (UNAMAD) y el M.V. Manuel Delgado Bernal, por brindarme sus instalaciones con infinita cordialidad.
- A mi hermano de campo: Yohamir Casanca, por compartir conmigo la pasión de observar aves y la diversión de trabajar únicamente por la conservación.
- A mis colaboradores dentro y fuera del bosque: Malú Morales, Rachel Kilby, Larry H., Maritza Pillco y el niño Diego por su compañía y apoyo.
- A mis queridos amigos; Dr. Pedro Gamboa Moquillaza, Dr. Manuel Díaz, Dr. Rodolfo Valcarcel y Dr. Percy Díaz, por motivarme continuar esta investigación y por demostrarme que todo se puede lograr con empeño y dedicación
- A mi Asesora de tesis M.V. Nidia Puray por toda su paciencia y constancia para concluir mi investigación, su empuje ha sido fundamental para el desarrollo del presente estudio.
- A la Universidad Alas Peruanas, a los profesionales y a todas las personas que de alguna manera contribuyeron a mi formación profesional.

RESUMEN

La investigación tuvo por objetivo identificar la presencia y diversidad de Haemosporidios aviáres en bosques amazónicos de Madre de Dios. Los lugares de muestreo fueron la Reserva Nacional Tambopata y el Parque Nacional Bahuaja Sonene. El periodo de recolección de muestras fue desde Junio a Octubre de 2015 y el análisis se realizó en el año 2017. Se capturaron aves de sotobosque utilizando redes de neblina y se colectaron 210 muestras sanguíneas mediante punción de la vena Ulnar, las muestras se conservaron en SET Buffer y se analizaron mediante PCR en el Laboratorio de la Universidad de Extremadura de España. Además se realizaron frotices sanguíneas y se analizaron por microscopia en la Universidad Amazónica de Madre de Dios. Se obtuvo 10% (21/ 210) de muestras positivas en 17 especies de aves. Se identificaron tres géneros de Haemosporidios (*Plasmodium* 57%, *Haemoproteus* 29% y *Leucocytozoon* 14%), la familia de ave Thraupidae presentó la mayor prevalencia (3,3%) para *Plasmodium* y la familia Columbidae la mayor prevalencia para *Haemoproteus* (1,4%). Las aves del bosque deforestado presentaron prevalencia de infección significativamente superior (14,3%) que la de los bosques con mejor estado de conservación (9% y 6%). Se determinaron 16 linajes genéticos de parásitos diferentes (11 *Plasmodium* spp, 3 *Haemoproteus* spp y 2 *Leucocytozoon* spp), de los cuales el 37,5% son nuevos descubrimientos para la ciencia. La especificidad de hospedero varió entre los linajes, con unas especies claramente generalistas, mientras que los linajes de nuevo descubrimiento serían especialistas por su menor rango de amplitud hospedadora.

PALABRAS CLAVE: *Plasmodium*, *Haemoproteus*, *Leucocytozoon*, Reserva Nacional Tambopata, Parque Nacional Bahuaja Sonene, aves amazónicas

ABSTRACT

The objective of this research was to identify the presence and diversity of avian Haemosporidiosis in Amazonian forests of Madre de Dios. The sampling sites were the Tambopata National Reserve and the Bahuaja Sonene National Park. The sample collection period was from June to October 2015 and the analysis was performed in 2017. Underbrush birds were captured using mist nets and 210 blood samples were collected by ulnar vein puncture, samples were stored in SET Buffer and analyzed by PCR in the Laboratory of the University of Extremadura, Spain. In addition, blood smears were performed and analyzed by microscopy at the Universidad Amazónica de Madre de Dios. 10% (21/210) of positive samples were obtained in 17 bird species. Three genera of Haemosporidium (*Plasmodium* 57%, *Haemoproteus* 29% and *Leucocytozoon* 14%) were identified, where the Thraupidae family had the highest prevalence (3,3%) for *Plasmodium* and the Columbidae family the highest prevalence for *Haemoproteus* (1,4%). Birds from deforested forests had a significantly higher prevalence of infection (14,3%). Sixteen genetic lineages of different parasites (11 *Plasmodium* spp, 3 *Haemoproteus* spp and 2 *Leucocytozoon* spp) were determined, of which 37,5% are new discoveries for science. Host specificity varied among lineages, with species clearly generalists, whereas the lineages of new discovery would be specialists by their smaller range of host amplitude.

KEYWORDS: *Plasmodium*, *Haemoproteus*, *Leucocytozoon*, Tambopata National Reserve, Bahuaja Sonene National Park, amazon birds

CONTENIDO

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEORICO	3
2.1 Parásitos Haemosporidios	3
2.2 Aves Amazónicas	18
2.3 Bosques amazónicos	266
III. MATERIALES Y MÉTODOS	333
3.1 Espacio y Tiempo	333
3.2 Población y Muestra	344
3.3 Diseño de la Investigación	355
3.4 Materiales y equipos	355
3.5 Procedimiento	38
3.6 Diseño Estadístico	422
IV. RESULTADOS	433
V. DISCUSIÓN	56
VI. CONCLUSIONES	622
VII. RECOMENDACIONES	633
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	644
ANEXOS	744

I. INTRODUCCIÓN

Los parásitos sanguíneos (Orden: Haemosporidios) de los géneros *Plasmodium*, *Haemoproteus* y *Leucocytozoon* son un diverso grupo que incluyen agentes de malaria, la presencia de malaria en las aves es representada por agentes nativos, exóticos e invasores que pueden ocasionar pérdidas de la biodiversidad (1). Las posibles causas de presencia y transmisión de malaria están relacionadas con el cambio global, los movimientos migratorios y la deforestación, las cuales crean las condiciones necesarias para que los vectores (insectos dípteros hematófagos) aumenten su rango de distribución y reproducción (2).

Anteriormente las especies de Haemosporidios eran descritos en base a criterios morfológicos a través del microscopio (1). Sin embargo los métodos de secuenciación genética demuestran que las especies forman grupos de linajes con amplias variantes genéticas por especie hospedadora y que la diversidad de especies parásitas es mucho mayor que el que podía ser identificado por microscopía (3).

La presencia y diversidad de Haemosporidios en la Amazonia se empezó a estudiar recientemente en los últimos cuatro años. El primer reporte realizado por Svensson-Coelho y colaboradores en Ecuador demuestra que la prevalencia aumenta de un año para el siguiente (14,5% a 33,2%) y reportan 31 linajes nuevos (4). Ricopa y colaboradores brindan el primer reporte para la amazonia peruana con una prevalencia de 16,25% y demuestra que las aves que vivían en bosque secundario presentaron mayor prevalencia de infección que las de bosque primario (26,2% y 8,7%), además

encuentra una diversidad mayor a 24 nuevos linajes en más de 56 especies de aves (5).

En Perú destaca la investigación realizada por Marzal y colaboradores en el 2014, con una prevalencia de hemosporidios de 32,35% que describe la presencia de *Plasmodium relictum* (linaje SGS1) en 8 especies de aves de las regiones de Lima y Huánuco. Este agente debido a su potencial invasor y a su creciente expansión ha sido clasificado por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) en la lista de las 100 especies invasoras mundiales más peligrosas (6).

El presente año, en la amazonia de Brasil, Fecchio y colaboradores reportan gran diversidad de linajes nuevos para la ciencia, evidenciando que los bosques con más especies de aves tienen linajes de parásitos más diversos y consideran que la biodiversidad amazónica es un importante reservorio de nuevos Haemosporidios (7). Sin embargo cabe resaltar que la diversidad y abundancia de parásitos, la especificidad de hospedadores y la relación con la degradación de hábitats podría influir la dinámica de las poblaciones y la estructura de las comunidades de aves susceptibles, por tener la capacidad de alterar la ecología del ecosistema e inmunosuprimir a los hospederos (2).

La región Amazónica de Madre de Dios alberga hábitats que se han visto modificados por la conversión de bosques primarios en terrenos de uso agrícola y ganadero. Donde estudiar la presencia y diversidad de la malaria es fundamental, para conocer cómo conviven los parásitos en condiciones naturales, según los cambios que han producido en el medio ambiente. Por este motivo, al no haberse realizado trabajos en Madre de Dios, y siendo esta un área rica en biodiversidad, el estudio tuvo por objetivo determinar la presencia y diversidad de haemosporidios (*Plasmodium* spp, *Haemoproteus* spp y *Leucocytozoon* spp) aviares en los bosques de la Reserva Nacional Tambopata y Parque Nacional Bahuaja Sonene; y busca conocer la influencia de la deforestación en la malaria.

II. MARCO TEORICO

2.1 Parásitos Haemosporidios

El grupo de los parásitos sanguíneos (Orden: Haemosporidios), son un grupo de protistas heteroxenos que necesitan insectos dípteros hematófagos como vectores. Es uno de los grupos más estudiados, porque en él se encuentran los agentes de la malaria, una de las enfermedades humanas más peligrosas que cada año presenta alrededor de 200 a 500 millones de casos reportados y más de un millón terminan en muerte (1).

La enfermedad en humanos es producida por cuatro especies: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* y *Plasmodium malarie*. Sin embargo, la diversidad de parásitos es mucho mayor y pueden infectar a otros animales. Además de estas cuatro, existen más de 200 especies de *Plasmodium*, y más de 500 especies descritas pertenecientes a 15 géneros dentro del orden Haemosporidia que infectan a anfibios, reptiles, aves y otros mamíferos (murciélagos, roedores, otros primates, etc.), y utilizan al menos siete familias de vectores dípteros (8). Estos parásitos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza (9).

El término "Malaria" ha sido bastante discutido debido a la carente información de relaciones filogenéticas entre los parásitos no humanos. Para algunos autores este término debería restringirse a las infecciones por *Plasmodium* (1), otros autores incluyen también las causadas por *Haemoproteus* y *Leucocytozoon* (10, 11). Aunque los tres géneros presentan ciclos vitales similares, existen diferencias.

2.1.1 Descripción de los Haemosporidios aviares

En los parásitos haemosporidios aviares la definición de especie es ampliamente debatido (1, 3), se reconoce el siguiente orden taxonómico:

Dominio: Eukarya, Reino: Protista, Sub-reino: Chromalveolata, Superfilo: Alveolata, Filo: Apicomplexa, Clase: Aconoidasida, Orden: Hemosporidia. Los hemoparásitos del orden Hemosporidia, suborden: Chromatoridae incluyen las familias Plasmodiidae y Haemoproteidae, y los géneros *Plasmodium* y *Haemoproteus* respectivamente. El suborden Achromatorida incluye al género *Leucocytozoon* (1).

Anteriormente las especies de los géneros *Plasmodium* y *Haemoproteus* eran descritas por características morfológicas en el examen de microscopía, las semejanzas y diferencias de sus ciclos vitales y en la especificidad de su hospedador aviar (1). Sin embargo la utilización de recientes métodos moleculares de secuenciación genética ha demostrado que la diversidad de especies parásitas se distribuye en linajes evolutivos (una secuencia de especies que forman una línea directa de descendencia, donde cada nueva especie es el resultado directo de la coevolución con su hospedadero (3, 10, 12).

2.1.1.1 *Plasmodium* spp.

Es un hemoparásito del que se conocen más de 175 especies de las cuales más de 39 parasitan a las aves. *Plasmodium relictum* es el agente común de Malaria aviar, documentado en 411 especies de aves de 67 familias. Se informó por primera vez como un patógeno invasor en el archipiélago de Hawái y se reconoció como una amenaza mundial en Nueva Zelanda y en las Islas Galápagos. La amplia gama de huéspedes del parásito y la capacidad de utilizar diversas especies de mosquitos como vectores lo hacen altamente invasivo cuando se introduce en nuevas zonas

geográficas, además incluyen linajes recientemente descritos de los cuales se desconocen sus capacidades patogénicas (1).

Plasmodium invade los eritrocitos del hospedador por esquizontes y gametocitos. Las características de identificación morfológica difieren en las etapas de trofozoítos, gametocitos y merontes; sobre los trofozoítos su forma y posición parasitaria son importantes. Las características de los merontes incluyen el tamaño, número, cantidad de citoplasma y extensión del núcleo de la célula huésped desplazada. En la morfología de gametocitos, la disposición relacionada a la célula huésped y la posición del núcleo del parásito son principales para la identificación (1).

2.1.1.2 *Haemoproteus* spp.

El género *Haemoproteus* incluye 14 órdenes, 50 familias y más de 173 especies, de las cuales 140 parasitan a las aves principalmente *Galliformes*, *Anseriformes*, *Falconiformes*, *Strigiformes*, *Columbiformes* y *Passeriformes*. *Haemoproteus* tiene como vector a especies de las familias Hippoboscidae o Ceratopoginidae (1).

Las especies descritas hasta el momento se pueden clasificar en cinco tipos morfológicos, cada uno posiblemente equivalente a un subgénero. Las características morfológicas para la identificación de especies de *Haemoproteus* incluyen las diferentes etapas de desarrollo que se encuentran en la sangre, como gametocitos tempranos, jóvenes y en crecimiento. Las características de identificación de los gametocitos tempranos y jóvenes incluyen la forma, el tipo y posición dentro de la célula parasitada. En los gametocitos en crecimiento y desarrollo, las características examinadas son la forma, la disposición respecto al núcleo de la célula del huésped, el número y forma de los gránulos pigmentados y la extensión del desplazamiento del núcleo de la célula del huésped (1).

2.1.2 Ciclo de vida y transmisión

Los haemosporidios tienen un ciclo de vida que involucra a dos huéspedes: un vertebrado y un insecto que se alimenta de sangre. El ciclo de vida inicia cuando un díptero hematófago hembra de los géneros *Culex*, *Aedes* o *Anopheles* adquiere el protozoo presente en la sangre de un animal infectado y se convierte en su vector propagando la enfermedad a través de la saliva cuando se alimenta de otra ave (1, 9).

Plasmodium spp y *Haemoproteus* spp tienen un ciclo de vida muy similar. El vector infectado pica al huésped aviar inyectando los esporozoitos. Una vez en su huésped el parásito desarrolla una fase de reproducción asexual en los tejidos internos de éste, dando lugar a los merozoitos, los cuales invadirán los eritrocitos. Los parásitos desarrollarán los gametocitos o merontes, de manera que cuando un vector pica al huésped aviar, ingiere los gametocitos. En el vector se desarrollarán los microgametos y macrogametos, teniendo entonces lugar la fase de reproducción sexual, diferenciándose en un oocineto, que posteriormente mediante la reproducción asexual dará lugar a los esporozoitos que migrarán a las glándulas salivares, completando así su ciclo vital (9, 11).

A pesar de tener ciclos de vida muy semejantes, encontramos algunas diferencias importantes entre ambos parásitos, como los vectores. Para *Plasmodium* el vector es un mosquito, perteneciente a los géneros *Culex*, *Aedes*, y *Anopheles* (solamente son las hembras las que participan en la infección); mientras que para *Haemoproteus* el vector principal son los insectos del género *Culicoides* (*Ceratopogonidae*) e hipoboscidos (*Hippobosciidae*). Otra diferencia a destacar es que en el caso de *Plasmodium* tanto los gametocitos como los esquizontes pueden infectar a los eritrocitos del huésped, mientras que *Haemoproteus* son sólo los gametocitos los que infectan a los eritrocitos (9, 11, 13).

El ciclo reproductivo de los hemosporidios es complejo y cuenta con diversas etapas reproductivas, tanto intra como extraeritrocitarias, así como en macrófagos, células

endoteliales e incluso dentro del aparato digestivo del mosquito. Es importante destacar que este protozoo al reproducirse destruye las células sanguíneas que parasita ocasionando la enfermedad (11, 13).

Las posibles causas de transmisión de malaria están relacionadas con el cambio global, el tráfico ilegal de especies exóticas, los movimientos migratorios, la deforestación y la conversión del bosque en tierras de cultivo, estas crean las condiciones idóneas para que el mosquito aumente su rango de distribución y reproducción (2, 10).

2.1.3 Patogenicidad

Los hemoparásitos de malaria aviar usan las células sanguíneas de las aves como hábitat para su crecimiento y reproducción. Al reproducirse destruyen las células que parasita y debido a que la sangre actúa como medio para transportar nutrientes, oxígeno, productos metabólicos, células inmunes y hormonas, genera cuadros de anemia, daños en hígado, bazo y enfermedades secundarias. La patología varía según la especie de parásito y de huésped, en condiciones naturales se ha asociado el aumento de parasitemia a periodos de cría y estrés (1, 9).

Estos parásitos afectan a sus huéspedes en la disminución del éxito reproductivo y supervivencia cuando la especie de ave afectada no ha evolucionado defensas para resistir la enfermedad; además tiene mayores efectos en la dinámica poblacional de la especie huésped y posiblemente afecciones secundarias en la estructura de las comunidades de aves silvestres (14).

Está documentado por Van Riper y Valkiūnas la existencia de linajes patógenos de malaria aviar altamente invasivos y causantes de pérdida de la biodiversidad. Se ha descrito su patogenicidad invasora como la mayor causa de extinción del 30 % de aves endémicas y 70% de especies de aves silvestres en Hawaii (9, 15, 16).

Los estudios experimentales con varias especies de *Plasmodium* demuestran que, en la fase aguda de la infección, hay un pico de parasitemia en la sangre, asociado con anemia y exceso de biliverdina en las heces. Además, hay un aumento en la actividad de los macrófagos los cuales fagocitan células sanguíneas parasitadas causando hipertrofia de hígado y bazo. Cuando los merontes están formados en las células endoteliales, los capilares pueden ser bloqueados causando anoxia y necrosis de varios tejidos (16, 17).

2.1.3.1 Signos clínicos

Los signos clínicos y síntomas de la malaria en las aves incluyen fiebre, anemia (normocítica normocrómica), vómitos, anorexia, depresión, diarrea, dificultades respiratorias, mucosas cianóticas y posterior muerte. Se ha observado que la prevalencia es mayor en aves jóvenes, con gran mortalidad; en los adultos, por lo general las tasas de mortalidad son algo menores y generalmente se asocia a cuadros asintomáticos (9, 11).

Las lesiones patológicas más importantes se observan en hígado, bazo y riñones, cuyos volúmenes se encuentran aumentados con presencia de zonas infartadas; también se presentan zonas de isquemia por embolismos provocados por las formas extra eritrocitarias del parásito (18).

Los efectos patológicos reportados para la infección con *Haemoproteus* incluyen inflamación, necrosis, hemorragia y la miopatía. Las lesiones están relacionados principalmente con el desarrollo de merontes en órganos y su ruptura liberan merozoítos; los tejidos mayormente afectados son los pulmones, el hígado, el bazo, el corazón y el músculo esquelético, aunque también se han reportado efectos negativo en los riñones y la molleja (18).

La infección por *Haemoproteus* ha sido considerada menos patogénica que la infección por *Plasmodium*; sin embargo, hay reportes de muerte súbita por hemorragia de celoma y el hígado y lesiones vasculares generadas durante la fase pre-eritrocítica de la infección. La infección crónica también puede causar efectos negativos sobre el éxito reproductivo de las aves e implica un costo energético invertido en la defensa inmunológica y la reparación de tejidos dañados. Además la anorexia puede llevar a la disminución de la movilidad, la dificultad para conseguir alimentos y aumento de la vulnerabilidad a los depredadores (9, 15).

2.1.4 Epidemiología

La Malaria aviar es una enfermedad infecciosa emergente que ha expandido su rango geográfico, ha pasado de una especie huésped a otra e incrementado su impacto y severidad. Se ha evidenciado que en zonas donde el agente es de reciente introducción su acción es devastadora para las aves, ya que estas no han desarrollado inmunidad a malaria a lo largo del tiempo evolutivo (10, 19). En zonas neotropicales, la malaria está reportada en varias especies de aves huéspedes de diversos linajes con diferentes grados de patogenicidad en ecosistemas de la Costa, de los Andes y de la Amazonía. Todos los reportes se encuentran disponibles en una base de datos web (20).

En Sudamérica la presencia y diversidad de Haemosporidios se describen inicialmente por Durrant y colaboradores quienes compararon la zona tropical de Guyana y la zona costera de Uruguay, y obtuvieron prevalencias de 42% y 22% respectivamente; los índices de diversidad de Shannon demostraron mayor diversidad de aves infectadas en Uruguay y mayor diversidad de linajes parásitos en Guyana, solo tres de 52 linajes fueron compartidos por ambas regiones (21). La diversidad costera a través de un gradiente latitudinal ha sido estudiada por Merino y colaboradores en 5 ecosistemas australes de Chile, reportando una prevalencia de 15,4% y 27 linajes genéticos, además encontraron una relación positiva entre la prevalencia y la latitud para el caso de *Leucocytozoon*, y una relación negativa para la diversidad y la latitud (22).

A partir del año 2009, se realizaron algunas investigaciones en zonas con aislamiento geográfico como: los andes Colombianos del Parque Nacional Natural Chingaza, donde obtuvieron como resultado 27,9% de infección. El estudio resalta por la prevalencia de *Leucocytozoon* (21,3%) en aves nativas ya que anteriormente la presencia del parásito estuvo asociada estrechamente a las aves migratorias (23). En zonas áridas de Venezuela, Belo y colaboradores encontraron una prevalencia de infección del 41%, y una diversidad de 17 linajes (7 para *Plasmodium* spp. y 10 para *Haemoproteus* spp.) de los cuales 8 tuvieron anteriores reportes en Norteamérica e incluso India occidental, concluyendo que existe poca evidencia de aislamiento evolutivo de los linajes parásitos (24).

En las islas Galápagos, Valkiūnas y colaboradores describieron la especie *Haemoproteus multipigmentatus* (basándose en secuenciación genética y morfología), en la especie de ave endémica Paloma de las Galapagos (*Zenaida galapagoensis*) y en la mosca Hippoboscidae (*Microlyncha galapagoensis*); además demuestra que la secuencia genética del parásito fue anteriormente reportada en Columbiformes de México, Guatemala y Perú, considerándola una especie generalista de potencial invasor (25).

Levin y colaboradores confirman la capacidad invasora de los hemosporidios en el Pingüino de galápagos (*Spheniscus mendiculus*), demostrando una tendencia de incremento de prevalencia en 3 años de estudio con rangos de 3% a 7% (26). Cabe resaltar que se ha reportado *Plasmodium relictum* en el Pingüinos de Magallanes (*Spheniscus magellanicus*), que al ser introducidos en zonas de alta contaminación como zoológicos tienden a presentar tasas de infección y mortalidad elevadas, porque estos pingüinos no han tenido exposición al parásito en su medio natural. De esta manera demuestran que la patogenicidad de un agente invasor es mayor en nuevos huéspedes que no han desarrollado inmunidad para combatirla (27).

A partir del año 2011, se reportaron investigaciones en ecosistemas neotropicales cercanos a la Amazonía como la Sabana Tropical del Cerrado de Brasil, donde Fecchio

y colaboradores analizaron 772 individuos de 17 especies de aves, de 6 familias y encontraron una prevalencia de infección de (10,7%), siendo *Haemoproteus* el género más abundante (7,1%). Además hallaron 17 linajes parásitos; sin embargo, no encontraron variación en los resultados durante los 5 años de estudio (28). En el sudeste de Brasil, Lacorte y colaboradores evaluaron la sabana tropical y obtuvieron como resultado un 35,3% de prevalencia. En ese estudio se identificaron 89 linajes de *Plasmodium* y 22 de *Haemoproteus*, con el 86% de ellos descritos por primera vez; también encontraron que las áreas con alta diversidad de aves presentan alta diversidad de parásitos (29).

En el año 2013, Rodríguez y colaboradores realizaron un estudio basado solo en microscopia, en el bosque nublado semihúmedo del Parque nacional de Yacambú, obteniendo una prevalencia de 27,48 % en 14 especies de aves paseriformes, de las cuales resalta *Turdus olivaster* con una prevalencia del 77%; *Catharus fuscater* y *Buarremon brunneinucha* también obtuvieron más del 50% de prevalencia de infección (14).

En Perú, resalta la investigación de Marzal que muestra 32,35% de infección (33 muestras positivas), con 5 linajes de *Haemoproteus* y 5 linajes de *Plasmodium* en 12 especies de aves. Los altos índices de biodiversidad del país crean las condiciones necesarias para la aparición de especies invasoras como el caso de *Plasmodium relictum* linaje SGS1, que ha sido descrito por primera vez en América del sur en la región de bosque nublado de Huánuco, presente en (39,40% de infectados) 8 especies de aves huéspedes (*Amazilia chianogster*, *Colibri coruscans*, *Sayornis nigricans*, *Serpophaga cinerea*, *Zonotrichia capensis*, *Conirostrum cinereum*, *Phleocryptes melanops*, *Troglodytes aedon*), demostrando así una potencial amenaza para la fauna en la Amazonía si lograra pasar la barrera natural de los Andes (6).

Plasmodium relictum ha sido clasificado por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) en la lista de las 100 especies invasoras mundiales más peligrosas. Este linaje ha sido reportado en más de 60 especies de aves y está

emparentado con el patógeno responsable de la desaparición del 30% de aves endémicas y 70% de las aves silvestres en Hawai (17, 27, 30, 31).

A partir del año 2013, Svensson-Coelho y colaboradores realizaron el primer reporte de Haemosporidios en los bosques Amazónicos, en la Estación Biológica Tiputini de Ecuador, encontrando una prevalencia del 14,5% en muestras colectadas en el año 2006 y 33,2% en muestras del año 2009; además de 45 linajes, de los cuales solo 14 estaban anteriormente descritos, confirmando la tendencia de incremento de la prevalencia y la gran diversidad biológica de Haemosporidios(4).

En la Amazonía Peruana, un estudio aún sin publicar en la Reserva Nacional Allpahuayo Mishana obtuvo como resultados 16,25% de infección en 15 especies de aves. Las prevalencias fueron: 10% para *Plasmodium*, 2,9% para *Haemoproteus* y 2,5% para Microfilarias. La prevalencia varió según las especies de aves: *Cacicus cela* (familia Icteridae) con 50% y *Lepidothrix coronata* (familia Pipridae) con 37,5% las cuales fueron las especies más infectadas. Además reporta que las aves que vivían en bosque secundario presentaron una prevalencia de infección de 26,2% y las que habitaban en el bosque primario 8,7%. Igualmente se encontró una mayor diversidad de linajes en zonas de bosque secundario (10 linajes, 60% del total) que en zonas de bosque primario (7 linajes, 47% del total) (5).

Otro estudio sin publicar, comparó los bosques primarios y secundarios de Perú, encontrando mayor porcentaje de malaria aviar en zonas con deforestación, la prevalencia total de parásitos fue de 32,83% en Tarapoto y de 17,94% en la Reserva Nacional Allpahuayo Mishana. El estudio demostró que 26 individuos estaban infectados por Haemosporidios, de los cuales 8 fueron infectados por *Haemoproteus*, 14 por *Plasmodium* y 5 por *Leucocytozoon*, presentando dos individuos con infección múltiple. En este estudio determinan la presencia de 21 linajes parásitos en 56 especies hospedadoras, 13 linajes pertenecieron al género *Plasmodium*, 7 a

Haemoproteus y 1 a *Leucocytozoon*. De los 21 linajes hallados, 14 no habían sido descritos anteriormente (32).

El año 2015, en la Amazonía de Brasil recientes estudios confirman baja prevalencia y alta diversidad. En Manaus, Oliveira y colaboradores, reportan 14% de prevalencia y 24 linajes nuevos para la ciencia en 27 especies de aves hospedadas; además, el estudio confirma que la densidad poblacional de los hospederos influye la prevalencia de parásitos en aves de sotobosque de la familia Thamnophilidae, y muestra una relación inversa para la especie *Glyphorynchus spirurus*, la que presentó mayor densidad poblacional y menor prevalencia (33).

Fecchio y colaboradores brindan los últimos estudios para gran parte de la Amazonia de Brasil, donde reportan 17,4% de infección (15,3% para *Plasmodium* y 2,4% para *Haemoproteus*) y 265 linajes genéticos de los cuales 91,4% fueron nuevos descubrimientos; las áreas de sureste amazónico presentaron significativamente mayor prevalencia a diferencia del centro occidental de la Amazonía. La familia de aves Columbiformes presentó la prevalencia más alta de *Haemoproteus*, el resto de familias tuvo mayores porcentajes de *Plasmodium* (7). Otra contribución de Fecchio reporta 10,9% de prevalencia para 30 especies de aves de la familia Pipridae en localidades de bosque tropical, cerrado y bosque atlántico de Brasil, Ecuador y Perú. Reportaron 39 linajes genéticos de los cuales 24 fueron especialistas de esta familia (34).

2.1.5 Ecología de Haemosporidios

La amplia distribución geográfica de los hemosporidios depende de la distribución de las especies huésped, de la distribución del vector artrópodo y de la capacidad invasora del parásito. El amplio rango de las especies huéspedes y vectores, los convierten en un excelente modelo de exploración de dinámica ecológica y evolutiva de la asociación del huésped y del parásito (10).

Las relaciones filogenéticas de Haemosporidios según su distribución geográfica se estudiaron en aves rapaces de Europa, Africa y Norteamérica, encontrando que la especificidad de linajes es alta para Norteamérica y más generalista para los otros continentes (35). Existen reportes de parásitos generalistas en aves endémicas y en peligro de extinción como el *Strix occidentalis* (Strigidae) representando una amenaza para la conservación (36). En el Oeste de Europa un estudio muestra la persistencia de parásitos generalistas en individuos recapturados cada año, a lo largo de tres años de estudio (37). Mata y colaboradores confirma que las relaciones genéticas de los parásitos generalistas de *Plasmodium* no difieren en zonas aisladas con barreras geográficas (38).

Recientes estudios consideran importante la relación entre los Haemosporidios de malaria y varios factores ecológicos y abióticos, así como la historia de vida de las aves para explicar las diferencias en la prevalencia de parásitos encontrados entre las familias y especies huéspedes. Los resultados han mostrado una relación inversa entre la frecuencia de hemoparásitos y elevación o latitud, asociándolo con los cambios en los vectores de la fauna o efectos negativos de la baja temperatura en el desarrollo del parásito. Según Martínez, los hábitats más cercanos a cursos de agua o a zonas húmedas podrían estar más en contacto con posibles vectores de parásitos sanguíneos, puesto que la fase larvaria de muchos mosquitos es de vida acuática (11, 19).

Las características como hábitat, migración, tipo de nido y sociabilidad han mostrado resultados a favor y en contra de la asociación de alta frecuencia de infección con *Haemoproteus* o *Plasmodium*. También, se ha reportado que el tiempo de incubación de los huevos esta inversamente relacionado con la prevalencia de hemoparásitos, mostrando que el mayor tiempo de incubación permite un mejor desarrollo de un sistema inmune. La incidencia del parasitismo en una comunidad de aves tropicales influye en las relaciones de competencia interespecífica e intraespecífica, ya que los individuos parasitados son menos competitivos (11, 39).

El efecto del hábitat como determinante de cargas parasitarias en las aves huéspedes se investiga a través del cambio climático, el cual podría alterar el equilibrio entre parásitos y huéspedes, potenciando la patogenicidad de la enfermedad. Las pérdidas de hábitat, en las etapas iniciales, tienden a aumentar las densidades de los organismos que dependen de los fragmentos de bosques restantes, por lo que la tasa de transmisión de patógenos dentro del fragmento aumenta junto con el impacto del patógeno sobre la meta de población huésped (40, 41). De esta manera la rápida propagación que presentan estos parásitos se explica considerando el elevado número de mosquitos presentes en zonas donde estos insectos se reproducen y la reducida cantidad de aves disponibles para su alimentación (40).

Además la fragmentación del hábitat afecta el nivel de estrés de los animales a través del hacinamiento y desplazamiento de sus territorios, lo cual afecta la respuesta inmune del huésped haciéndolo más susceptible de ser infestado y de presentar signos clínicos. Como consecuencia, se ha convertido en una seria preocupación para la salud aviar y para la conservación de los ecosistemas (11).

En las investigaciones comparativas de hábitats conservados y hábitats degradados se observan resultados contrapuestos, en el caso de *Plasmodium* los resultados son variables cuando los parásitos son considerados a nivel general (13). Bonneaud y colaboradores no encontraron diferencias entre la prevalencia *Plasmodium* en hábitats conservados versus hábitats degradados; pero cuando se examinó cada especie de *Plasmodium* por separado, se encontraron especies prevalentes en zonas degradadas mientras que otro grupo de especies fueron más prevalentes en hábitats no intervenidos (40, 41).

Otros estudios llegaron a la conclusión de que se relacionaban los mayores niveles de cobertura vegetal con mayor prevalencia de parásitos, para los géneros *Haemoproteus* y *Leucocytozoon*, siendo mucho más complejo para los linajes pertenecientes al género *Plasmodium*, algunos de los cuales mostraban mayor prevalencia en zonas no perturbadas y otros en áreas taladas Sin embargo, esto no siempre es así, ya que en

otro estudio en la región del Cerrado de Brasil se obtuvo mayores niveles de infección y mayor diversidad de linajes en las zonas más próximas a regiones urbanas y con menor cobertura vegetal (24, 42).

Estudios sobre la relación de la deforestación y malaria humana mostraron que un cambio de 4% en la cobertura del bosque se asocia a un aumento de 48% en la incidencia de malaria, posiblemente debido a que la tala de los bosques crea condiciones que favorecen la reproducción del principal portador de malaria en el Amazonas, el mosquito *Anopheles darlingi* (43). Áreas con larvas de *A. darlingi* tuvieron 24,1 % de cobertura vegetal, mientras que las áreas sin larvas del vector tenían 41% de cobertura. Adicionalmente se encontró que la tasa de picaduras de *Anopheles darlingi* fue 278 veces mayor en áreas deforestadas (44).

2.1.6 Diagnóstico de Haemosporidios

2.1.6.1 Examen microscópico

Características resaltantes de *Plasmodium* y *Haemoproteus* en frotis sanguíneo (45):

2.1.6.1.1 *Plasmodium*: características de identificación:

El gametocito intraeritrocitario de *Plasmodium* puede ser confundido por el de *Haemoproteus* spp., ya que también contiene pigmentos granulares que se refractan, sin embargo, el del *Plasmodium* usualmente ocupa menos del 50% del citoplasma de la célula parasitada alterando la posición del núcleo del eritrocito. Dos claves que ayudan a la identificación del parásito son la presencia de esquizogonias en sangre periférica y gametocitos o esquizontes en células sanguíneas aparte de eritrocitos. Los esquizontes aparecen como inclusiones intracitoplasmáticas ovaladas que contienen merozoitos de coloración oscura (1, 45).

- a. Merozoitos, esquizontes o gametocitos dentro de eritrocitos, desplazando el núcleo del hospedador.
- b. Merozoitos con apariencia de anillo de sello (vacuola grande desplaza núcleo parásito a un extremo).
- c. Gameocitos pueden tener forma halteridial, pero los gránulos pigmentados están en un espacio reducido.
- d. También parasitan trombocitos, leucocitos y células endoteliales.

2.1.6.1.2 *Haemoproteus*: características de identificación

El gametocito de *Haemoproteus* únicamente aparece en sangre periférica, contiene pigmentos granulares refrangibles amarillo-café. El gametocito ocupa más del 50% del citoplasma del eritrocito, rodea al núcleo y adopta la forma de halterio, ocasionando el desplazamiento del mismo. Los macrogametocitos se tiñen azules con coloración y tiene pigmentos granulares por todo el citoplasma del parásito. Los microgametocitos se colorean azul claro o rosados, con pigmentos granulares formados en agregados esféricos (1, 45).

- a. Gametocitos únicamente en eritrocitos
- b. Forma halteridial de gametocitos, con casi nulo desplazamiento del núcleo del eritrocito
- c. Esquizontes no observables en sangre periférica
- d. Múltiples gránulos pigmentados dentro del eritrocito, refráctiles, de tonalidades amarillo hasta marrón.

2.1.6.2 Detección molecular

La técnica utilizada para la detección molecular es la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una técnica “in vitro” que imita la habilidad natural de la célula de duplicar el ADN, de esta manera permite amplificar selectivamente un segmento específico de ADN creando un gran número de copias de un segmento de ADN hasta obtener una cantidad suficiente para su posterior manipulación y utilidad en otras aplicaciones si es necesario (46)

El año 2004, Hellgren y Bensch S. presentaron un nuevo protocolo de Reacción en cadena de la polimerasa anidada (Nested PCR) que, por primera vez, permite la tipificación simultánea de especies de los 3 géneros más comunes de hemoparásitos aviares (*Haemoproteus* spp, *Plasmodium* spp, y *Leucocytozoon* spp) (47).

La técnica variante Nested PCR o PCR anidada comprende dos ciclos de amplificación con el fin de incrementar la sensibilidad de detección, utilizando distintos pares de iniciadores o primers en cada ciclo. Primero se realiza una reacción con los iniciadores o primers externos para amplificar una región de ADN más extensa, que contiene el segmento diana. Después, con este producto de amplificación, se ejecuta una segunda PCR con los iniciadores o primers internos para amplificar la región específica (46, 47).

2.2 Aves Amazónicas

En la región amazónica, Brasil, Colombia y Perú pertenecen al grupo de países mega diversos. El Perú alberga el 20 % de la diversidad mundial de aves. Existen 1852 especies de aves registradas de las cuales 1792 confirmadas y 60 hipotéticas. De ellas 106 especies son endémicas para el país (48, 49).

En la región Amazónica de Madre de Dios se pueden encontrar cerca de 859 especies de aves. (50) Madre de Dios es una de las zonas del mundo con la mayor diversidad de aves estudiadas, que ha registrado hasta 400 especies en 1 km². Y donde las bandadas mixtas son las más complejas colecciones multiespecie de cualquier otro grupo de organismos, pudiendo reunir hasta 103 especies con más de 70 especies presentes en una sola vez, siendo estas bandadas las más grandes en el mundo. También se encuentran casi la totalidad de especies de Psittacidos que habitan en el Perú (51).

Según los apéndices CITES, la región Amazónica de Madre de Dios registra 61 especies bajo alguna categoría de amenaza, además alberga hábitats que son utilizados como paraderos de más de 40 especies de aves migratorias transcontinentales (51).

La comunidad de aves que representan el sotobosque (0.2m a 2.6m de altura al suelo), son principalmente del aves del orden Columbiformes, Apodiformes, Galbuliformes, Coracciformes y Paseriforme, que por lo general son aves de pequeño tamaño, que a pesar de vivir en el mismo ambiente, presentan diferencias en el tipo de uso de hábitat, alimentación y ritmos de actividad diaria (50).

2.2.1 Descripción de aves amazónicas de Madre de Dios

2.2.1.1 Orden Columbiforme

Dentro del orden Columbiformes, encontramos a la familia Columbidae (Tórtolas, palomas y afines) (49). Son aves de pequeño y mediano tamaño, con cuello, pico y patas cortas. La pareja que se reúne en la época de reproducción, construye nidos donde colocan de dos a tres huevos. Viven en promedio hasta los 15 años. Se alimentan de granos, frutos e insectos, habitan las zonas tropicales y templadas de los

continentes, así como algunas de las islas oceánicas. Algunas especies son migratorias. Pueden alcanzar en vuelo, velocidades hasta 80 km/h, pudiendo volar distancias hasta de 315 km sin cansarse. Tienen el mejor sentido de orientación de todas las aves y, también de todo el reino animal, pudiendo localizar sus nidos a más de 1000 km de distancia. También pueden detectar sonidos a grandes distancias (52).

2.2.1.2 Orden Apodiformes

Dentro del orden Apodiformes, encontramos a las familias: Apodidae (vencejos) y Trochilidae (colibríes). La familia Trochilidae, es originaria de América distribuidos en una gran variedad de hábitats. La mayor biodiversidad de la familia se encuentra en Perú, Brasil y Ecuador que contiene cerca de la mitad de las especies conocidas de colibríes (49).

Son aves que miden en promedio de 6 a 12 cm de largo y pesan de 2 a 6 gramos. El pico es normalmente largo, pero la forma varía bastante por los hábitos peculiares de alimentación, pues actúan como polinizadores de diversas familias botánicas. El esqueleto y la constitución muscular están adaptados para permitir un vuelo rápido y extremadamente ágil. Son las únicas aves capaces de volar hacia atrás y permanecer inmóvil en el aire. El ritmo de las alas es muy rápido y las especies más pequeñas pueden aletear de 70 a 80 veces por segundo. En contraste, las patas de los colibríes son demasiado pequeñas para que camine sobre el suelo. Son de los pocos vertebrados capaces de detectar colores en el espectro ultravioleta (53).

Con frecuencia visitan bañaderos o cuerpos de agua. Algunas especies realizan migraciones estacionales, por la floración anual de ciertas plantas, árboles y arbustos (53).

2.2.1.3 Orden Galbuliformes

Dentro del orden Galbuliformes, encontramos a las familias Galbulidae (Jacamares) y Bucconidae (Monjas y Bucos) (49).

2.2.1.3.1. Galbulidae, son aves esbeltas, de tamaño mediano con pies pequeños, alas y pico muy largo para la captura de insectos en vuelo; su plumaje varía de colores brillantes a iridiscentes. Miden entre 14-34 cm. La familia jacamar es exclusivamente Neotropical principalmente en habitats de tierras bajas boscosas desde el sur de México hasta el sur de Brasil. Con la única excepción de la Gran Jacamar, todos los jacamares son exclusivamente insectívoros. Sus dietas consisten casi enteramente de insectos con alas, atrapado en vuelo (54).

2.2.1.3.2. Bucconidae, son aves pequeñas a medianas con la cabeza grande y el pico aplanado y ganchudo. El plumaje esponjoso, alas redondeadas cortas, cuerpo robusto, pies pequeños y la cola estrecha les hacen parecer hinchados. Miden entre 13-29 cm. Habitan desde el sur de México hasta el norte de Argentina. Se alimentan al acecho de insectos y pequeños vertebrados. Como la mayoría de sus parientes, este grupo nidifica en cavidades, poniendo dos o tres huevos blancos y brillantes en un hueco en la tierra o en un termitero. Son muy confiados, permanecen casi inmóviles, tienen hábitos crepusculares y silbidos finos, están entre las más silenciosa de las aves en los bosques neotropicales (55).

2.2.1.4. Orden Coracciformes

Dentro del orden Coracciformes, encontramos a las familias Alcedinidae (Martines pescadores) y Momotidae (Relojeros) (49).

2.2.1.4.1. Alcedinidae, son pequeñas aves de tamaño medio con el pico largo y recto, patas cortas y a menudo con los colores del plumaje brillante. Habita sobre todo los

bosques cercanos a agua, aunque algunos prefieren los bosques abiertos y lejos de los ríos o lagos. Miden entre 10-46 cm. Se alimentan haciendo capturas de peces pero tienen una gama mucho más amplia de alimentos insectos. Todos anidan en sitios similares, una forma de cámara en el extremo de un túnel en un banco, un árbol o un nido de termitas, y todos tienen huevos blancos similares. En muchos aspectos, se enfrentan con muchas formas de presión ambiental y muchas especies prefieren vivir en los bosques primarios (56).

2.2.1.4.2. Momotidae, son aves arbóreas de tamaño medio, de cuerpo aplanado, corto, alas redondeadas y las patas cortas; además tiene la cola en forma de punta de raqueta. Habitan en selvas y bosques tropicales y subtropicales; algunas especies también en áreas semiabiertas. Miden entre 16-48 cm y pesan de 50-150 g. Suelen ser las aves más silenciosos y discretos, que pasan gran parte de su tiempo posado inmóvil. Tienen una amplia variedad de alimentos desde insectos a vertebrados (57).

2.2.1.5. Orden Passeriforme

El orden Passeriforme, abarca más de la mitad de las especies de aves del mundo, se conocen comúnmente como aves cantoras. Contiene más de 110 familias, con más de 5700 especies identificadas. Su éxito evolutivo se debe a diversas y complejas adaptaciones al medio, que comprenden desde su capacidad para posarse en los árboles, los usos de sus cantos, su inteligencia o la diversidad de sus nidos (58).

En el neotropico existen dos grupos que se establecieron por la conformación de su siringe (órgano del canto): Tyrannidae o pájaros clamadores, que tienen una siringe simple; y Passeridae o pájaros cantores, cuya siringe tienen un sistema complejo de músculos para controlarla. La mayoría de los passeriformes tienen 12 plumas en la cola y 9 o 10 plumas primarias en las alas. Los picos de las aves presentan diferentes formas dependiendo de los hábitos alimenticios. Los colores de estas estructuras muchas veces cumplen la función de reconocimiento intraespecífico (58).

2.2.1.5.1. Tyrannidae, la familia incluye más de cuatrocientas especies de pequeños pájaros que se distribuyen en todo el continente americano, salvo el extremo norte. Se encuentran en una gran variedad de ambientes, sobre todo en selvas, bosques y pastizales. Miden entre 6,5 a 28 cm. Su plumaje es generalmente una combinación variada de negro, pardo, blanco, amarillo y verde. Son aves territoriales, agresivas con otras aves que invaden sus territorios. Se alimentan de insectos que atrapan al vuelo o de otras pequeñas presas similares, aunque también toman bayas y semillas, algunos se alimentan de frutos y pequeños invertebrados acuáticos. Existe gran diversidad de especies tanto residentes como migratorias, ampliamente distribuidas en el bosque húmedo (59).

2.2.1.5.2. Thraupidae, la familia de las tángaras son aves del neotrópico que se reconocen por tener plumaje brillante y pico corto, grueso pero no cónico. Son de mediana talla, con las alas puntiagudas de un largo regular; los tarsos y dedos regulares, con uñas cortas y curvadas. En promedio miden de 18 cm de longitud y pesan 30 g. Las especies de esta familia son todas habitantes de las zonas intertropicales; algunas especies especialistas de los bosques amazónicos primarios y otras especies se encuentran en áreas semi-abiertas, incluyendo cultivos y pastizales e incluso zonas habitadas por humanos, alimentándose de algunos frutos cultivados. Son sociales, que se ven a menudo en grupos. Comen una gran variedad de frutas, además insectos y otros invertebrados (60).

2.2.1.5.3. Turdidae, la familia Tordos tienen una distribución casi mundial y muy numerosa. Son especies de talla pequeña y mediana, Su plumaje en general es marrón oscuro. Miden en promedio 24 cm de longitud. En la familia existen grupos con grandes diferencias de costumbres y morfología. La mayoría de las especies anidan en árboles y arbustos pero algunas lo hacen exclusivamente en el suelo. Son muy adaptables y cambian su comportamiento rápidamente según las circunstancias. Habitan las selvas húmedas tropicales y subtropicales de regiones bajas además de las zonas arbustivas,

aunque también puede vivir en los antiguos bosques degradados. Se alimentan de frutos y de insectos. Son reconocidos omnívoros (61).

2.2.1.5.4. Pipridae, familia de ave del neotropico, de silueta compacta con el pico corto y ancho, y alas y cola corta, excepto en los machos de algunas especies. El plumaje de los machos suele ser de colores vivos, mientras que el de las hembras es menos llamativo, generalmente verdoso. Miden de 7 a 16,5 cm. Habitan los bosques bajos y húmedos, los pantanos y además los bosques altamente degradados. Se alimentan sobre todo de pequeños frutos, bayas e insectos. Muchas especies presentan espectaculares rituales de apareamiento por el sistema de lek. No forman parejas estables, y la construcción del nido, la incubación y el cuidado de los polluelos, corre a cargo de la hembra (62).

2.2.1.5.5. Furnariidae, son aves de América Central y del Sur, que incluyen los trepadores (Dendrocolaptinidae) que son las aves más ampliamente distribuidas y ubicuas del bosque húmedo amazónico de tamaño pequeño o mediano entre 10 a 26 cm, con alas generalmente cortas y redondeadas, patas fuertes y cola larga con el raquis de las plumas con la punta modificada con forma de gancho. El color dominante del plumaje es parduzco. Se alimentan de pequeños insectos, recorriendo troncos y extrayendo a sus presas de la corteza con su pico (63).

2.2.1.5.6. Emberizidae, incluye aves caracterizadas por tener un relieve óseo en el paladar, que corresponde con una muesca en la mandíbula inferior, de pequeño y mediano tamaño, con pico corto, cónico y fuerte, con patas largas y grandes. Habita en matorrales húmedos subtropicales o tropicales, pastizales y zonas abiertas muy degradadas. Frecuentan campos de gramíneas o herbáceas, matorrales bajos, sitios con arbustos y zonas claras. Forrajean entre la vegetación baja y principalmente se alimentan de semillas y bayas como complemento (64).

2.2.1.5.7. *Thamnophilidae*, (hormigueros, hormiqueritos, batarás.) son aves de pequeño a mediano tamaño 7,5 a 34 cm. Tienen alas cortas, patas fuertes y cola corta, el pico proporcionalmente largo. En el plumaje predominan los colores pardo, blanco y negro. Viven en las selvas y bosques tropicales y subtropicales de Centroamérica y Sudamérica. En general se alimentan en parejas y algunas especies en bandadas mixtas. Forrajean cerca del suelo y algunas especies se han especializado en seguir a los ejércitos de hormigas legionarias (*Ecitoninae*) para cazar los pequeños invertebrados que huyen de las hormigas (65).

2.2.1.5.8. *Formicariidae*, son una familia de aves que habitan en los bosques y selvas tropicales y subtropicales de América Central y América del Sur. Miden entre 10 y 20 cm de longitud, y son de costumbres terrestres. Tienen las alas cortas y redondeadas, las patas largas, la cola corta, y la cabeza y los ojos grandes. Los colores dominantes en su poco vistoso plumaje son el rojo, el verde oliva, el pardo, el negro y el blanco. No hay dimorfismo sexual en el plumaje. Se alimentan de insectos entre la hojarasca, principalmente de hormigas, pero también los hay que pueden comer pequeños vertebrados o frutas. Su hábitat natural son los bosques húmedos subtropicales o tropicales de tierras bajas (66).

2.2.2 Migración

Las aves migratorias neotropicales son las especies del hemisferio occidental de las cuales, la mayoría de individuos se reproduce al norte del trópico de cáncer e inverna al sur de dicha latitud; el trópico de cáncer es la línea ecuatorial, que marca el límite norte de la zona tropical (67).

La migración, les permite aprovechar la abundancia de alimento según la estación del año y evitar las épocas de escasez, además incrementa el éxito reproductivo, ya que pueden criar en promedio a un número mayor de polluelos, que permaneciendo en los trópicos (67). Las distancias migratorias varían entre las diversas especies y entre los

individuos de una misma especie, puede durar desde varias semanas hasta 4 meses. Un 75% de aves cantoras, migra a una altura entre 150-600metros, llegando hasta 2000m (67, 68).

Varios factores ambientales estimulan la producción de hormonas, las que a su vez dan lugar a cambios en el comportamiento y la fisiología del animal, preparándose para la migración. Los cambios ambientales que tienen lugar en las zonas de invernación, donde la duración del día es relativamente constante, son más sutiles y mucho menos comprendidas (67, 68).

2.3 Bosques amazónicos

La Amazonía es una de las regiones geográficas del mundo con mayor concentración de biodiversidad de especies, ecosistemas y variación genética. La biodiversidad es el reflejo de una complejidad de ecosistemas fundamentales para el mantenimiento del equilibrio climático global. Y que además favorece el desarrollo de actividades económicas regionales como; el ecoturismo, la zootecnia, la agroindustria y la extracción forestal de especies maderables y no maderables (48).

La Amazonía peruana ocupa un área de más de 782,8 mil km² (13,05% del total continental), siendo el segundo territorio nacional amazónico más grande, después del Brasil. Posee un clima tropical lluvioso muy cálido, su temperatura media es de 28°C, alta humedad relativa (superior al 75%) y gran cantidad de precipitaciones anuales. Sus suelos en su mayoría son de origen fluvial, es decir, provienen de los sedimentos arrastrados desde los Andes a través de millones de años y que han sufrido procesos de transformación dando origen a diversos suelos, que debido a las altas temperaturas y altas precipitaciones, poseen pocos nutrientes. Aquí encontramos más del 50 % de la fauna que vive en Perú, la cual puede ser dividida según los estratos boscosos (fauna del suelo, del sotobosque, de los troncos, de las coronas y de las aguas) (69).

2.3.1 Características del bosque amazónico de Madre de Dios

Madre de Dios alberga 11 tipos de bosques y otras 3 formaciones (zonas deforestadas por acción antropogénica y/o eventos naturales, lagunas y ríos). Donde predominan los bosques de terraza Disectada, los bosques Aluviales inundables y los bosques de terraza baja y alta. Además se encuentran 16 subtipos de bosque y otras 3 agrupaciones adicionales (áreas intervenidas, cuerpos de agua, playas y bancos de arena) (70).

Las asociaciones de vegetación con mayor superficie se observan en las llanuras de sedimentación donde están los Bosques con Aguajal con 12 517,25 ha, los Bosques con Paca con 12 712 ha, Pantanos con vegetación 19 380,95 ha. En las áreas intervenidas se encuentran los Bosques secundarios de actividad Agropecuaria que cubren 288,45 ha (0,11%) y las áreas Deforestadas 2657,17% (0,97%). Estos bosques de Madre de Dios se conservan en 5 áreas naturales protegidas por el estado: Reserva Comunal Amarakaeri, Parque Nacional del Manu, Parque Nacional Alto Purus, Parque Nacional Bahuaja Sonene y Reserva Nacional Tambopata (70).

2.3.2 Reserva Nacional Tambopata y Parque Nacional Bahuaja Sonene

La Reserva Nacional Tambopata (RNTAMB) y el Parque Nacional Bahuaja Sonene (PNBS) son áreas naturales protegidas por el estado (ANPS), bajo la supervisión del Servicio Nacional de Áreas Naturales Protegidas (SERNANP). Forman parte del Corredor de Conservación Vilcabamba-Amboró (CCVA), el cual es un “Hotspot” de protección mundial y es considerada una de las regiones más diversas del mundo y de más alto nivel de endemismo los cuales brindan hábitats saludables para la recuperación y refugio de poblaciones de especies amenazadas (70).

La Reserva Nacional Tambopata presenta uno de los mayores índices de biodiversidad del mundo, con una multiplicidad de hábitats y de especies silvestres. Está ubicada en la zona media y baja de la cuenca del río Tambopata, al sudeste de la Región de Madre de Dios, en los Distritos de Tambopata e Inambari de la provincia de Tambopata. Ocupa un área de 274 690 hectáreas, con un rango altitudinal que va desde los 450 a 600msnm y una temperatura media anual de 26°C fluctuando entre 7.1°C y 38°C. Las temperaturas bajas se deben al llamado “friaje”, que son vientos antárticos que ingresan a la Amazonia entre Junio y Julio. El promedio de precipitación anual está entre 1600 y 2400mm con mayor incidencia pluvial entre Octubre y Abril. La RNTAMB protege y aprovecha recursos de diversos ecosistemas de bosque primario y secundario (71, 72).

En la zona de amortiguamiento colindante se encuentran las Comunidades Nativas de Palma Real, Sonene e Infierno, pertenecientes al grupo etnolingüístico Ese Eja, y la Comunidad Nativa Kotsimba, del grupo etnolingüístico Puquirieri. En la RNTAMB, también se encuentran los centros poblados agropecuarios Loero y Jorge Chávez, quienes están involucrados cada vez más en el creciente desarrollo relacionado al turismo. El objetivo principal del área es proteger la flora, la fauna, la población humana nativa y los procesos ecológicos de una muestra de selva húmeda tropical (71, 72).

El Parque Nacional Bahuaja Sonene es territorio ancestral de la etnia Ese Eja y es el eslabón que conecta la conservación de Perú y Bolivia. Se ubica en la ecoregión de bosque húmedo de la Amazonia suroccidental en los departamentos de Madre de Dios y Puno. Ocupa un área de 537 000 hectáreas, con una temperatura media anual de 30°C fluctuando entre 10°C y 38°C y temporadas de “friaje”, entre Junio y Julio. Protege elementos únicos en el Perú, como la sabana húmeda tropical, hábitat de especies como el lobo de Crin y el ciervo de los pantanos, en todo el PNBS se han reportado cerca de 600 especies de aves (73).

2.3.2.1 Descripción de hábitats

La RNTAMB presenta hábitats típicos de del bosque húmedo de la Amazonía suroccidental. Según el mapa ecológico del Perú (INRENA, 2004) presentan hábitats: Bosque húmedo Subtropical, Bosque muy húmedo Subtropical, Bosque muy húmedo Subtropical transicional a Bosque Pluvial Subtropical (72).

El PNBS presenta hábitats típicos del bosque húmedo y del bosque húmedo premontano tropical. El hábitat más destacado es la Sabana húmeda tropical llamado Pampas del Heath, que es un ecosistema poco conocido y con características únicas en el país, se trata de una gran planicie cubierta de pastizales de hasta 2 metros de altura con pequeñas aglomeraciones de palmeras, son además el límite sur de los bosques tropicales del continente, que aquí se transforman en las sabanas benianas (73).

2.3.2.2 Conservación

El Servicio Nacional de Áreas Naturales Protegidas de la RNTAMB y PNBS a través del monitoreo y patrullaje conservan las siguientes zonas (72, 73).

- Zona de uso Especial y Zona en Recuperación: La Zona de uso especial se encuentra al límite de la Reserva nacional Tambopata y la zona de amortiguamiento. Aquí se encuentran los centros poblados Loero, Jorge Chávez y Nueva América, quienes han hecho uso insostenible del bosque con actividades agropecuarias, generando deforestación y conversión de bosques en tierras de cultivo y aparición de bosque secundarios con pastizales de uso ganadero. La zona en recuperación, colindante a la zona de uso especial, alberga una muestra de bosque húmedo Subtropical fragmentado que propone sostenibilidad a través del manejo de agroforestería. Ambas zonas de uso pertenecen al ámbito del PCV Jorge Chávez- Loero.

- Zona silvestre: La Zona Silvestre mantiene, protege y conserva los procesos naturales de los bosques primarios aluviales inundables de los sectores del río Candamo y Heath, y es el límite entre la Reserva Nacional Tambopata y Parque Nacional Bahuaja Sonene.
- Zona de aprovechamiento directo: La Zona de aprovechamiento directo, maneja el bosque a través del aprovechamiento de recursos como castaña, cacao, pesca, madera en concesiones forestales para las Comunidades Nativas Palma Real, Sonene e Infierno. Esta zona conserva bosques de terraza alta y aluvial inundable de castaña, aguaje, especies maderables y parches de bambú propiciando el desarrollo sostenible.
- Zona de uso Turístico: La zona turística conserva una muestra de bosque húmedo Subtropical con bosques de terraza disectada, pantanos de terraza baja, terraza alta y aluvial inundable. Es ámbito de protección de los Puestos de Control y vigilancia Sandoval, La Torre y Malinowski donde se encuentran las cochas de uso turístico Lago Sandoval, Lago Coco cocha y la Collpa Chunchos.
- Zona de protección estricta: La zona de protección estricta es de acceso restringido. Protege el bosque muy húmedo subtropical ubicado entre el ecosistema de terraza baja y aluvial inundable del sector del río Malinowski y los bosques de terraza baja y aluvial inundable transicional al bosque pluvial subtropical del sector del río Azul, Chocolatillo, Candamo. Esta zona sufre pérdida de hábitat de gran impacto por minería ilegal.

2.3.2.3 Amenazas e Impactos: Deforestación

En la Amazonia la deforestación asciende a 100 ha por semana a causa de Minería ilegal, conversión de bosque en tierras de cultivo, presión del Turismo y sobre explotación de recursos como la caza, pesca y tala. Según cálculos de SERNANP,

alrededor de 30,000 hectáreas de bosque amazónico han sido deforestadas, de las cuales 5 900 ha pertenecen a concesiones forestales, y 20 599 corresponden a zonas en donde se da otros usos al suelo diferentes al forestal. En el 2012 la zona deforestada por la minería aumentó de 100 a 1,583 hectáreas (71, 72).

En Madre de Dios, se han identificado las siguientes amenazas directas: Pérdida de hábitat, contaminación, turismo mal gestionado y aprovechamiento insostenible de recursos. Estas amenazas son causadas principalmente por la minería, extracción forestal ilegal, expansión de la frontera agrícola y ganadera, apertura de caminos, creciente población, actividades no sostenibles (cacería, pesca y extracción de recursos no maderables) y conflictos entre población y fauna (72, 74).

Alrededor del 90% de la superficie deforestada se encuentra cubierta por pastizales cultivados. El resto está conformado por cultivos agrícolas anuales (yuca) y permanentes (plátano, café, cítricos), así como por vegetación secundaria. Se considera poco probable que la deforestación disminuya en un futuro próximo, ya que los elevados precios de los alimentos y del combustible favorecen la deforestación continuada para la producción ganadera y de cultivos agrícolas, con el fin de satisfacer la demanda mundial de alimentos, forrajes y biocombustibles (75, 76).

En la Reserva Nacional Tambopata, la acción de la actividad agropecuaria ocasiona un inmenso impacto de deforestación que se sobrepone a áreas donde alguna vez existieron bosques primarios, un estudio sin publicar del Sistema de monitoreo Integral de AIDER en la zona de uso especial de la RNTAMB demostró que la deforestación por ganadería insostenible asciende a 1.2 hectáreas por cabeza de ganado (72).

La actividad agropecuaria requiere cada vez más pastos para apacentar a su ganado. Las tierras de pasto se degradan rápidamente dado el bajo nivel de nutrientes que naturalmente posee el suelo amazónico y la sobre cría de cabezas de ganado. Además se estima que menos del 10 % del suelo amazónico es apto para cultivo tradicional. Su

natural bajo nivel de nutrientes hace que la tierra se agote tras tres o cuatro cosechas consecutivas (74).

La consecuencia más evidente es la fragmentación del hábitat, que contribuye a la desaparición de la vida salvaje. Según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales (UICN), muchas especies de vida se encuentran en peligro de extinción debido principalmente a la deforestación. No solo se produce una pérdida de especies animales y vegetales, sino también de microorganismos que habitan en el suelo, reduciéndose la resistencia del ecosistema a posibles presiones (75, 76).

Además, la deforestación junto con el cambio climático, puede afectar a la distribución de las enfermedades. La Organización Mundial de la Salud (OMS) y diversas instancias nacionales constatan desde 1980 un crecimiento explosivo de enfermedades infecciosas como la fiebre amarilla, dengue, leishmaniasis y la malaria. El retorno o aumento de la incidencia de estas enfermedades es atribuido al crecimiento de la población humana, urbanización, intensificación de la agricultura, el comercio de especies, la pérdida de biodiversidad y el contacto con nuevos patógenos debido a especies invasoras (77).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Espacio y Tiempo

La investigación se realizó en tres tipos de bosques de la Reserva Nacional Tambopata y Parque Nacional Bahuaja Sonene, ubicados en la zona media de la cuenca del río Tambopata, en el distrito de Tambopata, provincia de Tambopata hasta el límite sur de los bosques tropicales con la planicie de pastizales en la parte occidental del río Heath, límite de Perú y Bolivia, al sudeste del Departamento de Madre de Dios (Anexo 1).

3.1.1 Bosque 1: RNTAMB (Reserva Nacional Tambopata), bosque maduro muy húmedo de tipo aluvial inundable del interior de la Reserva Nacional Tambopata, sectores del río Madre de Dios y Tambopata.

3.1.2. Bosque 2: ZETAMB (Zona especial Tambopata), bosque secundario intervenido por actividades agropecuarias en el límite de la zona de amortiguamiento de la Reserva nacional Tambopata y los sectores de los Centros poblados Jorge Chávez y Loero.

3.1.3. Bosque 3: HEATH (Parque Nacional Bahuaja Sonene), bosque y sabana tropical húmeda en el sector del río Heath (Sonene) y Pampas del Heath.

El tiempo de muestreo se realizó desde Junio hasta Octubre del 2015, el análisis se realizó en la Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios (UNAMAD) en Noviembre y Diciembre del 2015 y en la Universidad de Extremadura (UNEX) en Abril y Mayo del 2017.

3.2 Población y Muestra

Se desconoce el total de la población de aves amazónicas del sotobosque, para el tamaño de muestra se utilizó la fórmula para poblaciones infinitas con un nivel de confianza de 95%, una prevalencia de 16,25% (5) y un error permisible de 5 %. Siendo esta la siguiente:

$$n = \frac{Z^2 \cdot p \cdot (1-p)}{E^2}$$

Dónde: n = Tamaño de muestra

Z= Nivel de confianza

p= Prevalencia

E= Grado de precisión a emplear

Entonces: n = X

Z= 95% (1,96)

p= 0,1625

E= 5%

Reemplazando en la fórmula:

$$n = \frac{(1,96)^2 \cdot (0,1625) \cdot (0,8375)}{(0,05)^2}$$

$$n = 209$$

En total se colectaron 210 muestras sanguíneas, pertenecientes a 13 familias de aves: Alcedinidae, Bucconidae, Columbidae, Emberizidae, Furnariidae, Galbulidae, Momotidae, Pipridae, Thamnophilidae, Thraupidae, Turdidae, Trochilidae y Tyrannidae. (Anexo 2) y 57 especies de aves (Anexo 3).

3.3 Diseño de la Investigación

La investigación es de tipo descriptivo prospectivo transversal. Se inició obteniendo los permisos para realizar investigación científica con colecta de especímenes dentro de áreas naturales protegidas. Se recibió apoyo de la ONG Asociación para la investigación y el desarrollo Integral (AIDER) para cubrir los gastos durante el trabajo de campo (alimentación, transporte y estadía). Y la Universidad de Extremadura de España brindo equipos y materiales para la colecta y el análisis de las muestras.

La colecta de muestras se realizó durante 3 meses en 3 distintos tipos de bosque, se capturaron aves con redes de neblina y se obtuvo una muestra de sangre mediante punción de la vena Ulnar. Una fracción de muestra se procesó en frotis finos para el análisis microscópico en el laboratorio de la facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios; la fracción de muestra restante se conservó en 500µL de SET Buffer para el análisis por Nested PCR en el laboratorio de Zoología de la Universidad de Extremadura España. Los resultados se colocaron en los programas estadísticos IBM SPSS Statistics 22, BioEdit 7.2.5 y MEGA 7.0 para el análisis e interpretación.

3.4 Materiales y equipos

a. Material biológico

- Muestras sanguíneas de aves silvestres.

b. Materiales para trabajo de campo

- Botas de jebe
- Redes de neblina (12 metros largo x 3 metros de alto)
- Bolsas de contención (bolsas de tela)
- Etanol al 96%

- Desinfectante de manos (alcohol en gel)
- Guantes descartables de látex
- Marcadores indelebles Sharpie
- Agujas N° 25G x $\frac{5}{8}$ "
- Algodón
- Metanol
- Laminas portaobjetos
- Capilares heparinizados
- 300 Crioviales
- SET Buffer
- Estuche de Disección
- Vaso coplin
- Bolsas Ziploc
- Sílica gel
- Libreta de campo
- Ficha de datos

c. Materiales de laboratorio

- Mandil
- Guantes descartables de látex
- Mascarilla descartable
- Solución Giemsa

- Aceite de Inmersión
- Agua destilada

d. Equipos

- Laptop ASUS
- Binoculares Vortex Diamondback 10x42
- Cámara fotográfica Nikon D710
- Carpa
- Sleeping
- Balanza Pezola
- Reloj
- GPS Garmin (GPS MAP ® 64)
- Caliper digital Powerfix Profi
- Microscopio Leica DM2000

e. Servicios

- Alimentación
- Transporte
- Impresión

3.5 Procedimiento

3.5.1. Permisos de investigación

Se inició solicitando permisos para realizar investigación científica con colecta de especímenes dentro de área natural protegida, obteniendo la resolución N° 005-2015 del Servicio Nacional de Áreas Naturales Protegidas (SERNANP) (Anexo 4); además se obtuvo permisos de los laboratorios para analizar las muestras, el laboratorio central de la facultad de Medicina veterinaria de la Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios para el análisis microscópico y el laboratorio del departamento de zoología de la Universidad de Extremadura de España para el análisis molecular.

3.5.2. Selección del área de estudio

Los bosques del estudio presentaron diferentes características de hábitat, en la Reserva Nacional Tambopata se seleccionó el bosque conservado de la zona silvestre del interior de la Reserva Tambopata y el bosque deforestado con pastizales secundarios de la zona de uso especial de la Reserva Tambopata, que presenta actividades agrícolas y ganaderas; en el Parque Nacional Bahuaja Sonene se eligió la sabana de bosque y pastizales conservados (Pampas de Heath). La selección se realizó para comparar la influencia del tipo de bosque en la presencia y diversidad de los Haemosporidios.

3.5.3. Captura de animales

Se instalaron 8 redes de neblina de (12,5 x 2,6 m; con ojo de malla de 36 mm) y se trabajó en horarios de 5:30am a 11:30pm y de 3:00pm a 5:00pm, las redes de neblina se colocaron a nivel de sotobosque (0,2 m a 2,6 m), tomando en cuenta las rutas de vuelo de aves dentro del tipo de hábitat, luego de la captura, las aves fueron colocadas en bolsas de transporte de tela donde se mantuvieron tranquilas antes del proceso de

muestreo, las aves fueron identificadas y evaluadas con registros biológicos por especie, sexo, edad y condición corporal (peso y medidas del tarso con un caliper digital), finalmente se marcó el ave con un anillo de aluminio de codificación única en el tarso izquierdo o recortando un tercio de una pluma rectriz, para su identificación en caso ocurra alguna recaptura en los siguientes días (78, 79, 80, 81).

3.5.4. Toma de muestras

Se tomó una muestra sanguínea de la vena Ulnar (Braquial) con aguja N° 25G x $\frac{5}{8}$ ", de cada individuo capturado, la cantidad de muestra fue de 70 μ L de sangre obtenida con capilares heparinizados; terminada la toma de sangre se aplicó presión sobre la punción para permitir la coagulación de la sangre y evitar el sangrado. Se tomaron todas las medidas de bienestar animal como realizar de forma correcta la sujeción de la aves para minimizar el tiempo de manipulación y evitar lesiones, monitorear el ritmo respiratorio - cardíaco y evitar estímulos amenazantes como ruidos excesivos, el tiempo estimado de muestreo por ave fue de tres minutos (82).

3.5.5. Liberación del ave

Una vez obtenida la cantidad de muestra sanguínea se liberó el ave capturada. El tiempo invertido en toda la metodología desde la contención de un individuo hasta ser liberado no excedió los 5 minutos (82).

3.5.6. Procesamiento de muestras

Se colocó una gota de muestra sanguínea sobre una lámina portaobjetos para hacerla correr firmemente a lo largo de su borde en un ángulo de 45° y obtener un frotis fino, una vez seco los frotis se colocaron dentro de un vaso coplin y se cubrieron con metanol durante 3 minutos para la fijación de la muestra (83, 84).

Se depositó el resto de muestra sanguínea dentro de un criovial que contiene 500µL de SET buffer (0.15 M NaCl, 0.05 M Tris, 0.001 M EDTA, pH 8.0) para conservar material genético para el posterior análisis molecular (46).

3.5.7. Transporte

Las muestras se conservaron rotuladas con el código de muestra y código de especie del ave y se transportaron en cajas plásticas con sílica gel, los frotis sanguíneos se llevaron al laboratorio central de la facultad de Medicina veterinaria de la Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios y los crioviales se enviaron al laboratorio del departamento de zoología de la Universidad de Extremadura de España.

3.5.8. Análisis de laboratorio

3.5.8.1. Identificación morfológica de los hemoparásitos

En el laboratorio de la facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios; los frotis fijados se introdujeron en un vaso coplin, se vertió la tinción Giemsa sobre ellos, cubriéndolos por completo y dejando actuar la tinción por 40 minutos; finalmente se descartó el exceso de colorante diluido lavando la lámina con agua destilada (1, 84).

Con los frotis sanguíneos, se realizó un examen microscópico para detectar la presencia de los géneros: *Plasmodium*, *Haemoproteus* y *Leucocytozoon* por identificación morfológica. Se observó como mínimo 500 mil eritrocitos (100 campos microscópicos utilizando el objetivo de 40x, y 100 campos utilizando el objetivo 100x con aceite de inmersión). Se examinó cada muestra en un promedio de 20 minutos en busca de diferentes estadios de hemosporidios siguiendo las características morfológicas internas de los eritrocitos parasitados (45, 84).

3.5.8.2. Detección molecular de los hemoparásitos

Los parásitos fueron detectados con la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR anidada o Nested PCR), la cual comprendió dos ciclos de amplificación positiva del ADN citocromo b, con el fin de incrementar la sensibilidad de detección.

En el laboratorio del departamento de Zoología de la Universidad de Extremadura de España, se utilizó la muestra sanguínea colectada en SET buffer para extraer ADN con el Kit QIAamp Mini (46). El ADN genómico diluido se utilizó como plantilla en las pruebas de PCR anidada, amplificando una región de 479 pares de bases del gen del citocromo b del parásito (47).

Primero se realizó una reacción con los primers externos para amplificar una región de ADN de manera general a Haemosporidios. Después, con este producto de amplificación, se ejecutó una segunda PCR con los iniciadores internos para amplificar regiones específicas a *Plasmodium*, *Haemoproteus* y *Leucocytozoon* (46).

Los primers de la PCR 1 fueron HaemNFI (5-CATATAT-TAAGAGAAITATGGAG-3) y HaemNR3 (5-ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC-3) para amplificar el ADN mitocondrial de los parásitos Haemosporidios. Los primers utilizados en la PCR 2 fueron HaemF (5-TGGTGCTTTCGATATATGCATG-3) y HaemR2 (5-GCATTATCTGGATGTGATAATGGT-3) para los géneros *Plasmodium*, *Haemoproteus*, y para *Leucocytozoon* se emplearon HaemFL (5- ATGGTGTTTTAGATACTTACATT-3) y HaemR2L (5-CATTATCTGGATGAGATAATGGIG C- 3) (47) (Anexo 5).

El protocolo de amplificación de la PCR 1 comenzó con 3 minutos a 94°C, seguido de 20 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos y 72°C durante 45 segundos, y finalmente el paso de elongación final fue a 72°C durante 10 minutos, antes de la reacción cíclica las muestras fueron incubadas a 94 °C durante 3 minutos, y a 72 °C durante 10 minutos una vez finalizados los ciclos. Se usaron 2 µl del producto de la primera PCR como molde para la segunda PCR anidada (46, 47).

En la PCR 2 se tomó 2µl de producto de la PCR 1. El proceso constó de 35 ciclos con las mismas temperaturas y tiempos que en la anterior, la amplificación fue evaluada añadiendo 1,5 µl del PCR final en un gel de agarosa al 2 % y revelado en un documentador de geles (BIORAD). Todos los experimentos PCR contenían un control negativo para cada 8 muestras (47).

Para determinar la diversidad genética de haemosporidios se utilizó los resultados de las secuencias de parásitos hallados, aquellos que diferían en un nucleótido se consideraron que representaban un linaje evolutivo independiente. Las secuencias de nuevo descubrimiento serán publicadas en la base de datos GenBank. Las relaciones filogenéticas entre los linajes parásitos fueron estimadas usando el método de máxima probabilidad en el programa MEGA 7 (85).

3.6 Diseño Estadístico

El análisis estadístico de prevalencia y diversidad se realizó mediante el programa IBM SPSS Statistics 22 (2013). Los resultados de prevalencia fueron expresados en cuadros e histogramas utilizando el análisis porcentual en el programa Excel para Windows (2013). Los resultados de diversidad se representaron en cuadros y en un dendrograma de agrupamiento (Cluster) utilizando los índices de similitud Jaccard y los índices de diversidad de Shannon. Se realizó una regresión logística del Modelo Lineal General (GLM) para evaluar simultáneamente la influencia del tipo de hábitat y la condición corporal (peso corregido) en la probabilidad de infección.

Los análisis de diversidad genética se realizaron utilizando el programa BioEdit 7.2.5 (2013) para la edición de las secuencias genéticas, y con el programa MEGA 7.0 (2016) para la estimación de distancias filogenéticas mediante el método Neighbor-Joining modelo Tamura-Nei. Los resultados se representaron en un cladograma (árbol de relación evolutiva) y un cuadro de distancias evolutivas de los parásitos.

IV. RESULTADOS

De un total de 210 muestras sanguíneas de aves del departamento de Madre de Dios, Perú; se obtuvo 10% de muestras positivas a hemosporidios (21/210). Del total de muestras positivas, el 57% (12/21) fueron positivas a *Plasmodium*, 29% (6/21) fueron positivas a *Haemoproteus* y 14% (3/21) fueron positivas a *Leucocytozoon*.

Cuadro 1: Presencia de Hemosporidios aviáres en los bosques de Madre de Dios. (n= 21)

Haemosporidios	Muestras positivas	
	n°	(%)
<i>Plasmodium</i>	12	57%
<i>Haemoproteus</i>	6	29%
<i>Leucocytozoon</i>	3	14%
Total	21	100%

La prevalencia total (10%), estuvo distribuida en 8 familias de aves. Thraupidae contribuyó con un 3,8% al porcentaje de infectados y las familias Tyrannidae, Columbidae y Thamnophilidae con un 1,4% (Anexo 6).

Para hallar las prevalencias de Haemosporidios en las familias muestreadas se utilizó el (N) de cada familia de aves; *Plasmodium* presentó mayor prevalencia en las familias Thamnophilidae con un 13,6% (3/22) y Thraupidae 11,3% (8/62). Para *Haemoproteus* las prevalencias mayores fueron para Bucconidae 33,3% (1/3), seguido por las familias Columbidae 10,7% (3/28) y Tyrannidae 6,1% (2/33). Y para *Leucocytozoon* la familia Trochilidae 100% (1/1), Momotidae 33,3% (1/3) y Thraupidae 1,6% (1/62)

Cuadro 2: Prevalencia de Haemosporidios en cada familia de aves

Familias	n	Géneros Haemosporidios						Total	
		<i>Plasmodium</i>		<i>Haemoproteus</i>		Leucocytozoon		Positivos	
		n°	%	n°	%	n°	%	n°	%
Trochilidae	1	-	-	-	-	1	100	1	100
Bucconidae	3	-	-	1	33,3	-	-	1	33,3
Momotidae	3	-	-	-	-	1	33,3	1	33,3
Turdidae	12	1	8,3	-	-	-	-	1	8,3
Thamnophilidae	22	3	13,6	-	-	-	-	3	13,6
Columbidae	28	-	-	3	10,7	-	-	3	10,7
Tyrannidae	33	1	3	2	6,1	-	-	3	9,1
Thraupidae	62	7	11,3	-	-	1	1,6	8	12,9

Las prevalencias según el tipo de bosque se reflejaron de la siguiente manera: En el Bosque RNTAMB se obtuvo 6,5% (4/62) de muestras positivas a Haemosporidios, en el bosque ZETAMB se obtuvo 14,3% (10/70) y en HEATH se obtuvo 9% (7/78). Del total, RNTAMB presentó mayor prevalencia 3,2% (2/62) de *Plasmodium* frente a otros hemosporidios. ZETAMB presentó similares prevalencias de *Haemoproteus* y *Plasmodium* con 7,1% (5/70) y 5,7% (4/70) respectivamente. HEATH presentó alta prevalencia 7,7% (6/78) de *Plasmodium* y no se encontró *Haemoproteus*. Los resultados para *Leucocytozoon* son similares para los tres hábitats.

Cuadro 3: Prevalencia de hemosporidios por tipo de bosque (Anexo 7) y (Anexo 8).

Bosques	n	Géneros Haemosporidios						Total	
		<i>Plasmodium</i>		<i>Haemoproteus</i>		<i>Leucocytozoon</i>		Positivos	
		n°	%	n°	%	n°	%	n°	%
RNTAMB*	62	2	3,2%	1	1,6%	1	1,6%	4	6,5%
ZETAMB**	70	4	5,7%	5	7,1%	1	1,4%	10	14,3%
HEATH***	78	6	7,7%	0	0%	1	1,3%	7	9%

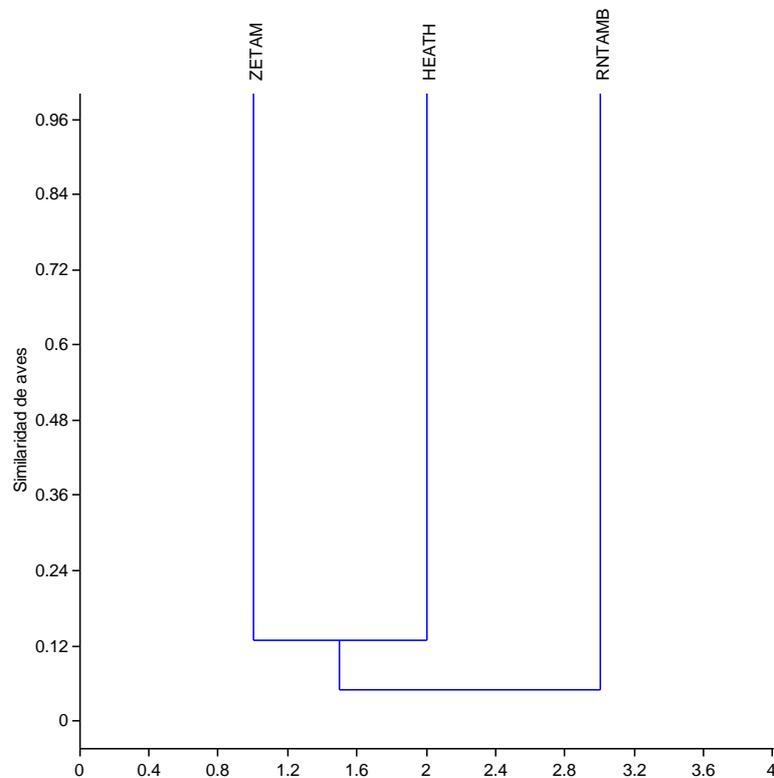
* RNTAMB = Reserva Nacional Tambopata

** ZETAMB = Zona especial Tambopata

*** HEATH = Bahuaja Sonene Heath

Los 3 tipos de bosques presentaron bajos índices de semejanza en el análisis de similitud de Jaccard (existió diferencias en la diversidad de especies de aves capturadas), la mayor similitud fue entre los índices de ZETAMB y HEATH con una distancia de 0,128 (12,8%), ZETAMB y RNTAMB fueron 0.06 (6%) semejantes y RNTAMB y HEATH tuvieron la distancia mínima de similitud con 0,039 (3,9%).

Grafico 1: Cluster de los indices de similitud Jaccard.



* RNTAMB = Reserva Nacional Tambopata

** ZETAMB = Zona especial Tambopata

*** HEATH = Bahuaja Sonene Heath

Se compararon los índices de diversidad de Shannon para los 3 tipos de bosques, con el número de especies de aves muestreadas ($n=210$) y con el número de especies de aves parasitadas ($n=21$). RNTAMB presentó mayor índice de diversidad de aves muestreadas con 3,14 (31 especies) y menor índice de diversidad de aves parasitadas con 1,39 (4 especies). ZETAMB presentó el menor índice de diversidad de aves muestreadas con 2,52 (22 especies) y mayor índice de diversidad de aves parasitadas con 1,83 (7 especies). HEATH presentó el índice 2,59 de aves muestreadas (22 especies) y 1,75 de aves parasitadas (6 especies). (Anexo 9) y (Anexo 10).

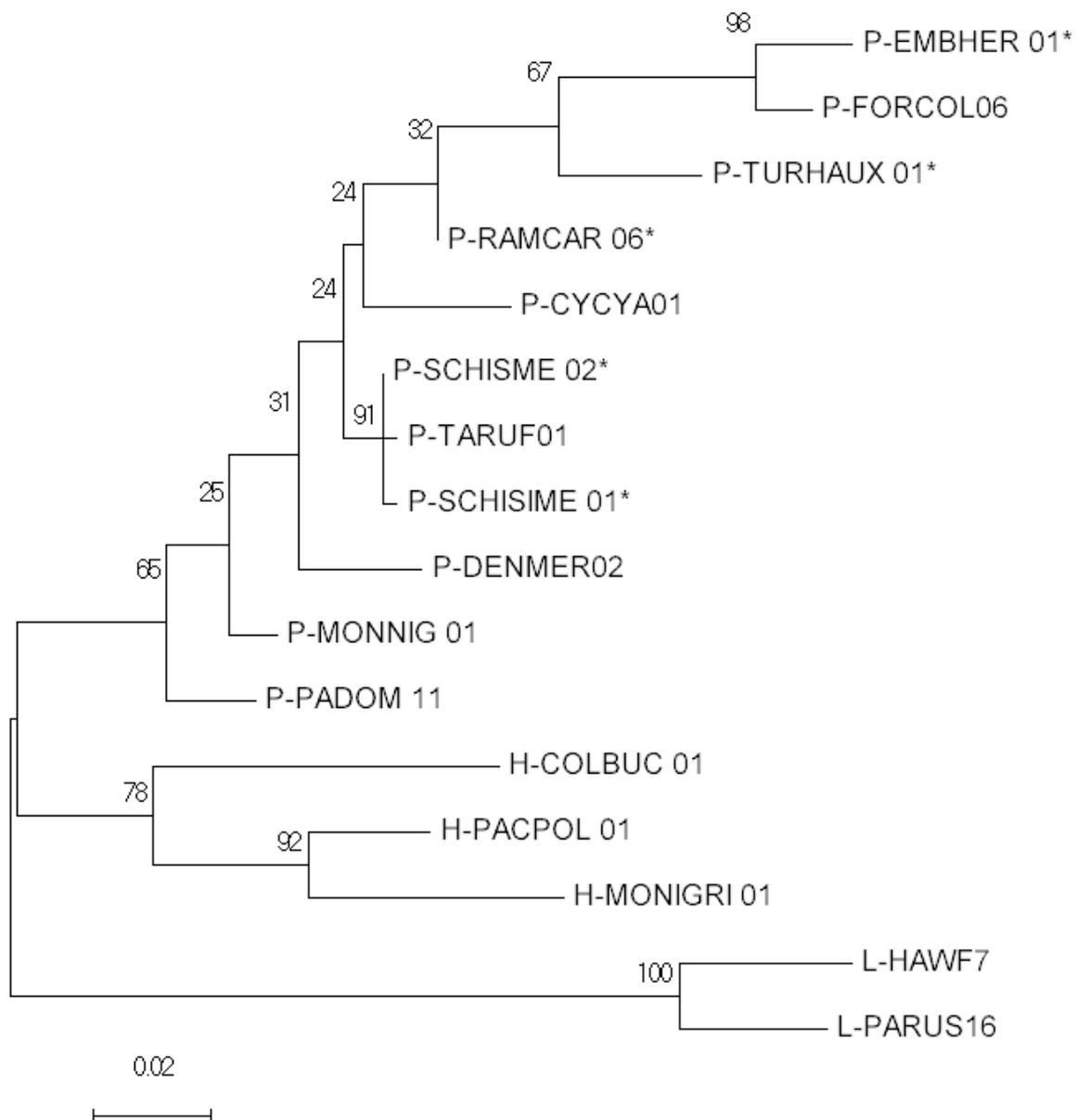
Se analizaron los dos tipos de bosque de Tambopata (Reserva Nacional de Tambopata y Zona Especial de Tambopata) para determinar si el bosque es un posible factor que influye en la infección por parásitos haemosporidios en las aves. Se realizó un análisis de regresión logística incluyendo como variables predictivas el tipo de bosque (RNTAMB y ZETAMB) y la condición corporal (peso corregido) de los individuos. El tamaño de muestra fue de 132 individuos. Se encontró un valor significativo P (0,043) para el tipo de bosque, indicando que el tipo de bosque influye significativamente en la posibilidad de infección por haemosporidios aviares.

Cuadro 4: Regresión logística para tipo de bosque y condición corporal ($n= 132$)

Variable	Estimate	SE	Z - value	P
Tipo de bosque	- 0.6549	0.3222	- 2.033	0.043
Condición corporal	- 0.1649	0.1776	- 0.929	0.353
Intercepto	1.6448	0.4230	3.888	< 0.001

Para determinar la diversidad genética de Haemosporidios se utilizó el análisis molecular de citocromo b, los resultados mostraron 16 secuencias de nucleótidos consideradas linajes. Las relaciones filogenéticas fueron inferidos mediante el método de máxima probabilidad (Neighbor-Joining) basado en el modelo de Tamura-Nei empleando el software MEGA7 (85).

Gráfico 2: Relaciones filogenéticas por método de máxima verosimilitud de los 16 linajes de Haemosporidios (Anexo 11).



Los 16 linajes genéticos se encontraron parasitando a 17 especies de aves, la presencia de linajes vario según el tipo de bosque, ZETAMB presentó 7 linajes (43,75%), RNTAMB 4 linajes (25%) y HEATH 6 (37,5).

Cuadro 5: Linajes presentes por especie de ave y tipo de bosque.

PARÁSITOS	AVES		BOSQUES		
	LINAJE	FAMILIA	ESPECIES	RNTAMB	ZETAMB
H-COLBUC 01	Columbidae	<i>Columbina talpacotti</i>	0	3	0
H-MONIGRI 01	Bucconidae	<i>Monasa nigrifrons</i>	1	0	0
H-PACPOL01	Tyrannidae	<i>Contopus virens</i> , <i>Pachyramphus</i> <i>polychopterus</i>]	0	2	0
P-CYCYA 01	Thamnophilidae	<i>Willisornis poecilinotus</i>	0	0	1
P-DENMER 02	Thamnophilidae	<i>Myrmeciza goeldii</i>	1	0	0
P-EMBHER 01	Thraupidae	<i>Emberizoides herbicola</i>	0	0	1
P-FORCOL 06	Thamnophilidae	<i>Formicarius colma</i>	1	0	0
P-MONNIG 01	Tyrannidae	<i>Myarchus tuberculifer</i>	0	1	0
P-PADOM 11	Thraupidae	<i>Ramphocelus carbo</i>	0	1	0
P-RAMCAR06	Thraupidae	<i>Ramphocelus carbo</i>	0	1	0
P-SCHISME 01	Thraupidae	<i>Schistochlamys</i> <i>melanopsis</i>	0	0	1
P-SCHISME 02	Thraupidae	<i>Schistochlamys</i> <i>melanopsis</i> , <i>Coryphaspiza melanotis</i>	0	0	2
P-TARUF 01	Thraupidae	<i>Tangara cayana</i>	0	0	1
P-TURHAUX 01	Turdidae	<i>Turdus hauxwelli</i>	0	1	0
L-PARUS16	Trochilidae	<i>Phaethornis ruber</i>	0	1	0
L-HAWF 7	Thraupidae	<i>Baryphthengus martii</i> , <i>Thraupis palmarum</i>	1	0	1
	Momotidae				
Total Linajes			4	7	6
Total Individuos			4	10	7

V. DISCUSIÓN

De las 210 muestras analizadas se obtuvieron 21 muestras positivas (10%). Esta prevalencia de individuos infectados es ligeramente menor a la encontrada en otros estudios realizados en la Amazonía, que tienen un rango de 14% a 18% de positividad (4, 5, 7, 32, 33) y es diferente a los ecosistemas de la costa y vertiente de los Andes, que presentan mayores prevalencias de hasta 32,35% (6, 21 - 24). La baja prevalencia parece estar influenciada por la gran diversidad de especies de aves que se pueden capturar en la Amazonía. Además es importante resaltar que las aves capturadas son probablemente las que pudieron sobrevivir al período agudo de la enfermedad (11), debido a que en la amazonia existe una alta competencia de supervivencia.

De los tres géneros de parásitos encontrados, el predominante fue *Plasmodium* (5,7%), seguido de *Haemoproteus* (2,9%), siendo *Leucocytozoon* (1.5%) el de menor porcentaje. La prevalencia predominante para *Plasmodium* en la Amazonía se ha observado en estudios previos en Brasil, Ecuador y Perú (4 – 7, 28), a excepción de la vertiente de los Andes, donde parece ser *Haemoproteus* y *Leucocytozoon* son los más prevalentes (22, 23). Estas diferencias dependen de la variación en la composición de las comunidades de vectores, mosquitos culícidos para *Plasmodium* e insectos culicoides e hipobóscidos para *Haemoproteus* (1), debido a que la distribución de vectores puede verse afectada por el tipo de vegetación, patrones de lluvia, temperaturas, altitudes y geomorfología.

La mayor contribución al porcentaje total de infectados fue el de la familia Thraupidae con 38% (8/21) de positividad y representa el 58% para los infectados con *Plasmodium* (7/12). Para *Haemoproteus* la contribución de la familia Columbidae representó el 50%

(3/6) de infectados. La variación entre las prevalencias de cada familia hospedadora, mostró que algunas presentan porcentajes más altos de infección. Las mayores prevalencia de *Plasmodium* fueron para las familias *Thamnophilidae* 13,6% y *Thraupidae* 11,3%. Las prevalencias altas de *Haemoproteus* fueron para la familia *Bucconidae* 33,3%, seguido de la familia *Columbidae* 10,7% y *Tyrannidae* 6,1%.

Las prevalencias por familia contrastan con los encontrados por Ricopa y Villa en Iquitos donde encontraron una mayor prevalencia de infección en las familia *Icteridae* y *Pipridae* (5). Queda reportado el hecho de que los parásitos sanguíneos infectaron más frecuentemente a ciertas familias de aves que a otras. Estas diferencias podrían ser interpretadas teniendo en cuenta el comportamiento de las aves de estas especies, ya que pudieran tener patrones comportamentales como sitios de nidificación y posaderos que les haga estar más en contacto con vectores potencialmente transmisores de los hemoparásitos.

El estudio analizó la prevalencia de infección en tres zonas forestales: bosque amazónico primario (RNTAMB), una zona deforestada de bosque amazónico (ZETAMB) y una Sabana amazónica (HEATH); en el bosque ZETAMB se obtuvo 14,3%, en HEATH se obtuvo 9% y en RNTAMB se obtuvo 6,5% de muestras positivas a Haemosporidios. Los tres tipos de bosque presentaron baja similitud entre sí, ZETAMB y HEATH tuvieron el mayor índice de semejanza con 12,8%, RNTAMB y HEATH tuvieron la mínima similitud con 3,9%. La principal característica para evaluar los tipos de bosque consiste en que el bosque que sufre deforestación presenta importantes cambios en la estructura (carencia de cobertura vegetal) y en la composición de la comunidad de aves, a diferencia del contiguo bosque primario de RNTAMB.

Los resultados muestran mayor prevalencia de parásitos en los hábitats con evidente escasez de cobertura vegetal por su propia naturaleza (HEATH) y por el impacto de la deforestación (ZETAMB). Los cambios producidos por la deforestación pueden

aumentar la densidad de la población de algunos vectores al proporcionarles una mayor concentración de zonas encharcadas idóneas para su reproducción, aumentando con ello la incidencia de malaria aviar. En este sentido, se presume que la deforestación de los bosques haya sido considerado uno de los factores más potentes que han contribuido al aumento de la incidencia de enfermedades infecciosas como malaria en los últimos años (2, 10).

La diversidad en los tres tipos de bosques se comparó con los índices de diversidad de Shannon, encontrando diferencia entre los índices de la población de aves muestreadas y los índices de la población de aves parasitadas. RNTAMB presentó el mayor índice de Shannon (3,14) de la población muestreada y el menor índice (1,39) de la población infectada y ZETAMB tuvo el menor índice (2,52) de muestreados y el mayor índice (1,83) de infectados. Esto puede reflejar la capacidad de los Haemosporidios para parasitar más especies de aves hospederas en los hábitats que sufren deforestación. Según Valkiūnas algunas especies de Haemosporidios son causantes de pérdida de biodiversidad debido a su patogenicidad y según Sehgal los cambios ocasionados en el ambiente modifican el impacto de los patógenos sobre las poblaciones hospederas (1, 2)

El análisis molecular halló secuencias genéticas de 16 linajes parásitos en el gen del citocromo b mitocondrial. La máxima distancia evolutiva de secuencias de *Haemoproteus* fue entre los linajes H COLBUC 01 y H MONIGRI 01 con 12% (0,119), mientras que H PACPOL01 y H MONIGRI 01 estuvieron más emparentados con una divergencia de secuencias de 6,3% (0,063). En el caso de *Plasmodium*, la máxima distancia de secuencias fue encontrada entre los linajes P DENMER 02 y P EMBHER 01 con 8,5% (0,085), mientras que la secuencia P SCHISME 02 fue estrechamente emparentada con P SCHISME 01 y con P-TARUF01 con una distancia del 0.3 % (0,003). Los dos linajes de *Leucocytozoon* presentaron 5,5% de divergencia (0,055).

Estas cifras nos permitirían considerar a los linajes con divergencias superiores al 2,5% como verdaderas especies. Esta asunción se fundamenta en la divergencia genética del 2,5% encontrada en la evolución de las especies de malaria *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium reichenowi*, que afectan a humanos y chimpancés respectivamente. Así, apuntando a la diversidad genética encontrada en este estudio podríamos considerar que las poblaciones de aves analizadas se encuentran infectadas por 12 especies de parásitos diferentes (86).

El 37,5% de los linajes parásitos encontrados no habían sido descritos en estudios anteriores. Esta abundancia de nuevas especies descubiertas es atribuible a la diversidad en el área de estudio, considerando que Perú es el segundo país, tras Colombia, en lo que respecta a cantidad de especies de aves del mundo, de las que el 44% habitan en la Amazonia peruana. Esta particularidad en el número de especies descubiertas indica una singularidad en la comunidad parásita del área muestreada, revelando la necesidad de estudios que aborden la relación entre los parásitos y sus hospedadores en estas zonas.

Existe un estrecho vínculo entre el hospedador aviar y el parásito que habita en él; esta relación es conocida como especificidad parásita y define la capacidad del parásito de habitar en un limitado número de hospedadores. Esta especificidad presenta dos componentes bien diferenciados, por un lado se encuentra la especificidad potencial, referida a las propiedades biológicas del parásito y la compatibilidad de la bioquímica del hospedador, que determinan el rango máximo de hospedadores que puede parasitar. Por tanto, la prevalencia de un parásito en un hospedador es resultado de la susceptibilidad de los potenciales hospedadores encontrados por el parásito y la probabilidad del parásito de encontrar nuevos hospedadores.

Teniendo en cuenta estas características, los resultados se compararon con los linajes reportados en estudios previos publicados en la base de datos MalAvi (12) y se clasificó como especialistas (especies que infectan a una única especie de hospedero)

o generalistas (especies que infectan a varias especies de hospederos) (Anexo 12). Se observó diferencias en el rango de hospedadores y la distribución geográfica de las especies de parásitos halladas en el estudio. De los 16 linajes, 6 son de nuevo descubrimiento, por lo que no se dispone evidencia suficiente para determinar correctamente su rango de hospedador.

Por lo tanto linajes como COLBUC01, PACPOL01, CYCYA 01, DENMER02, MONNIG 01, PADOM 11, TARUF 01, PARUS16 y HAWF 7 son claramente generalistas por tener más de dos especies de aves hospederas diferentes. También se puede sugerir que COLBUC01 es específico para la familia Columbidae, TARUF 01 para Thraupidae, PACPOL01 para Tyrannidae y FORCOL 06 para la especie *Formicarius colma*. En relación a los nuevos linajes parásitos descubiertos, SCHISME 02 pudiera considerarse como generalistas al infectar a 2 especies de aves diferentes de la familia Thraupidae, mientras que el resto de los linajes de nuevo descubrimiento serían especialistas considerando su menor rango de amplitud hospedadora.

En relación a su área de distribución geográfica, PADOM 11 es el linaje hallado con mayor distribución geográfica, infectando a aves de Norteamérica y Sudamérica; en menor rango, COLBUL 01, CYCYA 01, DENMER 02, FORCOL 06, MONNIG 01 y TARUF 01 han sido hallados infectando aves de Sudamérica (Brasil, Ecuador, Peru); los linajes PARUS16 y HAWF 7, solo estaban reportados para aves de Europa y el Norte de África (88, 89), lo cual representa ser el primer reporte para Sudamérica demostrando una relación generalista con sus hospedadores, con el hábitat y con la región geográfica. El resto de los linajes son de nuevo descubrimiento y por ello no es posible determinar aún su rango de distribución geográfica.

Se encontró que la diversidad de linajes presentó similares proporciones para cada tipo de bosque, RNTAMB y HEATH presentaron proporciones de 50% para linajes especialistas y 50% para generalistas; sin embargo, el área deforestada ZETAMB presentó 28,5% de linajes especialistas y 71,4% generalistas. De esta manera se

evidencia que los efectos de la deforestación podrían estar incrementando la capacidad invasora de los parásitos sobre las especies de aves hospedadoras.

Los estudios sobre los efectos de la deforestación en la ecología de la malaria serán exitosos utilizando a las aves como modelo, porque representan poblaciones naturales que pueden ser estudiadas tanto en ambientes con impacto antropogénico como en bosques inalterados. Los resultados podrían evitar pandemias y aportar datos científicamente probados para políticas de conservación de los bosques del planeta (43).

VI. CONCLUSIONES

- Se colectaron 210 muestras sanguíneas correspondientes a 13 familias y 65 especies de aves y se obtuvo 21 (10%) muestras positivas a Haemosporidios, correspondientes a 8 familias y 17 especies de aves. Donde se identificaron 3 géneros de Haemosporidios: *Plasmodium* con el 57% de muestras positivas, *Haemoproteus* con 29% y *Leucocytozoon* con 14% de positividad
- Existió variación en la prevalencia de infección entre cada familia de ave y se evidenció variación en la prevalencia por tipo de bosque, las aves que vivían en el bosque deforestado presentaron una prevalencia significativamente superior (14,3%) a las aves del interior de bosque primario (6,5%) y que las aves de Sabana tropical (9%).
- En los análisis de diversidad genética de los 21 individuos infectados, se encontraron 16 linajes diferentes (11 *Plasmodium*, 3 *Haemoproteus* y 2 *Leucocytozoon*). En la Reserva Nacional Tambopata y Parque Nacional Bahuaja sonene se encontró 50% de linajes especialistas y 50% de linajes generalistas, sin embargo en el bosque deforestado de Tambopata se encontró, que el 71% linajes eran generalistas afectando directamente al índice de diversidad de aves.
- Los linajes con divergencias genéticas mayores al 2,5% permiten considerarse como especies diferentes, de esta manera encontramos 12 especies diferentes de parásitos. El 37,5% de las especies son nuevos descubrimientos para la ciencia.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar más estudios de Haemosporidios aviares en el Perú, ampliando el tamaño de muestra, la zona de estudio y la especificidad de vectores, para tener una visión más certera de la infección en la avifauna del Neotrópico.
- Desarrollar estudios combinando análisis moleculares con estudios basados en morfología, para describir las nuevas especies de parásitos, su distribución y el rango de la especificidad hospedadora.
- Realizar estudios a largo plazo que puedan explicar las dinámicas temporales en la infección.
- Estudiar los artrópodos del área y su papel como posibles vectores de hemoparásitos.
- Realizar estudios experimentales de infección con los linajes hallados en la investigación para poder demostrar los efectos negativos de la infección en la eficacia biológica de las aves.
- Fomentar actividades de educación y divulgación científica, incidiendo en la necesidad de conservar el bosque amazónico y evitar la deforestación como mecanismo para preservar la salud global.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Valkiūnas G. Avian malaria parasites and other haemosporidia. CRC Press, Boca Raton. 2005.
2. Sehgal RNM. Deforestation and avian infectious diseases. *Journal of Experimental Biology*. 2010; (213): 955–960.
3. Pérez-Tris J. La parasitología ecológica en la era de la genética molecular, AEET. *Ecosistemas*. 2009; 18 (1): 52-59.
4. Svensson-Coelho M. et al. Diversity, Prevalence, and Host Specificity of Avian *Plasmodium* and *Haemoproteus* in a Western Amazon Assemblage. *Ornithological Monographs*. 2013; 76 (1): 1 – 47.
5. Ricopa G, Hellen Villa G. Prevalencia y Diversidad de Hemoparásitos en aves capturadas en la Reserva Nacional Allpahuayo Mishana, [Tesis de Grado]. Iquitos-Perú. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. 2013.
6. Marzal Alfonso, García-Longoria Luz, Cárdenas Callirgos, Ravinder NM Sehgal. Invasive avian malaria as an emerging parasitic disease in native birds of Peru. *Biological Invasions*. 2014.
7. Fecchio A, Pinheiro R. et al. Host community similarity and geography shape the diversity and distribution of haemosporidian parasites in Amazonian birds. *Ecography* 000: 001–010. 2017
8. Levine N.D. *The Protozoan Phylum Apicomplexa*. CRC Press. USA. 1988.
9. Atkinson CT, Thomas NJ, Hunter BD. *Parasitic diseases of wild birds*. Wiley-Blackwell, Singapore. 2008: 35-53
10. Marzal A. Recent Advances in Studies on Avian Malaria Parasites, in *Malaria Parasites*. Ed. InTech. 2012: 135- 151.

11. Martínez de la Puente J. Interrelaciones entre hospedadores, vectores y parásitos sanguíneos en poblaciones de aves silvestres. [Tesis de doctorado]. Madrid, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid. 2010.
12. Bensch S, Hellgren O, Pérez-Tris. MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome *b* lineages. *Mol Ecol Resour.* 2009; (9): 1353-1358.
13. Lapointe DA, Atkinson CT, Samuel MD. Ecology and conservation biology of avian malaria. 2012: 211–226.
14. Rodríguez A. Efectos del parasitismo en aves tropicales: aspectos ecológicos y evolutivos. [Tesis de Postgrado]. Madrid. Departamento de Zoología y Antropología Física. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Madrid. 2013.
15. Atkinson CT, Van Riper III C. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon*, and *Haemoproteus*. In: Loye JE, Zuk M (Eds.) *Bird–parasite interactions: ecology, evolution, and behaviour*. Oxford. Oxford University Press. 1991: 19–48.
16. Atkinson CT, Dusek RJ, Woods KL et al. Pathogenicity of avian malaria in experimentally-infected Hawaii. *J Wild Dis.* 2005: 197–204.
17. Palinauskas V, Valkiūnas G, Bolshakov CV, Bensch S. *Plasmodium relictum* (lineage PSGS1): Effects on experimentally infected passerine birds. *Experimental Parasitology.* 2008; 120: 372-380
18. Cordero del Campillo y col. *Parasitología Veterinaria*. Ed. McGraw-Hill Interamericana. España. 1999.
19. Marzal A, Ricklefs RE, Valkiūnas G, Albayrak T, Arriero E, et al. Diversity, loss and gain of malaria parasites in a globally invasive bird. *Plos One.* 2010; 6, e21905.

20. MALAVI database care of Staffan Bensch. Supported by CAnMove and MalariaRCN. Lund University, Department of Biology. Version 2.3.1, May 3:d, 2017
21. Durrant KL, Beadell JS, Ishtiaq F, Graves GR, Olson SL, Gering E, Peirce MA, Milensky CM, Schmidt BK, Gebhard C, Fleischer RC. Avian malaria in South America: a comparison of temperate and tropical zones. *Ornithological Monographs*. 2006; 60: 98-111.
22. Merino S, et al. Haematozoa in forest birds from southern Chile: Latitudinal gradients in prevalence and parasite lineage richness. *Austral Ecology*. 2008; 33: 329–340.
23. Rodriguez O A, Moya H, Matta NE. Avian blood parasites in the National Natural Park Chingaza: high Andes of Colombia. *Hornero*. 2009; 024 (1): 1-6.
24. Belo NO, Rodríguez-Ferraro A, Braga EM, Ricklefs RE. Diversity of avian haemosporidians in arid zones of northern Venezuela. *Plos One*. 2012.
25. Valkiunas et al. A new *Haemoproteus* species (Haemosporida: Hameproteidae) from the endemic Galapagos dove *Zenaida galapagoensis*, with remarks on the parasite distribution, vectors, and molecular diagnostics. *J Parasitol*. 2010; 96:783-792.
26. Levin I, Outlaw F, Vargas, Parker A. *Plasmodium* blood parasite found in endangered Galapagos penguins (*Spheniscus mendiculus*). Elsevier. 2011
27. Fix Andrew S, Waterhouse Cheryl, Ellis C. *Plasmodium relictum* as a cause of avian malaria in wild-caught magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). *Wildlife Disease Association*. 1988.
28. Fecchio A, Lima MR, Silveira P, Braga EM, Marini MA. High prevalence of blood parasites in social birds from a neotropical savannah in Brazil. *Emu*, 111. 2011: 132–138.

29. Lacorte GA, Félix GMF, Pinheiro RRB, et al. Exploring the Diversity and Distribution of Neotropical Avian Malaria Parasites – A Molecular Survey from Southeast Brazil. Snounou G. ed. *Plos ONE*.8(3):e57770. 2013
30. Lowe S, Browne M, Boudjelas S, De Poorter M. 100 de las Especies Exóticas Invasoras más dañinas del mundo. Una selección del Global Invasive Species Database. Grupo Especialista de Especies Invasoras (GEEI) y Comisión de Supervivencia de Especies (CSE) de la Unión Mundial para la Naturaleza (UICN). 2004.
31. Invasive Species Compendium. www.cabi.org/isc/datasheet/6905
32. Domínguez Aroa. Efectos de la deforestación de la selva amazónica sobre la incidencia de malaria aviar. [Tesis de Master]. Extremadura, Departamento de Anatomía, Biología Celular y Zoología, Universidad de Extremadura. 2013.
33. Schuch De Oliveira. Densidade populacional de hospedeiros e sua relação com prevalência e diversidade de parasitas causadores da malária aviária entre aves de sub-bosque na floresta amazônica. [Tesis de Maestría]. Madrid, Instituto Nacional De pesquisas da amazônia – INPA Programa de Pós-graduação em ecologi. 2015.
34. Fecchio A, Svensson-Coelho et al. Host associations and turnover of haemosporidian parasites in manakins (Aves: Pipridae). *Parasitology*, Cambridge University. Press 2017
35. Outlaw & Ricklefs. On the phylogenetic relationships of haemosporidian parasites from raptorial birds (Falconiformes and Strigiformes). *J Parasitol*. 95:1171-1176. Phylogenetic. 2009
36. Ishak HD, Dumbacher JP, Anderson NL, Keane JJ, Valkiunas G, et al. Blood Parasites in Owls with Conservation Implications for the Spotted Owl (*Strix occidentalis*). *PLoS ONE* 3(5): e2304. doi:10.1371/journal.pone.0002304. 2008.

37. Van Rooyen J., Lalubin F., Glazot O., Christe P. Avian haemosporidian persistence and co-infection in great tits at the individual level. *Biomed Central. Malaria Journal*. 2013:12-40.
38. Mata VA., da Silva LP., Lopes RJ., Drovetski S. The Strait of Gibraltar poses an effective barrier to host-specialised but not to host-generalised lineages of avian Haemosporidia. *International Journal of Parasitology*. 2015.
39. Moller AP, Nielsen JT. Malaria and risk of predation: a comparative study of birds. *Laboratoire de Parasitologie Evolutive. CNRS UMR 7103. Université Pierre et Marie Curie*. 2007
40. Bonneaud C, Sepil I, Milá B, Buermann W, Pollinger J, et al. The prevalence of avian *Plasmodium* is higher in undisturbed tropical forests of Cameroon. *Journal of Tropical Ecology*. 2009; 25: 439–447.
41. Yasouka J, Levis R. Impact of deforestation and agricultural development on anopheline ecology and malaria epidemiology. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2007; 76 (3): 450-460.
42. Chasar A, Loiseau C, Valkiunas G, Iezhova T, Smith TB, Sehgal RNM. Prevalence and diversity patterns of avian blood parasites in degraded African rainforest habitats. *Mol. Ecol.* 2009; 18: 4121-4133.
43. Olson SH, Gangnon R, Silveira GA, Patz JA. Deforestation and malaria in Mâncio Lima county, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16: 1108-1115.
44. Vittor A., Gilman R., Tielsch J., Glass G., Sánchez Iozano W., Pinedo-cancino V., et al. The effect of deforestation on the human-biting rate of *Anopheles darlingi*, the primary vector of falciparum malaria in the peruvian amazon. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2006; 74(1): 3–11.

45. Valkiūnas G, Anwar AM, Atkinson CT, Greiner EC, Paperna I, Peirce MA. What distinguishes malaria parasites from other pigmented haemosporidians? *Trends Parasitol.* 2005; 21: 357-358.
46. Bensch S., Stjerman M., Hasselquist D., Östman Ö., Hansson B., Westerdahl H. & Torres- Pinheiro R. Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. *Proc R Soc B* 267. 2000: 1583- 1589.
47. Hellgren O, Waldenström J, Bensch S. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. *J Parasitos.* 2004; 90: 797-802
48. Sistema de Información de la Diversidad Biológica y Ambiental de la Amazonía Peruana (Siamazonía), en <<http://www.siamazonia.org.pe>>.
49. Species lists of birds for South American countries and territories: [Perú]. [15/06/2017]. <http://www.museum.lsu.edu/~Remsen/SACCCountryLists.htm>
50. eBird: Una base de datos en línea para la abundancia y distribución de las aves. eBird, Madre de Dios, Perú. Disponible: <http://www.ebird.org>. [15/06/2017].
51. Guía Oficial de Áreas Naturales Protegidas. Profonampe - Sernanp. Cimagraf. 2010.
52. Baptista, LF, Trail, PW y Horblit, HM. Palomas (Columbidae). En: Del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Christie, DA & de Juana, E. (eds.). *Manual de las Aves del mundo vivo*. Lynx Edicions, Barcelona. (<http://www.hbw.com/node/52254> el 16 de junio 2017).
53. Schuchmann, K.L. & Bonan, A. Hummingbirds (Trochilidae). En: Del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Christie, D.A. & de Juana, E. (eds.). *Handbook of the Birds of the*

- World Alive. Lynx Edicions, Barcelona. (<http://www.hbw.com/node/52268> on 16 June 2017).
54. Tobias, J. Jacamars (Galbulidae). En: Del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Christie, DA & de Juana, E. (eds.) Handbook of the Birds of the World Alive Lynx Edicions, Barcelona. (<http://www.hbw.com/node/52281> el 16 de junio 2017).
55. Rasmussen, PC y Cuello, N. Puffbirds (Bucconidae). En: Del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Christie, DA & de Juana, E. (eds.). Manual de las Aves del mundo vivo. Lynx Edicions, Barcelona. (<http://www.hbw.com/node/52282> el 16 de junio 2017).
56. Woodall, PF. Kingfishers (Alcedinidae). En: Del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Christie, DA & de Juana, E. (eds.). Handbook of the Birds of the World Alive Lynx Edicions, Barcelona (<http://www.hbw.com/node/52271> el 16 de junio 2017).
57. Snow, D. Motmots (Momotidae). En: Del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Christie, DA & de Juana, E. (eds.). Handbook of the Birds of the World Alive Lynx Edicions, Barcelona. (<http://www.hbw.com/node/52273> el 16 de junio 2017).
58. Ridgely, Robert. Tudor, Guy. Field Guide to the Songbirds of South America: The Passerines. University of Texas Press. 2009.
59. Fitzpatrick, J. Tirano atrapamoscas (Tyrannidae). En: Del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Christie, DA & de Juana, E. (eds.). Manual de las Aves del mundo vivo. Lynx Edicions, Barcelona. (<http://www.hbw.com/node/52297> el 16 de junio 2017).
60. Hilty, S. & Bonan, A. Tanagers (Thraupidae). En: Del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Christie, DA & de Juana, E. (eds.). Handbook of the Birds of the World Alive. Lynx Edicions, Barcelona. (<http://www.hbw.com/node/52380> el 16 de junio 2017).

61. Collar, N. Thrushes (Turdidae). En: Del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Christie, DA & de Juana, E. (eds.). Manual de las Aves del mundo vivo. Lynx Edicions, Barcelona. (<http://www.hbw.com/node/52318> el 16 de junio 2017).
62. Snow, D. Manakins (Pipridae). En: Del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Christie, DA & de Juana, E. (eds.). Manual de las Aves del mundo vivo. Lynx Edicions, Barcelona. (<http://www.hbw.com/node/52296> el 16 de junio 2017).
63. Marantz, CA, Aleixo, A., Bevier-, LR & Patten, MA. Trepadores (Furnaridae). En: Del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Christie, DA & de Juana, E. (eds.). Manual de las Aves del mundo vivo. Lynx Edicions, Barcelona. (<http://www.hbw.com/node/52290> el 16 de junio 2017).
64. Jaramillo, A. Prado Sparrow (*Ammodramus humeralis*). En: Del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Christie, DA & de Juana, E. (eds.). Manual de las Aves del mundo vivo. Lynx Edicions, Barcelona. (<http://www.hbw.com/node/61929> el 16 de junio 2017).
65. Zimmer, K. & Isler, M.L. Typical Antbirds (Thamnophilidae). In: Del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Christie, D.A. & de Juana, E. (eds.). Handbook of the Birds of the World Alive. Lynx Edicions, Barcelona. (<http://www.hbw.com/node/52291> del 16 de junio 2017).
66. Krabbe, N.K. & Schulenberg, T.S. Ground-antbirds (Formicariidae). In: Del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Christie, D.A. & de Juana, E. (eds.). Handbook of the Birds of the World Alive. Lynx Edicions, Barcelona. (<http://www.hbw.com/node/52292> el 16 de junio 2017).
67. Berthold Peter. Bird migración: A General Survey. Oxford University Press Inc., New York. 1993.
68. William J. Sutherland, Ian Newton, and Rhys Green. Bird Ecology and Conservation: A Handbook of Techniques. Oxford Scholarship. 2007.

69. Programa de la Naciones Unidas para el medio ambiente. GEO Amazonía: Perspectivas del medio ambiente en la amazonia. PNUMA y OTCA ISBN: 978-92-807-2946-7. 2009.
70. Guía Oficial de Áreas Naturales Protegidas. Profonampe - Sernanp. Cimagraf. 2013.
71. Reserva Nacional Tambopata. Diagnóstico del Proceso de Elaboración del Plan Maestro 2011- 2016. SERNANP PERU. 2012.
72. Reserva Nacional Tambopata. Plan Maestro 2011- 2016. SERNANP PERU. 2012.
73. Parque Nacional Bahuaja Sonene. Plan Maestro 2015- 2019. SERNANP PERU. 2015.
74. Martino D. Deforestación en la Amazonía: principales factores de presión y perspectivas. Revista del Sur. 2007; N° 169.
75. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Estudio FAO Montes. Evaluación de los recursos forestales mundiales (FRA) Informe principal. 2010; ISBN 978-92-5-306654-4.
76. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Situación de los bosques del mundo, 2009: América Latina y el Caribe. 2009: 34- 43.
77. Daszak, P., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D. 2000. Emerging infectious diseases of wildlife - threats to biodiversity and human health. Science 287:443-449.
78. Ralph J, Geupel GR, Pyle P, Martin TE, De Sante DF & Mila B. Manual de Métodos de Campo para el Monitoreo de Aves Terrestres Gen. Tech. Rep. PSW-GTR-159. Albany, CA: Pacific Southwest Research Station, Forest Service, U.S. Department of Agriculture. 1996: 46.

79. Schulenberg Thomas S., Douglas F. Stotz, Daniel F. Lane, John P. O'Neill, and Theodore A. Parker III. *Birds of Peru*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey. 2010.
80. Guía de estudio del anillador de Norteamérica. The North American Banding Council. Point Reyes Station, California U.S.A. 2001.
81. Peig J. Green AJ. New perspectives for estimating body condition from mass/length data: the scaled mass index as an alternative method. *Oikos*. 2009; 118(12): 1883-1891.
82. Book Chapter. Gosler, A. *Birds in the Hand*. in Sutherland, W.J., Newton, I. & Green, R.E. (eds.) *Bird Ecology and Conservation: A Handbook of Techniques*. Oxford. 2004: 85–118.
83. Gutierrez Gonzáles, Arróspide V. *Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de malaria*. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud. 2003: 100.
84. Seghal R, Marzal A. *Estúdios de Haemosporidios aviares con Microscópio óptico*. MalariaRCN. Research coordination Network. 2011.
85. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2013: 2725-2729.
86. Escalante AA, Freeland DE, Collins, WE, Lal AA. The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome b from the linear mitochondrial genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998; 95: 8124-8129.

ANEXOS

ANEXO 1

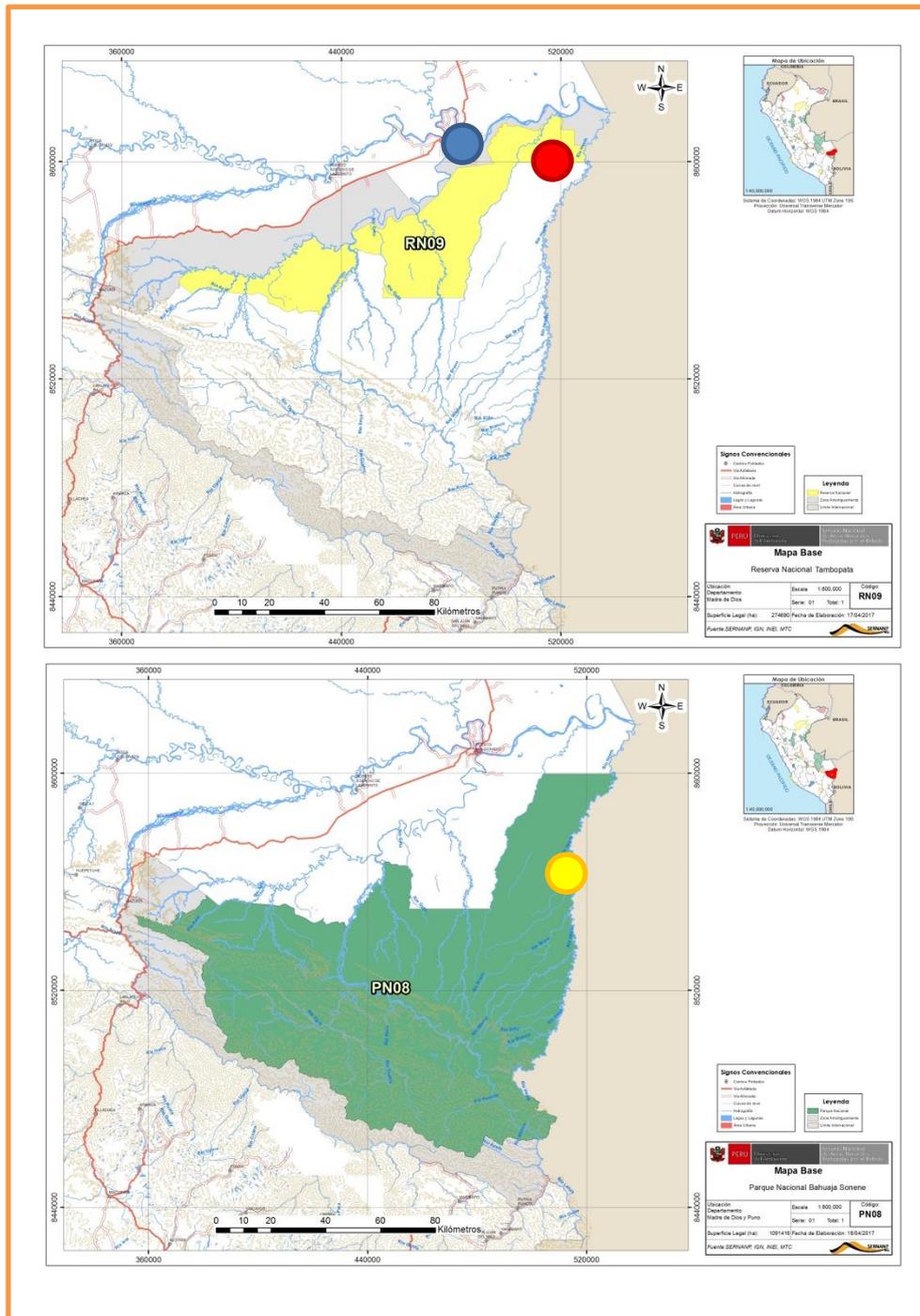


Fig. 1: Mapa de la Reserva Nacional Tambopata y Parque Nacional Bahuaja Sonene.

Fuente: Diagnóstico del Proceso de Elaboración del Plan Maestro 2011- 2016. SERNANP (35).
 Amarillo: RNTAMB y Verde: PNBS. azul. Bosque 1 (RNTAMB); rojo. Bosque 2 (ZETAMB);
 amarillo. Bosque 3 (HEATH)

ANEXO 2

Cuadro 1: Tabla de la población muestral.

FAMILIAS	N°	RNTAMB	ZETAMB	HEATH
Alcedinidae	6	4	0	2
Trochilidae	1	0	1	0
Bucconidae	3	2	0	1
Columbidae	28	0	27	1
Dendrocolaptidae	12	11	0	1
Galbulidae	3	3	0	0
Momotidae	3	3	0	0
Passerellidae	11	0	0	11
Pipridae	14	11	0	3
Thamnophilidae	22	15	2	5
Thraupidae	62	3	23	36
Turdidae	12	3	8	1
Tyrannidae	33	7	9	17
TOTAL	210	62	70	78

Fuente: Elaboración propia, 2017.

ANEXO 3

Cuadro 2: Lista de especies de aves muestreadas

Especies de Aves	RNTAMB	ZETAMB	HEATH
<i>Ammodramus humeralis</i>	0	0	11
<i>Attila spadiceus</i>	2	0	0
<i>Baryphthengus martii</i>	2	0	0
<i>Catharus ustulatus</i>	0	0	1
<i>Chloroceryle aenea</i>	1	0	0
<i>Chloroceryle inda</i>	3	0	2
<i>Columbina picui</i>	0	6	0
<i>Columbina talpacotti</i>	0	20	0
<i>Contopus virens</i>	0	1	0
<i>Coryphasiza melanotis</i>	0	0	3
<i>Deconychura longicauda</i>	1	0	0
<i>Dendrocincla fuliginosa</i>	2	0	0
<i>Dendrocincla merula</i>	1	0	0
<i>Dendroplex pictus</i>	1	0	0
<i>Elaenia chiriquensis</i>	0	1	4
<i>Elaenia cristata</i>	0	0	8
<i>Elaenia parvirostris</i>	0	0	1
<i>Electron platyrhynchus</i>	1	0	0
<i>Emberizoides herbicola</i>	0	0	2
<i>Empidonax alnorum</i>	0	0	1
<i>Eucometis penicillata</i>	2	0	0
<i>Formicarius analis</i>	1	0	0
<i>Formicarius colma</i>	1	0	0
<i>Formicivora rufa</i>	0	0	2
<i>Galbula cyanescens</i>	3	0	0
<i>Glyphorhynchus spirurus</i>	2	0	1
<i>Gymnopithys salvini</i>	4	0	0
<i>Lathroticus euleri</i>	0	1	0
<i>Leptotila subvinacea</i>	0	1	0
<i>Malacoptila semisincta</i>	1	0	0
<i>Manacus manacus</i>	0	0	3
<i>Mionectes olegineus</i>	1	2	0
<i>Monasa nigrifrons</i>	1	0	0
<i>Myarchus ferox</i>	0	0	3
<i>Myarchus tuberculifer</i>	0	2	0
<i>Myozetetes granadiensis</i>	0	1	0
<i>Myrmeciza goeldii</i>	1	0	0

<i>Myrmeciza hemimelaena</i>	2	0	0
<i>Myrmoborus miotherinus</i>	1	0	0
<i>Notharcus tectus</i>	0	0	1
<i>Onychorhynchus coronatus</i>	1	0	0
<i>Pachyramphus polychopterus</i>	0	1	0
<i>Patagioenas cayanensis</i>	0	0	1
<i>Phaethornis ruber</i>	0	1	0
<i>Phlegopsis nigromaculata</i>	5	0	0
<i>Pipra fascicauda</i>	11	0	0
<i>Platyrinchus platyrhynchos</i>	1	0	0
<i>Ramphocelus carbo</i>	0	11	0
<i>Ramphothrigon megacephalum</i>	1	0	0
<i>Rhytipterna simplex</i>	1	0	0
<i>Saltator caerulescens</i>	0	2	0
<i>Saltator maximus</i>	0	3	0
<i>Schistochlamys melanopis</i>	0	1	21
<i>Sporophila caerulescens</i>	0	2	1
<i>Tangara cayana</i>	0	0	4
<i>Tersina viridis</i>	1	1	0
<i>Thamnophilus doliatus</i>	0	2	2
<i>Thraupis episcopus</i>	0	1	0
<i>Thraupis palmarum</i>	0	0	3
<i>Turdus amaurochalinus</i>	0	6	0
<i>Turdus hauxwelli</i>	3	2	0
<i>Volatinia jacarina</i>	0	2	2
<i>Willisornis poecilinotus</i>	0	0	1
<i>Xiphorhynchus elegans</i>	3	0	0
<i>Xiphorhynchus guttatus</i>	1	0	0

Fuente: Elaboración propia, 2017.

ANEXO 4

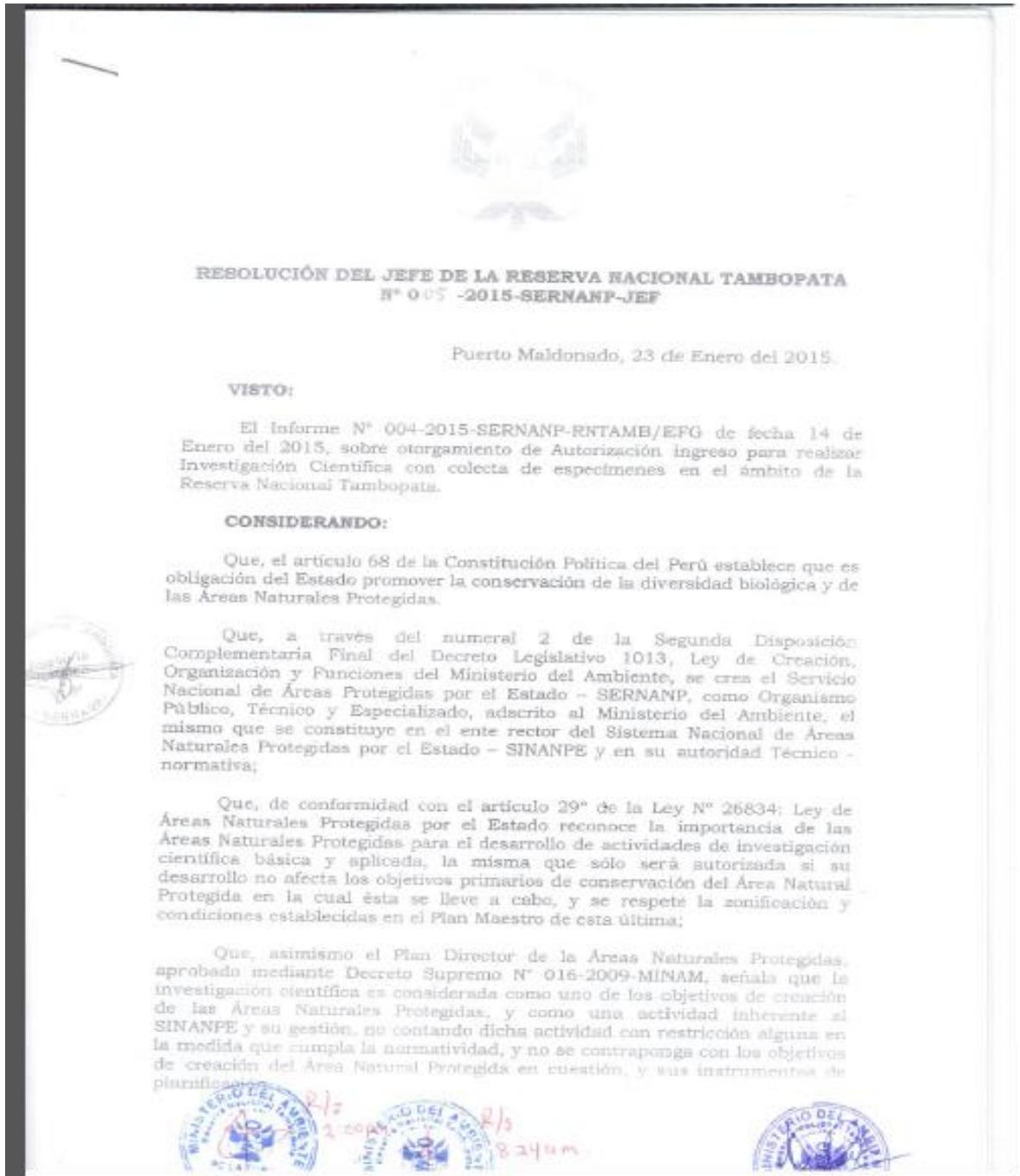


Fig. 2: Resolución de autorización para realizar investigación científica con colecta dentro de Áreas Naturales Protegidas.

Fuente: Resolución del Jefe de la Reserva Nacional Tambopata N° 005 – 2015 – SERNANP – JEF.

ANEXO 5

Cuadro 3: Pares de bases para la purificación y amplificación por PCR del gen citocromo b (82).

	Nested PCR, 479 bp	Parásito
HAEMNFI	5-CATATATTAAGAGAAITATGGAG-3	Haemosporidios
HAEMNR3	5-ATAGAAAGATAAGAAATACCATT-3	Haemosporidios
HAEMR2	5- GCATTATCTGGATGTGATAATGGT-3	<i>Plasmodium</i> <i>Haemoproteus</i>
HAEMF	5-TGGTGCTTTCGATATATGCATG-3	<i>Plasmodium</i> <i>Haemoproteus</i>
HAEMFL	5- ATGGTGTTTTAGATACTTACATT-3	<i>Leucocytozoon</i>
HAEMR2L	5-CATTATCTGGATGAGATAATGGIG C- 3	<i>Leucocytozoon</i>

Fuente: Laboratorio del Departamento de Zoología de la Universidad de Extremadura de España.

ANEXO 6

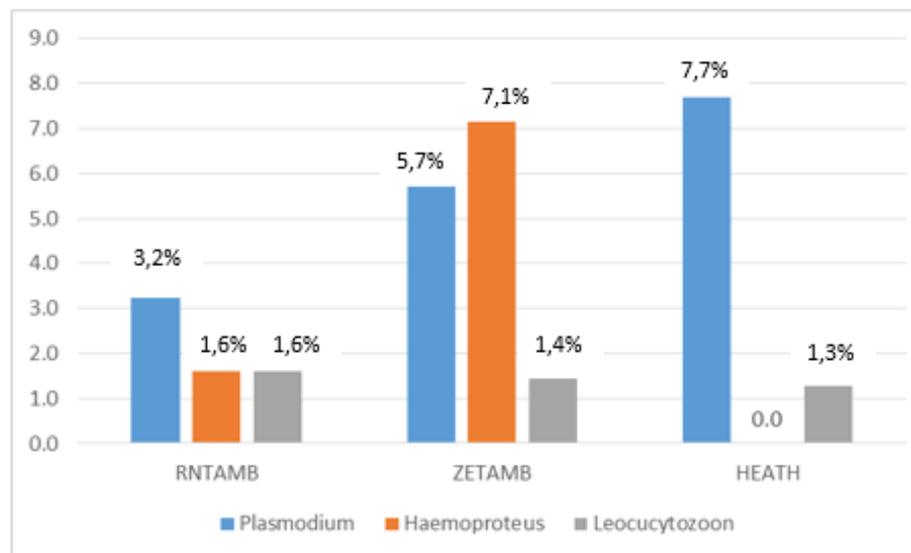
Cuadro 4: Distribución de los géneros de Haemosporidios en la familias de aves (n=210).

Familias	Total		Géneros de Haemosporidios					
	Positivos		<i>Plasmodium</i>		<i>Haemoproteus</i>		<i>Leuccitozoon</i>	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
Alcedinidae	0	0	0	0	0	0	0	0
Trochilidae	1	0,5	0	0	0	0	1	0,5
Bucconidae	1	0,5	0	0	1	0,5	0	0
Columbidae	3	1,4	0	0	3	1,4	0	0
Dendrocolaptidae	0	0	0	0	0	0	0	0
Galbulidae	0	0	0	0	0	0	0	0
Momotidae	1	0,5	0	0	0	0	1	0,5
Passerellidae	0	0	0	0	0	0	0	0
Pipridae	0	0	0	0	0	0	0	0
Thamnophilidae	3	1,4	3	1,4	0	0	0	0
Thraupidae	8	3,8	7	3,3	0	0	1	0,5
Turdidae	1	0,5	1	0,5	0	0	0	0
Tyrannidae	3	1,4	1	0,5	2	1	0	0
Total	21	10%	12	5,7	6	2,9	3	1,5

Fuente: Elaboración propia, 2017.

ANEXO 7

Gráfico 1: Prevalencias de Haemosporidios (*Plasmodium*, *Haemoproteus* y *Leucocytozoon*) para cada tipo de bosque.



* RNTAMB = Reserva Nacional Tambopata

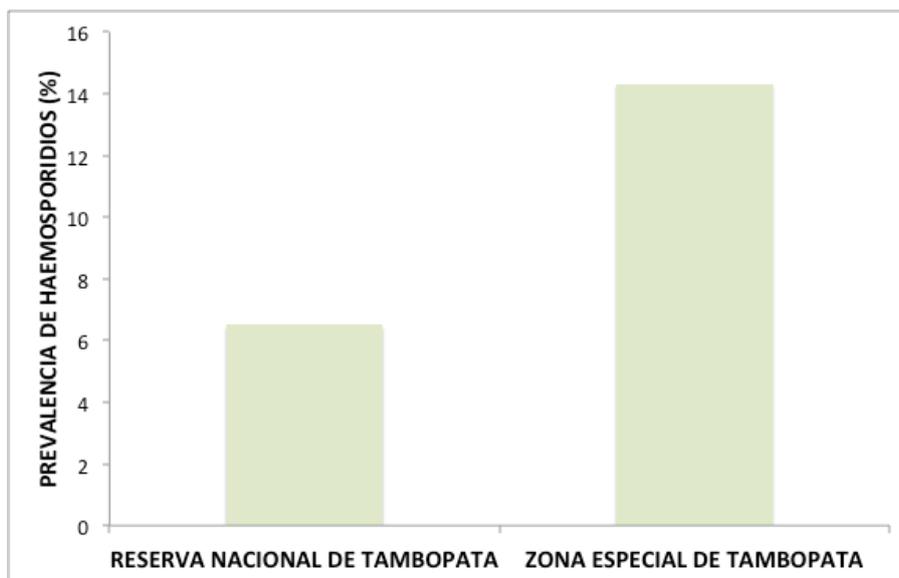
** ZETAMB = Zona especial Tambopata

*** HEATH = Bahuaja Sonene Heath

Fuente: Elaboración propia, 2017.

ANEXO 8

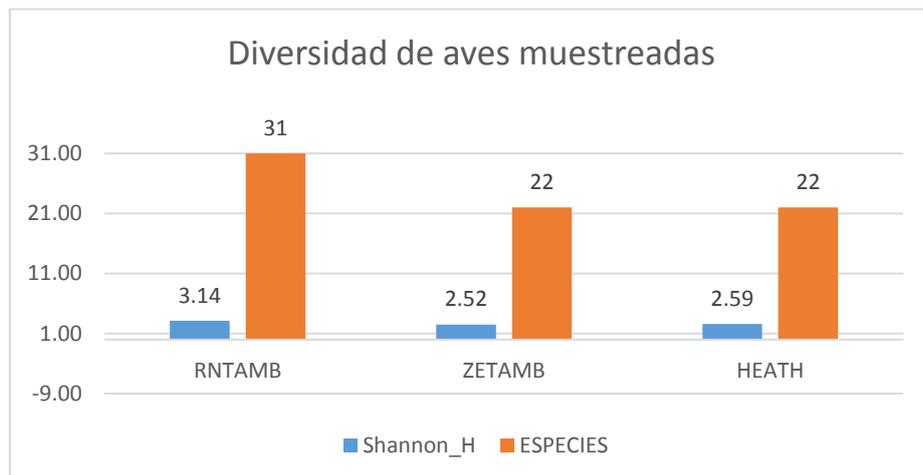
Grafico 2: Comparación de infección por haemosporidios en aves de los dos tipos de bosque de Tambopata (n= 132 individuos).



Fuente: Elaboración propia, 2017.

ANEXO 9

Grafico 3 Indices de diversidad Shannon de toda la población muestreada.

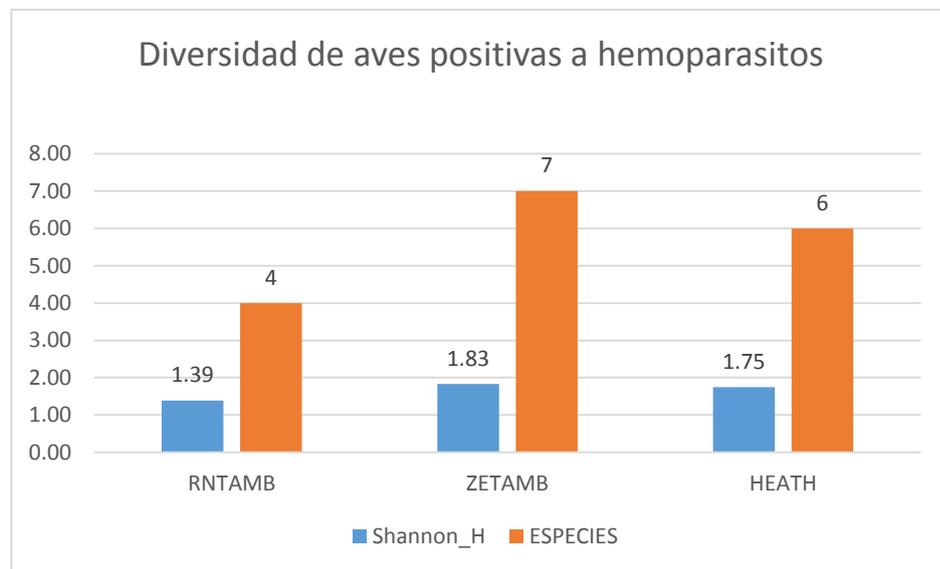


* RNTAMB = Reserva Nacional Tambopata

** ZETAMB = Zona especial Tambopata

*** HEATH = Bahujaja Sonene Heath

Fuente: Elaboración propia, 2017.

ANEXO 10**Grafico 4** Indices de diversidad Shannon de los individuos infectados.

* RNTAMB = Reserva Nacional Tambopata

** ZETAMB = Zona especial Tambopata

*** HEATH = Bahujaja Sonene Heath

Fuente: Elaboración propia, 2017.

Anexo 11

Cuadro 5: Estimaciones de distancias evolutivas entre las secuencias del citocromo b de los linajes genéticos hallados en el estudio. Se muestra el número de sustituciones de bases nucleotídicas por sitio entre secuencias. Los análisis fueron realizados mediante el método de máxima probabilidad (Neighbor – Joining).

H-COLBUC_01	H-COLBUC_01	H-PACPOL_01	P-PADOM_11	P-MONNIG_01	P-RAMCAR_06	P-TURHAUX_01	P-TARUF01	P-EMBHER_01	P-SCHISME_02	P-SCHISME_01	P-CYCYA01	P-DENMER02	P-FORCOL06	H-MONIGRI_01	L-HAWF7	L-PARUS16
H-PACPOL_01	0.105	◆														
P-PADOM_11	0.110	0.096	◆													
P-MONNIG_01	0.110	0.085	0.033	◆												
P-RAMCAR_06	0.110	0.096	0.057	0.041	◆											
P-TURHAUX_01	0.122	0.096	0.071	0.068	0.044	◆										
P-TARUF01	0.104	0.093	0.054	0.031	0.025	0.065	◆									
P-EMBHER_01	0.128	0.102	0.071	0.060	0.068	0.063	0.071	◆								
P-SCHISME_02	0.107	0.090	0.052	0.028	0.023	0.063	0.003	0.068	◆							
P-SCHISME_01	0.110	0.093	0.054	0.031	0.025	0.065	0.005	0.071	0.003	◆						
P-CYCYA01	0.137	0.108	0.057	0.047	0.039	0.071	0.039	0.065	0.036	0.039	◆					
P-DENMER02	0.116	0.085	0.049	0.041	0.044	0.071	0.033	0.085	0.031	0.033	0.044	◆				
P-FORCOL06	0.137	0.099	0.082	0.068	0.060	0.065	0.063	0.025	0.060	0.063	0.079	0.082	◆			
H-MONIGRI_01	0.119	0.063	0.125	0.110	0.122	0.125	0.128	0.122	0.125	0.128	0.122	0.128	0.134	◆		
L-HAWF7	0.197	0.190	0.161	0.186	0.196	0.196	0.193	0.199	0.196	0.193	0.193	0.174	0.216	0.203	◆	
L-PARUS16	0.190	0.180	0.158	0.174	0.186	0.177	0.180	0.193	0.177	0.180	0.190	0.171	0.203	0.190	0.055	◆

Fuente: Elaboración propia con el Software MEGA7, 2017.

ANEXO 12

Cuadro 6: Número de hospederos y distribución geográfica de los linajes

GÉNERO	LINAJE	N° HOSPEDERO S ESTUDIO	N° HOSPEDEROS (MALAVI- GenBank)	LOCALIDAD (MalAvi GenBank)	REFERENCIA BIBLIOGRAFI CA	TIPOS DE BOSQUE
<i>Haemoproteus</i>	COLBUC 01	1 (<i>Columbina talpacotti</i>)	3 (<i>Columbina buckleyi</i> , <i>Columbina talpacotti</i> , <i>Coccyzus melacoryphus</i>)	2 (Ecuador, Brasil) Sudamerica	(7, 25, 29)	ZETAMB
<i>Haemoproteus</i>	MONIGRI 01	1 (<i>Monasa nigrifrons</i>)	0			RNTAMB
<i>Haemoproteus</i>	PACPOL01	2 (<i>Contopus virens</i> , <i>Pachyrampus polychopterus</i>)	1 (<i>Pachyrampus polychopterus</i>)	Perú Sudamerica	Marzal sin publicar	ZETAMB
<i>Plasmodium</i>	CYCYA 01	1 (<i>Willisornis poecilinotus</i>)	14 (<i>Cyanocompsa cyanoides</i> , <i>Icterus cayanensis</i> , <i>Lepidothrix coronata</i> , <i>Hypocnemis striata</i> , <i>Thamnomanes caesius</i> , <i>Thamnomanes saturninus</i> , <i>Myrmornis torquata</i> , <i>Myrmoborus myotherinus</i> , <i>Sclerurus caudacutus</i> , <i>Microbates collaris</i> , <i>Dixiphia pipra</i> , <i>Geotrygon montana</i> , <i>Hylexetastes perrotii</i> , <i>Pithys albifrons</i>)	2 (Guyana, Brasil) Sudamerica	(7)	HEATH
<i>Plasmodium</i>	DENMER 02	1 (<i>Myrmeciza goeldii</i>)	1 (<i>Dendrocincla merula</i>)	Brasil Sudamerica	(7)	RNTAMB
<i>Plasmodium</i>	EMBHER 01	1 (<i>Emberizoides herbicola</i>)	0			HEATH
<i>Plasmodium</i>	FORCOL 06	1 (<i>Formicarius colma</i>)	1 (<i>Formicarius colma</i>)	Brasil Sudamerica	(7)	RNTAMB
<i>Plasmodium</i>	MONNIG 01	1 (<i>Myarchus tuberculifer</i>)	3 (<i>Monasa nigrifrons</i> , <i>Thamnomanes saturninus</i> , <i>Ramphastos tucanus</i>)	Brasil Sudamerica	(7)	ZETAMB
<i>Plasmodium</i>	PADOM 11	1 (<i>Ramphocelus carbo</i>)	30 (<i>Melospiza melodia</i> , <i>Carpodacus mexicanus</i> , <i>Saltator grossus</i> , <i>Saltator maximus</i> , <i>Cyanocompsa cyanoides</i> , <i>Cacicus cela</i> , <i>Chrysomus ruficapillus</i> , <i>Polioptila dumicola</i> , <i>Aegolius acadicus</i> , <i>Strix varia</i>)	6 (USA, Guyana, Uruguay, Brasil, Perú, Canada) Sudamerica y Norteamerica	(7, 21, 29, 35, 36; Marzal sin publicar)	ZETAMB

				<i>Spheniscus demersus</i> , <i>Turdus fumigatus</i> , <i>Mniotilta varia</i> , <i>Vireo griseus</i> , <i>Passer domesticus</i> , <i>Basileuterus flaveolus</i> , <i>Coryphospingus pileatus</i> , <i>Dacnis cayana</i> , <i>Polioptila plumbea</i> , <i>Saltator similis</i> , <i>Sittasomus griseicapillus</i> , <i>Trichothraupis melanops</i> , <i>Dolichonyx oryzivorus</i> , <i>Volatinia jacarina</i> , <i>Melospiza melodia</i> , <i>Thlypopsis sordida</i> , <i>Tachyphonus phoenicius</i> , <i>Neothraupis fasciata</i> , <i>Tachyphonus rufus</i> , <i>Coereba flaveola</i>)			
<i>Plasmodium</i>	RAMCAR06	1	0				ZETAMB
		(<i>Ramphocelus carbo</i>)					
<i>Plasmodium</i>	SCHISME 01	1	0				HEATH
		(<i>Schistochlamys melanopsis</i>)					
<i>Plasmodium</i>	SCHISME 02	2	0				HEATH
		(<i>Schistochlamys melanopsis</i> , <i>Coryphaspiza melanotis</i>)					
<i>Plasmodium</i>	TARUF 01	1	4	(<i>Tangara cayana</i>)	(<i>Basileuterus flaveolus</i> , <i>Saltator similis</i> , <i>Tachyphonus rufus</i> , <i>Tangara cayana</i>)	Brasil Sudamerica	(29) HEATH
<i>Plasmodium</i>	TURHAUX 01	1	0	(<i>Turdus hauxwelli</i>)			ZETAMB
<i>Leucocytozoon</i>	PARUS16	1	2	(<i>Phaethornis ruber</i>)	(<i>Parus major</i> , <i>Cyanistes caeruleus</i>)	8 (Alemania, UK, Portugal, Armenia, Azerbaijan, Marruecos, Russia) Europa y Africa	(37, 38, 88) ZETAMB
<i>Leucocytozoon</i>	HAWF 7	2	1	(<i>Baryphthengus martii</i> , <i>Thraupis palmarum</i>)	(<i>Coccothraustes coccothraustes</i>)	Marruecos Africa	(38) RNTAMB HEATH

Fuente: Elaboración propia con la base de datos de MALAVI database. Version 2.3.1, May 2017.