



**UNIVERSIDAD CENTRAL
DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

Evaluación molecular de la infección y la diversidad de los parásitos maláricos en aves venezolanas en material de archivo de la colección del Dr. Arnoldo Gabaldón del año 1981 y en muestras obtenidas durante el 2013 en el estado Zulia

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller **Estefanía Alejandra Montilla García** como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

Tutora: Dra. Adriana Silva-Iturriza (IVIC)

Asesora Académica: Dra. Vincenza Cervino (IBE)

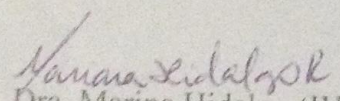
Caracas, Venezuela

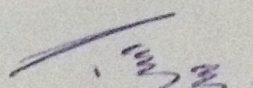
OCTUBRE-2016

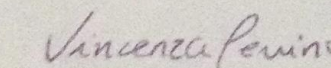
**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLENME DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
DEL BR. ESTEFANÍA ALEJANDRA MONTILLA GARCÍA**

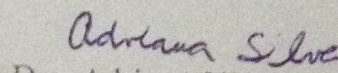
Quienes subscribimos miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado del Br. Estefanía Alejandra Montilla García, C.I 19.500.990, titulado **“Evaluación molecular de la infección y la diversidad de los parásitos maláricos en aves venezolanas en material de archivo de la colección del Dr. Arnoldo Gabaldón del año 1981 y en muestras obtenidas durante el 2013 en el estado Zulia”**, para optar por el título de Licenciado en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los 17 días del mes de Octubre del año 2016, dejando constar que la Profesora Vincenza Cervino actuó como coordinador del jurado examinador.


Dra. Marina Hidalgo (IVIC)
Jurado


Dra. Palmira Guevara (IBE)
Jurado


Dra. Vincenza Cervino (IBE)
Asesor Académico


Dra. Adriana Silva-Iturriza (IVIC)
Tutor

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a la Virgen del Valle. Gracias por cuidarme y guiarme siempre.

Al Laboratorio de Fisiología de Parásitos del IVIC. Gracias por abrirme sus puertas y permitir llevar este proyecto adelante, en especial al Dr. Alfredo Mijares.

Al Instituto de Altos Estudios Dr. Gabaldón, en especial al M.V M.Sc. José Romero.

A mi Tutora, Adriana Silva-Iturriza, gracias por tu amistad y este hermoso proyecto que me confiaste, lo hicimos.

A mi Asesora Académica, Prof. Vincenza Cervino por su aporte y paciencia.

A mis Profesores, gracias por su formación y gratos momentos en el aula, siempre serán parte del profesional que quiero ser.

A mi Mamá. Gracias por la paciencia, aprendizajes, entenderme y apoyarme en este camino que nos tocó recorrer juntas.

A mi Hermano. Gracias por verme con ojos de amor y ternura.

A Julián Fernández. Gracias por la paciencia y siempre tener Fe en mí como persona.

A mi Abuela. Gracias por todo tu amor y apoyo.

A mis tías y primos, hicieron este camino más ameno de transitar.

A Jorge López. Gracias por levantarme el ánimo y ser siempre incondicional, lo logramos.

A María González. Gracias por cada momento juntas, eres una parte bonita de este proyecto.

A todos mis amigos de carrera, en especial a Anuschka Da Silva, Katiuska Huapaya y José Sánchez.

Gracias a todos, por todo.

RESUMEN

Los diversos patógenos transmitidos por vectores son responsables de un gran número de enfermedades que afectan negativamente la salud animal y humana. Los parásitos maláricos son transmitidos principalmente por mosquitos, causando una de las enfermedades más devastadoras que afecta a los humanos; mientras que las infecciones en anfibios, reptiles y aves son menos perjudiciales. Los géneros más comunes y estudiados en aves son *Haemoproteus*, *Plasmodium* y *Leucozytozoon*. En este trabajo se buscó evaluar la prevalencia y diversidad de dichos parásitos maláricos en 268 muestras de sangre completa de aves recolectadas en el año 2013 en el Estado Zulia y de vieja data de la Colección del Dr. Arnoldo Gabaldón del año 1981. Se trabajó con tres pares de cebadores parasito-específicos, dos mitocondriales y uno nuclear. La detección y amplificación fue exitosa para la amplificación de la región mitocondrial del citocromo b; los amplicones permitieron evidenciar una gran diversidad haplotípica. La prevalencia total encontrada de las muestras del Zulia fue baja (12%). Se compararon las secuencias obtenidas en este estudio con secuencias de parásitos maláricos reportados en Sur América y morfo-especies reportadas en todo el mundo a través de la construcción de matrices de distancia, a su vez, se construyó un árbol filogenético para cada matriz y un árbol donde se contemplan las morfo-especies de los linajes de *Haemoproteus*, *Parahaemoproteus* y *Plasmodium* con los de este estudio, corroborando los resultados arrojados por el análisis BLAST. Asimismo, se evidencia como el Subgénero *Parahaemoproteus* sigue siendo nuevo para estudios moleculares.

Palabras clave: Diversidad, citocromo b, *Haemoproteus*, *Plasmodium*, *Parahaemoproteus*.

Índice general

	Páginas
Índice de tablas	VII
Índice de figuras	VIII
Índice de anexos.....	IV
Lista de abreviaturas	X
CAPÍTULO	
I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	1
Introducción	1
1.1 Ciclo de vida y morfología de los Haemosporidia	2
1.2 Patogenicidad	7
1.3 Métodos de diagnóstico de los Haemosporidia	8
1.4 Linajes genéticos de malaria aviar en Venezuela y el mundo	9
Antecedentes	11
II. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo general	16
2.2 Objetivos específicos	16
III. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1 Material biológico.....	17
3.2 Extracción de ADN a partir de papel de filtro	19
3.3 Normalización de la extracción de ADN a partir de extendidos sanguíneos del material de archivo de la Colección del Dr. Arnoldo Gabaldón	19
3.4 Determinación de la parasitemia de los extendidos sanguíneos del material de archivo de la Colección del Dr. Arnoldo Gabaldón	23
3.5 Cuantificación del ADN en las extracciones.....	23
3.6 Análisis de ADN y amplicones de PCR mediante electroforesis en geles de agarosa	24
3.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa	24
3.8 Purificación de producto de PCR	29
3.9 Secuenciación	30
3.10 Búsqueda y selección de secuencias para análisis filogenético y matriz de distancia	30
3.11 Análisis de secuencias provenientes de productos de PCR obtenidos.....	31

3.12 Matriz de distancia	31
3.13 Diversidad haplotípica y nucleotídica	32
3.14 Análisis filogenético	33
IV. RESULTADOS	34
4.1 Material genético obtenido del papel de filtro	34
4.2 Normalización de la extracción de ADN partiendo de extendidos sanguíneos.....	35
4.3 Parasitemia de los extendidos sanguíneos del material de archivo.....	39
4.4 Amplificación de los extendidos sanguíneos del material de archivo	39
4.5 Matriz de distancia de infecciones en Sur América	40
4.5.1 Matriz de distancia entre linajes de <i>Haemoproteus</i> (reportados) vs. <i>Haemoproteus</i> y <i>Parahaemoproteus</i> de este estudio	38
4.5.2 Matriz de distancia entre linajes de <i>Plasmodium</i> (reportados) vs. <i>Plasmodium</i> obtenidos en este estudio.....	43
4.6 Diversidad haplotípica y nucleotídica	45
4.7 Árbol filogenético de la infección por Haemosporidios en Sur América y las de este estudio	45
4.8 Matriz de distancia junto a morfo-especies reportadas	49
4.8.1 Matriz de distancia de morfo-especies de <i>Haemoproteus</i> y <i>Parahaemoproteus</i> (reportados) vs. <i>Haemoproteus</i> y <i>Parahaemoproteus</i> de este estudio	49
4.8.2 Matriz de distancia de morfo-especies de <i>Plasmodium</i> (reportados) vs. <i>Plasmodium</i> de este estudio	51
4.9 Comparación de diversidad observada por distancia genética (distancia- <i>p</i>) y diversidad nucleotídica	53
4.10 Árbol filogenético de las morfo-especies y los linajes obtenidos en este estudio.....	54
IV. DISCUSIÓN	56
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	65
BIBLIOGRAFÍA.....	67
ANEXO 1	71
ANEXO 2	72
ANEXO 3	80
ANEXO 4	83
ANEXO 5	85

Índice de tablas

Páginas

Tabla

1 Muestras de aves colectadas en papel de filtro y extendidos sanguíneos	18
2 Cebadores parásito-específicos de la amplificación de linajes de malaria aviar en muestras de sangre completa preservadas en papel de filtro (2013)	36
3 Cuantificación por espectrofotometría de la normalización de la extracción de ADN de los extendidos sanguíneos.....	38
4 Parasitemia de los extendidos sanguíneos	37
5 Cebadores parásito específico de la amplificación de los linajes de malaria aviar en muestras de sangre completa de la colección del Dr. Arnoldo Gabaldón (1981).....	39
6 Diversidad haplotípica y nucleotídica	45
7 Distancia- <i>p</i> máxima vs. Diversidad nucleotídica	53

Índice de figuras

Figura	Páginas
1 Ciclo de vida y morfología de los Haemosporidia	4
2 Vectores de <i>Haemoproteus</i> spp., <i>Leucocytozoon</i> spp. y <i>Plasmodium</i> spp. de aves	7
3 Anclaje del cebador del citocromo b de vertebrados	25
4 Anclaje de cebadores parásito-específico de malaria aviar	29
5 Amplicones de Cytb de vertebrados (aviares) de muestras de sangre completa preservadas en papel de filtro	34
6 Integridad del ADN de la normalización de extracción partiendo de papel de extendidos sanguíneos.....	37
7 Evaluación de integridad de los cebadores de cytb de vertebrado	40
8 Matriz de distancia entre <i>Haemoproteus</i> de Sur América (reportados) vs. <i>Haemoproteus</i> y <i>Parahaemoproteus</i> obtenidos en este estudio	42
9 Matriz de distancia entre <i>Plasmodium</i> de Sur América (reportados) vs. <i>Plasmodium</i> obtenidos en este estudio	44
10 Árbol filogenético de ML junto al Bootstrap de NJ para <i>Haemoproteus</i> y <i>Parahaemoproteus</i> junto con linajes de <i>Haemoproteus</i> reportados en Sur América	47
11 Árbol filogenético de ML junto al Bootstrap de NJ para <i>Plasmodium</i> junto con linajes de <i>Plasmodium</i> reportados en Sur América	48
12 Matriz de distancia entre morfo-especies de <i>Haemoproteus</i> y <i>Parahaemoproteus</i> (reportadas) vs. <i>Haemoproteus</i> y <i>Parahaemoproteus</i> de este estudio	50
13 Matriz de distancia entre morfo-especies de <i>Plasmodium</i> (reportadas) vs. <i>Plasmodium</i> de este estudio.....	52
14 Árbol filogenético de ML junto al Bootstrap de NJ de morfo-especies y linajes de este estudio	55

Índice de anexos

	Páginas
Anexo	
1 Glosario	71
2 Tabla de concentraciones de extracción de ADN de muestras provenientes del Estado Zulia colectadas en papel de filtro	72
3 Tabla de localidad de las infecciones por Haemosporidios en Sur América	80
4 Tabla de localidad de las morfo-especies reportadas.....	83
5 Tabla resumen de cebadores utilizados.....	85

Lista de abreviaturas

pb: Pares de base

ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal

ADN: Ácido desoxirribonucleico

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

Cytb: Citocromo b

COXI: Citocromo Oxidasa I

CS: Circumsporozoito

TE: Tris-EDTA

TAE: Tris-Acetato y EDTA

V: Voltios

dNTPs: Desoxinucleotodos Trifosfato

PBS: Tampón fosfato salino

NJ: Vecino más cercano

ML: Máxima verosimilitud

GTR+I: Tiempo General Reversible + Evolutivamente Invariable (General Time Reversible + Evolutionarily invariable)

GTR+I+G: Tiempo General Reversible + Evolutivamente Invariable + Distribución Gamma (General Time Reversible + Evolutionarily invariable + Gamma distribution)

F:Cl:A: Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

Los diversos patógenos transmitidos por vectores son responsables de un gran número de enfermedades que afectan negativamente la salud animal y humana (Ewald, 1983). Muchos de estos patógenos pueden infectar a varios hospedadores y su prevalencia varía entre las especies huéspedes susceptibles (Poulin, 2007).

Aunque los factores que contribuyen a la variación en la susceptibilidad del huésped son múltiples, se sabe que juega un papel muy importante en la transmisión de algunos patógenos las tasas de encuentro de huésped-vector (Combes, 1997). Los rasgos del hospedador y comportamientos de vida también son importantes para la transmisión vectorial (Dobson, 2004).

Los parásitos maláricos son transmitidos por vectores, causando una de las enfermedades más devastadores que afecta a los humanos; mientras que las infecciones en anfibios, reptiles y aves son menos perjudiciales (Olsen, 1974). Las especies de los géneros *Haemoproteus*, *Plasmodium* y *Leucozytozoon* (Filo: Apicomplexa, Clase: Sporozoa, Subclase: Haemosporidea, Orden: Eucoccidiia) comprenden un grupo diverso de parásitos que infectan los glóbulos rojos (en el caso de *Leucozytozoon* spp. también los glóbulos blancos –Leucocitos-) y otros órganos dentro de su huésped vertebrado (Valkiūnas, 2005).

Los parásitos maláricos en aves, han servido como modelos importantes para el estudio de las interacciones parásito-hospedador (Bennett, 1960; Garvin 1997), estudios

ecológicos y evolutivos, historias de vida, evolución de la virulencia, selección sexual, estructura de comunidades, genética y epidemiología de la malaria humana (Martinsen y col. 2008).

1.1 Ciclo de vida y morfología de los haemosporidia

Los parásitos haemosporidia se desarrollan en dos huéspedes, los vertebrados (en nuestro caso, aviar) y los insectos vectores (Dípteros hematófagos, Insecta: Díptera). El desarrollo sexual toma lugar en el vector, y por lo tanto las aves son huéspedes intermediarios y los vectores son los definitivos (Valkiūnas, 2005).

Cuando ocurre la alimentación por parte del vector infectado, se inoculan los esporozoitos en el ave (dando lugar a etapas agámicas o asexuales), estos, penetran las células de los tejidos fijos del hospedador aviar (hígado, bazo o músculo esquelético), en esta etapa los esporozoitos se transforman trofozoítos y posteriormente en merontes o esquizontes exoeritrocíticos y se reproducen asexualmente. Como resultado de la división múltiple o agámica de los esquizontes, se forman los merozoitos mononucleares dentro de los eritrocitos. Por lo general, hay varias generaciones de esquizontes donde el parásito se logra ajustar gradualmente al hospedador, esto resulta en un crecimiento exponencial de la fuente infecciosa inicial (Valkiūnas, 2005).

Los merozoitos pueden reinfectar (induciendo un nuevo ciclo agámico) los eritrocitos o convertirse en gametocitos e inducir el desarrollo sexual en los mismos. Los gametocitos que producen macrogametos, se le conoce como macrogametocitos, mientras que los microgametocitos producen microgametos (Valkiūnas, 2005).

Los macrogametocitos suelen distinguirse fácilmente de los microgametocitos, esto debido a sus caracteres dimórficos sexuales, entre estos últimos, una intensa tinción por el uso de colorantes, del citoplasma y un núcleo compacto con contorno claro en macrogametocitos. Además, el núcleo de los macrogametocitos posee un nucléolo, el cual no está presente en el microgametocito. Sin embargo, el núcleo no se ve fácilmente en todos los grupos de los haemosporidia bajo el microscopio de luz (Valkiūnas, 2005).

Por otra parte, Haemoproteidae y Plasmodiidae poseen gránulos de pigmento (haemozoina), que tiene tendencia a reunirse en los extremos de los microgametocitos mostrándose alargado y esto no es generalmente característico de los macrogametocitos (Valkiūnas, 2005).

En el vector al momento de alimentarse de aves infectadas, los gametocitos inician la gametogénesis en el intestino medio de los vectores, lo que resulta en un proceso sexual (oogámico). Uno de los estímulos para el inicio de la gametogénesis es el cambio en la concentración de oxígeno y dióxido de carbono cuando se transfiere la sangre desde el huésped al vector (Valkiūnas, 2005).

Los microgametocitos sufren una exflagelación expulsando 8 gametos masculinos, que se trasladan en la búsqueda de los macrogametos, es decir, los macrogametocitos que también han abandonado la célula del huésped y han experimentado los cambios nucleares apropiados previos a la fecundación (Gabaldón, 1998).

La fertilización ocurre extracelularmente y el cigoto se transforma en un oocineto móvil y alargado, este último, penetra a través de la capa epitelial del intestino medio. El

oocineto rodeado bajo la lámina basal se desarrolla en ooquiste (donde están contenidos los nuevos esporozoitos) y este, se encuentra encapsulado en una pared construida a partir del material del huésped (Valkiūnas, 2005).

Después de la maduración de los ooquistes, los esporozoitos liberados se mueven en el hemocele y luego penetran en las glándulas salivares del vector. Estos esporozoitos son infecciosos para las aves y su transmisión se produce cuando estos son inyectados por el vector en el huésped durante la secreción de la glándula salival durante su picadura (Valkiūnas, 2005).

Cada etapa del desarrollo, con exclusión de la fase de cigoto, es haploide. Solo el cigoto tiene un conjunto diploide ($2n$) de cromosomas, la meiosis se produce en la etapa inicial de desarrollo del oocineto (Figura 1) (Valkiūnas, 2005).

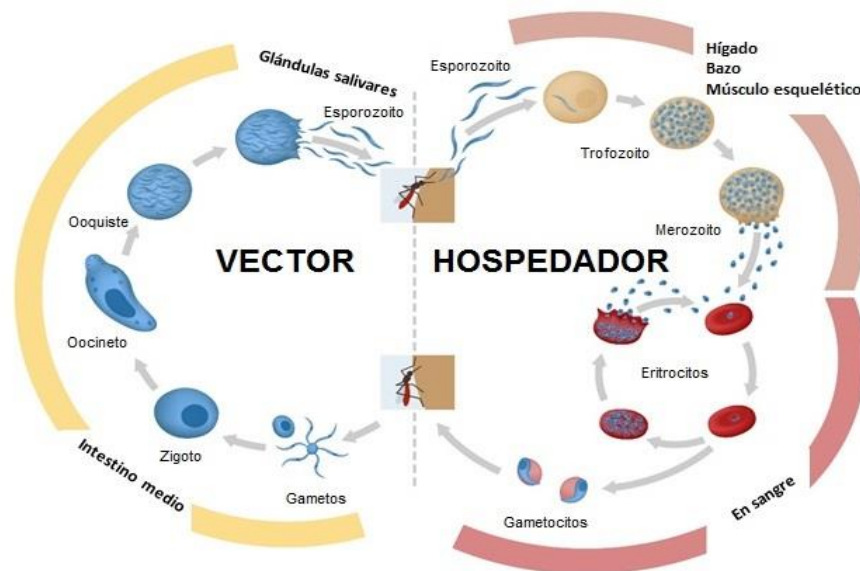


Figura 1. Ciclo de vida y morfología de los Haemosporidia (Tomado con modificaciones del sitio <http://www.yourgenome.org/facts/what-is-malaria> [Consultada el 26 de agosto de 2015]).

Junto con las características similares de los ciclos de vida de las familias Haemoproteidae, Plasmodiidae y Leucocytozoidae existen diferencias significativas que requieren consideraciones a parte que se discuten a continuación.

Los vectores del género *Haemoproteus* spp. son los mosquitos (Diptera: Ceratopogonidae) y las “moscas piojo” (Hippoboscidae) (Figura 2). La merogamia o esquizogonia ocurre en las células endoteliales, macrófagos fijos y en algunas especies de aves también puede ocurrir en los miofibroblastos, solo los gametocitos se desarrollan dentro de los eritrocitos (Valkiūnas, 2005).

La esquizogonia agámica puede llevarse a cabo en pulmones, hígado, riñones, corazón, músculo esquelético y en otros órganos (Wenyon, 1988). Luego del desarrollo en los diferentes órganos del ave, el vector pica al huésped y los eritrocitos estallan dentro del intestino medio del vector y ocurra la generación de nuevos esporozoitos por parte del ooquiste (Gabaldón, 1998).

El vector capaz de transmitir el *Plasmodium* spp. –en aves– es el mosquito (Diptera: Culicidae) (Figura 2). La merogamia ocurre en las células del mesodermo, los merozoitos se desarrollan en los reticulocitos y los gametocitos maduros en los eritrocitos; en el hospedador vertebrado, el desarrollo se divide en merozoitos exoeritrocíticos, endoeritrocíticos y formación de los gametocitos (Valkiūnas, 2005).

Los merozoitos exoeritrocitos se dividen en preeritrocitos y posteritrocitos, los preeritrocitos consisten en dos generaciones de merozoitos, a la primera se le denomina

criptozoitos y a la segunda metacriptozoitos (Garnham, 1966). Los posteritrocitos incluyen una serie de generaciones de merozoitos, catalogados fanerozoitos (Valkiūnas, 2005).

Los esporozoitos inyectados por el vector dan lugar a la primera generación de los criptozoitos, los merozoitos desarrollados en criptozoitos inducen la segunda generación de los merozoitos exoeritrocíticos, conocidos como metacriptozoitos y estos si pueden infectar los eritrocitos (Valkiūnas, 2005).

Una gran parte de los metacriptozoitos inducen una nueva generación de metacriptozoitos y fanerozoitos, mientras que otra parte invade los eritrocitos, dando lugar a la fase agámica y gametocítica donde ambos pueden aparecer simultáneamente en la sangre. El parásito penetra un reticulocito o eritrocito y puede formar los gametocitos para la fase sexual del parásito en el vector (Garnham, 1966).

Para las especies de *Leucocytozoon* spp., el vector es conocido como “mosca negra” (Diptera: Simuliidae) (Figura 2) y solo una de las especies de este parásito utiliza mosquitos de la Familia Ceratopogonidae como vector. Los esporozoitos inyectados por el vector solo pueden desarrollarse en las células parenquimáticas del hígado, así como los gametocitos solo pueden desarrollarse en eritoblastos, eritrocitos y leucocitos mononucleados. Los esporozoitos dan lugar a los merozoitos hepáticos en la primera generación (Valkiūnas, 2005).

Luego que los merozoitos entran en la sangre, penetran reticulocitos y eritrocitos para dar lugar a los gametocitos, los gametocitos jóvenes generan deformación en las células del huésped y de sus núcleos (Valkiūnas, 2005).

Por último, los gametocitos pasan a su fase de reproducción sexual al igual que la especies *Haemoproteus* spp. y *Plasmodium* spp.. A pesar de esas diferencias, su ciclo de vida responde a un mismo patrón y debido a estas características los parásitos maláricos de las aves y monos han sido muy útiles para comprender varios procesos de la infección en el hombre (Gabaldón, 1998).

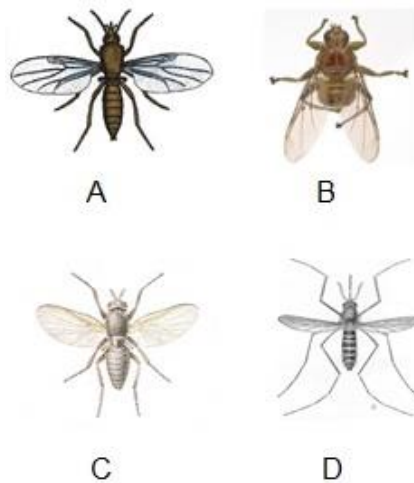


Figura 2. Vectores de *Haemoproteus* spp. (A: Familia Ceratopogonidae y B: Familia Hippoboscidae), *Leucocytozoon* spp. (C: Familia Simuliidae) y *Plasmodium* spp. de aves (D: Familia Culicidae).

(Tomados del sitio [http://www.pioneerherbalproducts.co.uk/Culicoides-Midges\(354294\).htm](http://www.pioneerherbalproducts.co.uk/Culicoides-Midges(354294).htm), http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Hippoboscidae&guide=Groups_Insecta&flags=glean:&mobile=iPhone, http://www.metafysica.nl/nature/nomos_16.html y https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ochlerotatus_taeniorhynchus_syn._Aedes_taeniorhynchus_aka_the_Black_Salt_Marsh_Mosquito.jpg respectivamente [Consultada el 28 de agosto de 2015])

1.2 Patogenicidad

Las infecciones con ciertos parásitos en la sangre, como las infecciones con Haemosporidios, pueden causar anemia, puesto que los eritrocitos se encuentran comprometidos en el ciclo de vida del parásito, por lo tanto se reduce severamente la

eficiencia del metabolismo y podría causar restricciones considerables en el flujo de la sangre y oxígeno al cerebro y al bazo (Moller y col. 2007; Marzal y col. 2008).

Con algunas excepciones, las infecciones por estos Haemosporidios rara vez se asocian con una mortalidad significativa de las aves silvestres infectadas, aunque se ha reportado con frecuencia casos de mortalidad en aves domésticas (Atkinson y col., 1991). La mayoría de los estudios sobre las aves silvestres no han logrado documentar tales efectos (Schrader y col. 2003; Bensch y col. 2007), a excepción del impacto devastador sobre las aves nativas de Bosque-Hawái, donde hubo alta mortalidad por malaria aviar (Atkinson y col., 2005).

Los huéspedes aviares han demostrado durante la infección anemia, reducción de masa corporal, fluctuaciones en los niveles de hormonas (algunas con actividad inmunosupresora) durante periodos de reproducción, lo cual los puede hacer más vulnerable al ave a los patógenos, lo que podría favorecer a infecciones múltiples, reducción de efecto de nidificación, cambios del plumaje, así como la reducción de la supervivencia (Moller y col. 2007; Marzal y col. 2008; Astudillo y col. 2013).

1.4 Métodos de diagnóstico de los Haemosporidia

Tradicionalmente, la morfología, clasificación, infección y especificidad de los Haemosporidios se ha descrito bajo la observación de los gametocitos mediante la microscopia de luz, ésta, podía ser posible por medio de tinciones de extendidos sanguíneos. Este método tiene algunos beneficios como los bajos costos y puede proporcionar estimaciones de la parasitemia, sin embargo, podría presentar

inconvenientes, en particular por el personal, el cual debe de estar capacitado para obtener datos fiables (Bensch y col., 2000).

Además de esto, las tinciones sanguíneas solo permiten dar una indicación de la morfología de los parásitos (análogo al estudio realizado en los vectores) y se ha demostrado que éstos varían dependiendo de las especies del hospedador aviar y su edad. La adopción de métodos moleculares utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para identificar infecciones ha dado lugar a una visión fascinante de los parásitos, su diversidad genética y su especificidad (Hellgren y col., 2004; Martinsen y col., 2008).

Estos estudios moleculares han identificado alrededor de 1.300 Haemosporidios aviares de linajes únicos por medio de amplificaciones de diferentes regiones conservadas de su genoma (Fallon y col., 2003), lo cual influenció la creación de una base de datos coordinada (MalAvi: <http://mbio-serv2.mbioekol.lu.se/Malavi>) para registrar las distribuciones de los linajes y facilitar la investigación de su filogenia (Clark y col., 2014).

1.5 Linajes genéticos de malaria aviar en Venezuela y el mundo

Numerosos estudios se han realizado sobre parásitos Haemosporidios aviares en Regiones Neotropicales (White y col. 1978; Sousa y col. 1982; Woodworth-Lynas y col. 1989; Bennett y col. 1991; Young y col. 1993; Valkiūnas y col. 2003; Valkiūnas y col. 2004). Sin embargo, poco se sabía de estos parásitos en Venezuela sino hasta 1937, cuando el Dr. Arnoldo Gabaldón y sus colaboradores de la época se dispusieron a combatir el paludismo en el territorio nacional y por ende precisaron en disponer del material adecuado para sus

estudios, utilizando así hospedadores aviares como modelo para dichos estudios (Garnham, 1977; Gabaldón, 1998). Luego de constituir uno de los mayores esfuerzos que se hayan hecho en pro al estudio de los parásitos aviares en Venezuela, hubo un vacío en el país hasta el año 2008 cuando surgió nuevamente el estudio de estos parásitos en hospedadores aviares a nivel de su prevalencia e intensidad (Castillo, 2008; Belo y col. 2012; Mijares y col. 2012).

La avifauna Venezolana comprende aproximadamente 1.383 especies residentes y migratorias reportadas, repartidas en 21 órdenes y 82 familias (Gwynne y col. 2003). Este número representa el 36% de toda la avifauna señalada por Stotz y colaboradores (1996) para la región Neotropical. La riqueza de aves en Venezuela se debe a la diversidad de hábitat o ecosistemas que representa, provincias geográficas bien delimitadas con características propias, como la cuenca de lago de Maracaibo, los Andes, la cordillera de la Costa, los Llanos, Guayana y el estado Amazonas. Debido a su ubicación geográfica, Venezuela ocupa el segundo lugar, después de Colombia, en cantidad de especies migratorias que llegan a Sur América (Freile y col. 2005).

ANTECEDENTES

Durante la erradicación del paludismo en Venezuela, liderada por el Dr. Gabaldón en 1937, se comenzó paralelamente la ardua búsqueda para lograr caracterizar morfológicamente de Género *Plasmodium* en el país, donde en primera instancia se necesitaba determinar el huésped vertebrado ideal como organismo modelo. Se comenzó con estudios en monos, sin éxito alguno y tras la huella de otros investigadores del país que habían hallado infecciones en aves, se decidió trabajar con aves endémicas. Para esta caracterización y una vez identificado el huésped vertebrado, se creó, con ayuda de colaboradores una colección de extensiones sanguíneas de aves tanto silvestres como en cautiverio, las cuales fueron infectadas de manera experimental con parásitos haemosporidios. Esta colección cuenta con 221 registros originales y 22.989 réplicas en modelos experimentales, estas extensiones fueron colectadas desde la década de los 70 hasta los 90 (Boletín de Malariología y Salud Ambiental, 2014).

Al hacer las observaciones por microscopia de luz, observaron que las especies de los géneros *Haemoproteus*, *Plasmodium* y *Leucocytozoon* están estrechamente relacionadas morfológicamente pero que estas diferían en los rasgos de su ciclo de vida. Para entender los procesos evolutivos que han generado esta diversidad de parásitos Haemosporidia se ha necesitado más que el método de observación tradicional. Estudios moleculares de Escalante y Ayala (1994) han revelado a niveles inesperados la diversidad de estos parásitos, particularmente en aves (Bensch y col., 2000; Ricklefs y col., 2002; Bensch y col., 2004; Ricklefs y col., 2004).

Recientemente, se han desarrollado varios métodos de detección e identificación de los parásitos Haemosporidia, entre ellos, el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la cual presenta una mayor sensibilidad en comparación a los diagnósticos tradicionales (Bensch y col., 2000).

La primera publicación de los ensayos de PCR como forma de explorar estos parásitos en aves, fue por Feldman y col. (1995) para determinar la prevalencia de *Plasmodium relictum* en aves endémicas de Hawái, conocidas como aves mieleras (Familia: Drepanidae), una familia particularmente vulnerable; diseñaron cebadores dirigidos a la amplificación de la región conservada de las subunidad 18S de ARN ribosómico (ARNr), la técnica permitió la amplificación en conjunto del huésped y en consecuencia al obtener un resultado positivo se observaba una banda de 380 pares de base (pb) del ave y una de 580 pb del parásito.

El uso de estos cebadores en estudios de aves africanas demostraron no funcionar eficazmente en vista de la observación de múltiples bandas, lo que demostró posiblemente que las secuencias de la subunidad 18S ARNr de la región conservada de los parásitos maláricos que infectan a las aves africanas diverge significativamente de las especies de *Plasmodium* que infectan a las aves hawaianas (Richard y col., 2002). Estos cebadores fueron modificados por Li y col. (1995) permitiendo el paso a otro diseño de cebadores que amplificaban una región más pequeña que los primeros, siendo los primeros en realizar una PCR anidada para la detección de estos parásitos, logrando obtener una banda única, así como aumento de especificidad.

Richard y col. (2002) basado en un estudio comparativo de los distintos cebadores diseñados para la detección de la malaria en aves, determinó que el conjunto de cebadores diseñados por Li y col. aunque eran capaces de detectar *Plasmodium*, no demostraban reproducibilidad consistente con muestras que habían obtenido positivas para infección con los mismos cebadores y a su vez con infecciones conocidas por microscopia de luz como positivas para *Haemoproteus* y *Plasmodium*.

En el genoma mitocondrial de estos parásitos, se encuentra el gen del citocromo b, el cual presenta una región conservada que les permitió a Bensch y col. (2000) construir los sitios de anclaje de cebadores para la detección e identificación de *Haemoproteus* y *Plasmodium*. Basándose en esto Waldenstrom y col. (2004) diseñaron una nueva PCR anidada, la cual mejoraba considerablemente el resultado por el aumento de sensibilidad del método, así como logró proporcionar secuencias que permitieron la identificación de parásitos en género y especies/linajes.

Sin embargo, para el mismo año, Hellgren y col. rediseñaron el protocolo inicial de Waldenstrom y col. para lograr una mayor sensibilidad, así presentando una PCR anidada que permite la clasificación y detección del género *Leucocytozoon* en paralelo con especies de *Plasmodium* y *Haemoproteus*. El protocolo implica una primera etapa de PCR, la cual amplifica los 3 géneros y luego con el uso de dos pares de cebadores se amplifican por separado a *Haemoproteus/Plasmodium* y *Leucocytozoon*. Este método ofreció una herramienta importante para los estudios simultáneos de los géneros así como la posibilidad de la identificación basada en la secuencia de diferentes linajes mitocondriales dentro de los parásitos.

El análisis filogenético de secuencias del genoma por medio de estas amplificaciones, permiten una visión de la historia evolutiva de los patógenos, sobre todo los acontecimientos que pueden conducir a la coevolución y diversificación, así como interacciones en su ciclo de vida, estos estudios sistemáticos moleculares basados en genes individuales desafiaron a Martinsen y col. (2008) a plantearse la filogenia de tres genomas de parásitos de la malaria para determinar relaciones entre el género *Plasmodium* y géneros cercanos.

Su estudio se basó en la comparación de tres hipótesis filogenéticas, dos aceptadas durante décadas y una propuesta en su trabajo tras el estudio de la amplificación de cuatro genes: dos mitocondriales (citocromo b y citocromo oxidasa I), uno nuclear (Adenilosuccinato liasa) y uno del genoma del apicoplasto (Caseinolítica proteasa); los parásitos maláricos y otros miembros del Filo Apicomplexa, albergan un plástido relictivo homólogo a los cloroplastos en las plantas y algas, este es esencial para su supervivencia y por ende puede catalogarse como un importante recurso para el estudio de estos linajes.

La hipótesis planteada tras estas amplificaciones propone que *Plasmodium* de mamíferos no es parafilético con respecto al género *Haemoproteus* en aves pero en cambio, separa a los taxones *Haemoproteus*, de aves, y los divide ahora en dos clados hermanos para *Plasmodium* en mamíferos y además *Haemoproteus* es dividido ahora en dos grupos *Haemoproteus* y *Parahaemoproteus*, son separados en dos subgéneros basados en que presentan nichos diferentes (el cual va desde la familia del ave hasta su vector asociado), de las tres hipótesis planteadas esta representa un fuerte apoyo nodal carente en las otras dos.

Posteriormente Pacheco y col. (2013) estudiaron la historia evolutiva de los parásitos de la malaria, específicamente del género *Plasmodium* spp. en monos, esto, por medio de cebadores capaces de anclar en regiones que podrían presentar selección Darwiniana (Hughes, 1990), estos genes están implicados en la codificación de una proteína de superficie de membrana que solo se expresa en la superficie del estadio infectivo para el hospedador, el esporozoito, de los géneros de *Plasmodium* spp., la proteína del circumsporozoito (CS), la cual, se sabe genera respuestas del huésped por parte del sistema inmune. Recientes datos de la secuenciación de esta región, han revelado polimorfismo considerable, lo cual, puede ser el resultado de una selección positiva.

Esta selección le permitió observar diversidad entre las especies de *Plasmodium*, incluyendo a las estrechamente relacionadas, sin embargo, en otras especies se encontró una fuerte conservación de esta codificación. Estos cebadores no han sido empleados en parásitos maláricos en aves venezolanas pero podrían ser indicativos de evolución dentro de las distintas especies infectivas de *Plasmodium*, *Haemoproteus* y *Leucocytozoon*.

CAPITULO II

2.1 Objetivo general

Evaluar mediante pruebas moleculares la infección y la diversidad de los parásitos maláricos en aves venezolanas en material de archivo de la colección del Dr. Arnoldo Gabaldón del año 1981 y en muestras preservadas en papel de filtro obtenidas durante 2013 en el estado Zulia.

2.2 Objetivos específicos

1. Estandarizar la metodología para el aislamiento de ADN a partir de muestras de sangre de aves, recolectadas en papel de filtro y en extendidos sanguíneos de vieja data.
2. Evaluar la calidad del ADN extraído mediante la visualización en geles de agarosa y a través de la amplificación control de una región conservada del gen que codifica para citocromo b en aves.
3. Evaluar la prevalencia de los parásitos maláricos en aves venezolanas de la colección del Dr. Arnoldo Gabaldón del año 1981 y muestreadas durante el año 2013 mediante ensayos de amplificación parásito-específicos de dos genes mitocondriales, citocromo b (Cytb) y citocromo oxidasa I (COXI) y para el gen nuclear que codifica para la proteína de superficie circumsporozoito (CS).
4. Secuenciar los productos de PCR obtenidos para Cytb, COXI y CS para evaluar la diversidad de los parásitos maláricos y su relación filogenética.

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material biológico

Las muestras de 2013 fueron recolectadas en el estado Zulia en el Parque Recreacional Planetario "Simón Bolívar"- Municipio Mara, coordenadas 10°46'11"N 71°40'3"O, por el equipo de M.V M.Sc. José Romero del Instituto de Altos Estudios Dr. Gabaldón (IAE), suministrando así, 251 muestras preservadas en papel de filtro. Asimismo las muestras de los extendidos sanguíneos de la Colección de Parásitos maláricos y otros Haemosporidios en Aves "Dr. Arnoldo Gabaldón" del año 1981 fueron entregadas por el mismo Instituto, dando un total de 17 muestras de archivo preservadas en porta objetos - se trabajó solo con réplicas de infecciones experimentales-, en total se partió de 268 muestras para este estudio (Tabla 1).

Tabla 1. Muestras de sangre de aves colectadas en papel de filtro (2013) y extendidos sanguíneos de la Colección del Dr. Arnoldo Gabaldón (1981).

Procedencia	Nombre Científico	Nº	Condición
Dr. Gabaldón	<i>Columba livia</i>	17	Residente
Zulia	<i>Scardafella squammata</i>	24	Residente
	<i>Quiscalus lugubris</i>	11	Residente
	<i>Thraupis episcopus</i>	75	Residente
	<i>Fluvicola pica</i>	12	Residente
	<i>Columbina passerina</i>	1	Residente
	<i>Dendroica erithachorides</i>	5	Residente
	<i>Polioptila plumbea</i>	11	Residente
	<i>Tiaris bicolor</i>	9	Residente
	<i>Gampsonyx swainsonii</i>	1	Residente
	<i>Molothrus bonariensis</i>	12	Residente
	<i>Mimus gilvus</i>	7	Residente
	<i>Dendroica aestiva</i>	6	Migratorio (norte)
	<i>Pyrocephalus rubinus</i>	7	Residente
	<i>Hemitriccus margaritaceiventer</i>	2	Residente
	<i>Coereba flaveola</i>	2	Residente
	<i>Molothrus bonariensis</i>	12	Residente
	<i>Leucippus fallax</i>	6	Residente
	<i>Melanerpes rubricapillus</i>	13	Residente
	<i>Troglodytes aedon</i>	2	Residente
	<i>Claravis pretiosa</i>	3	Residente
	<i>Sakesphorus canadensis</i>	2	Residente
	<i>Icterus nigrogularis</i>	8	Residente
	<i>Saltator coerulescens</i>	1	Residente
	<i>Crotophaga ani</i>	3	Residente
	<i>Quiscalus lugubris</i>	4	Residente
	<i>Inezia tenuirostris</i>	3	Residente
	<i>Zenaida auriculata</i>	3	Residente
	<i>Sporophila intermedia</i>	3	Residente
	<i>Coereba flaveola</i>	2	Residente
	<i>Gymnomystax mexicanus</i>	1	Residente
	TOTAL	268	

3.2 Extracción de ADN a partir de papel de filtro

Para la obtención de ADN partiendo del papel de filtro se cortó con una hojilla estéril una porción del papel de filtro con la muestra de sangre. Se colocó el trozo cortado (aproximadamente 5 mm²) en un vial de 1,5 mL y se agregó 100 µL de tampón de lisis (TE: Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 M) e incubó a 55 °C por 15 minutos, transcurrido el tiempo se presionó el papel de filtro contra las paredes del vial, para ello, se utilizó una punta de pipeta limpia y estéril para finalmente incubar el vial a 97 °C por 15 minutos. Se preservó a -20 °C hasta su uso (Bereczky y col. 2005).

3.3 Normalización de extracción de ADN a partir de extendidos sanguíneos del material de archivo de la Colección del Dr. Arnoldo Gabaldón

- Decoloración de los extendidos sanguíneos de material de archivo

Se eliminó el aceite de inmersión con xileno, colocando una pequeña gota del mismo donde se encontraba el aceite y se removi6 el compuesto con un pa6o liso. Se decolor6 el extendido con Glicerol:PBS (9:1) por 30 minutos en un tubo vial de 50 mL donde el extendido estaba totalmente cubierto. Luego se dej6 por 24 horas en lavado con una soluci6n de PBS a pH 7.4 en un vial de 50 mL donde el extendido estuvo totalmente cubierto. Se dej6 en nevera a 4 °C hasta el momento de realizar el protocolo de extracci6n (Pryzwansky y col., 1979). El registro del tipo de muestra es tomado del m6todo sistem6tico original empleado por el Dr. Gabald6n para mantener un registro de las infecciones experimentales, el n6mero de entrada a la colecci6n

24694, localidad E686 (Edo. Falcón, Municipio José Laurencio Silva- Tucacas), hora y fecha de muestreo.

- Extracción con Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico (F:Cl:A)

Los porta objetos se cubrieron con 300 µL tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM a pH 8, EDTA 1 mM a pH 8, SDS 0,1%, NaCl 10 mM) y fueron raspados inmediatamente con una hojilla estéril para desprender el material, con la ayuda de una micropipeta se transvasó la muestra un vial de 1,5 mL, se añadieron 12,5 µL de proteinasa K para una concentración final de 20 mg/mL y se incubó por 3 horas a 55 °C. Luego se centrifugó a 12.000 g por 5 minutos y se trasvasó el sobrenadante a un tubo vial nuevo.

Se añadió un volumen igual de mezcla de F:Cl:A (24:24:1) y se procedió a mezclar mediante agitación, se centrifugó a 12.000 g por 5 minutos, se tomó el sobrenadante con cuidado de no contaminar con la interface. Este paso se repitió una vez más. Luego, se adicionó ½ volumen de acetato de potasio a pH 7 y 2 volúmenes de etanol al 100% frío, se centrifugó a 14.000 g por 10 minutos y se descartó el sobrenadante.

El precipitado se lavó con 1 mL de etanol al 70% frío, se hizo inversión el tubo y se pasó a centrifugar a 12.000 g por 5 minutos, se descartó el etanol y el precipitado se dejó secar completamente. Se resuspendió en 50 µL de agua libre de endonucleasas.

- Extracción de ADN con soluciones tomadas del Manual Sambrook

El método de extracción se basó en colocar el porta objetos en tubos vial de 50 mL y dejar incubando por 10 horas en una solución de tampón de lisis 1 (Tris-HCl 20 mM a pH 7,6) a 4 °C, se raspó el extendido con una hojilla estéril y luego se centrifugó por 40 minutos a 1.321 g.

Se pasaron 900 µL del tampón de lisis con el sedimento a un tubo vial de 1,5 mL y se centrifugó a 16.100 g por 30 segundos a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante dejando un volumen de 20 µL aproximadamente. Se añadió 600 µL de solución de tampón de lisis 2 (Tris-HCl 10 mM a pH 8,1 mM, EDTA pH 8, SDS 0,1% p/v) a 0 °C y se homogenizó por inversión.

Se añadieron 3 µL de proteinasa K para una concentración final de 20 mg/mL e incubó por 3 horas a 55 °C. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadieron 200 µL de acetato de potasio 3 M a pH 5 y se mezcló utilizando vortex por 20 segundos. Se centrifugó por 3 minutos a 16.100 g. Se transfirió el sobrenadante a un vial nuevo con 600 µL de etanol 70% y centrifugó por 1 minuto a 16.100 g. Descartamos el sobrenadante y se resuspendió en 50 µL de agua libre de endonucleasas. Asimismo, se realizó una variante de dicha extracción, la cual consistió en raspar directamente el extendido con la hojilla estéril y una vez colectado el material en un vial de 1,5 mL, se comenzó partiendo de los 900 µL del tampón de lisis y se realizaron los pasos mencionados anteriormente.

- Extracción de ADN con estuche comercial Wizard® Genomic (Promega)

El método de extracción se basó en colocar los porta objetos en tubos vial de 50 mL y dejar incubando por 10 horas en una solución de tampón de lisis de la célula (Tris-HCl a pH 7,4, NP-40 0,5%, NaCl 250 mM y NaF 50 mM) a 4 °C, se raspó el extendido con una hojilla estéril y luego se centrifugó por 40 minutos a 1.321 g.

Al obtener la centrifugación se tomaron 900 µL del precipitado junto al tampón de lisis de la célula en un vial de 1,5 mL y se centrifugó a 16.100 g por 3 minutos. Se descartó el sobrenadante y se agitó por vortex. Se agregó al tubo vial 300 µL de la solución lisis del núcleo (EDTA 24 mM a pH 8.0 y NaCl 75 mM) y se mezcló por inversión. Se añadió la solución para precipitar proteínas (Acetato de amonio 7,5 mM) y se agitó con vortex por 20 segundos. Se centrifugó a 16.100 g por 3 minutos.

Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo vial de 1,5 mL que contenía 300 µL de Isopropanol y se mezcló. Se centrifugó a 16.100 g por 3 minutos, se descartó el sobrenadante, se añadieron 300 µL de etanol al 70% y se centrifugó a 16.100 g por 3 minutos. Descartamos el etanol y una vez evaporado se resuspendió en 50 µL de agua libre de endonucleasas. Asimismo, se realizó una variante de dicha extracción, la cual consistió en raspar directamente el extendido con la hojilla estéril y una vez colectado el material en un vial de 1,5 mL, se comenzó partiendo de los 900 µL del tampón de lisis y se realizaron los pasos mencionados.

3.4 Determinación de la parasitemia de los extendidos sanguíneos del material de archivo de la Colección del Dr. Arnoldo Gabaldón

Para la cuantificación del porcentaje de parasitemia de los extendidos sanguíneos se contabilizó el número de eritrocitos parasitados y de eritrocitos sanos, tomando el criterio de que los casos donde la parasitemia fuese menor o igual a 5%, se contarían aproximadamente 2000 células totales y donde fuese mayor a 5% solo se contarían aproximadamente 300 células totales (Basic Malaria Microscopy, 2010; Gutierrez y Arróspide, 2003). Se utilizó la siguiente ecuación:

$$Parasitemia = \left(\frac{n^{\circ} \text{ de eritrocitos parasitados}}{n^{\circ} \text{ de eritrocitos sanos}} \right) \times 100\%$$

3.5 Cuantificación del ADN en las extracciones

Se determinó por espectrofotometría con el equipo ACTGene Nas99, utilizando un volumen de 1,5 μ L. Se utilizaron como blanco el líquido de resuspensión utilizado para las diferentes extracciones (TE o Agua libre de endonucleasas), se sembró la muestra en el pedestal del equipo y se registraron las absorbancias a 260 nm y 280 nm. Las mediciones se reportaron en ng/ μ L. Se utilizó la ecuación adaptada de Lambert-Beer; el sistema usa una tensión superficial inherente para mantener la muestra durante la medida.

$$ADN \frac{ng}{mL} = Abs_{260} \times \frac{50 \text{ ng}}{\mu L}$$

3.6 Análisis de ADN y amplicones de PCR mediante electroforesis en geles de agarosa

La concentración de agarosa a utilizar en los geles se calculó en función del tamaño del fragmento analizado.

Para el análisis de integridad de ADN, se realizaron geles a una concentración de 0,8%, se disolvió la agarosa en tampón TAE 1X (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM a pH 8) mediante calor, una vez homogénea la solución se le añadió SYBR Safe a 0,5X (Invitrogen). Se cargaron los bolsillos con el tampón 5X Green GoTaq Flexi Buffer (Promega) y se utilizó el marcador de tamaño molecular marca Sigma de 50 pb. Se realizó la corrida electroforética a 100 V con un tiempo de 30 minutos. En el caso del análisis de amplicones de PCR, los geles de agarosa se prepararon a una concentración de 1,5% con una corrida electroforética de 45 minutos.

3.7 Reacción de Cadena de la Polimerasa

Cebador mitocondrial CYTBS y CYTBA (Cytb de Vertebrado)

Se emplearon los cebadores CYTBS y CYTBA de secuencias 5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3' y 5'-GCCCTCAGAATGATATT-3' respectivamente, los cuales amplifican una región conservada del citocromo b de vertebrados de 359 pb (Figura 3). Esta PCR fue empleada como control para las extracciones de ADN, realizada como prueba adicional para garantizar la presencia y calidad del ADN del hospedador vertebrado y permitirnos así obtener el ADN del parásito malárico. Se utilizaron de 10 a 123 ng de ADN en función de la concentración de cada aislamiento de ADN para cada

reacción y el programa se llevó a cabo en un termociclador (Mastercycler personal, Eppendorf). La mezcla de reactivos mantenían las siguientes concentraciones finales: Tampón 1X (Tris-HCl 250 mM a pH 9, NaCl 250 mM), cebadores a 0,5 mM, MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, Taq polimerasa 1 U/μL y agua destilada, lo cual todo tuvo un volumen final de 25 μL. El programa realizado fue de desnaturalización inicial de ADN a 95 °C por 10 minutos, luego 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, hibridación a 52 °C por 30 segundos, extensión a 72 °C por 45 segundos y la última extensión a 72 °C por 5 minutos. Las muestras se mantuvieron a 4 °C hasta el momento de su uso (Steuber y col. 2005).

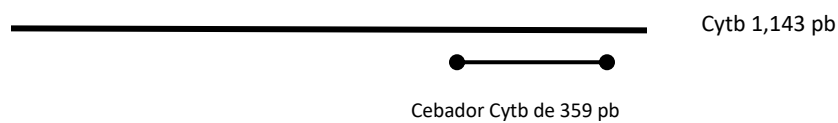


Figura 3. Anclaje del cebador del citocromo b de vertebrados

Cebador mitocondrial HaemNF1¹, NR3¹; HaemF²,R² y HaemFL³,R2L³ (Cytb de haemosporidios)

Se emplearon los cebadores HaemNF1¹ y NR3¹ de secuencias 5'-CATATATAAGAGAAITATGGAG-3' y 5'-ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC-3' como primera combinación para la PCR anidada, los cuales presentan una amplificación inicial de 617 pb de la región conservada del citocromo b, el cual posee un tamaño de 6,003 pb, el primer cebador amplificará para los tres géneros (*Plasmodium*, *Haemoproteus* y *Leucocytozoon*), los cebadores HaemF² y R² de secuencias 5'-ATGGTGCTTTCGATATATGCATG-3' y 5'-GCATTATCTGGATGATAATGGT-3' (Bensch y col., 2000) permiten la amplificación de los

géneros *Haemoproteus* y *Plasmodium*, los cebadores HaemFL³ y R2L³ de secuencias 5'-ATGGTGTTTTAGATACTTACATT-3' y 5'-CATTATCTGGATGAGATAATGGIGC-3' los cuales amplifican linajes de *Leucocytozoon* (Hellgren y col. 2004) (Figura 4).

Para la primera PCR (HaemNF1¹ y NR3¹) se utilizaron de 10 a 123 ng de ADN en función de la concentración de cada aislamiento y para la PCR anidada (HaemF² y R²; HaemFL³ y R2L³) 5 µL de la PCR externa en cada reacción, los programas se llevaron a cabo en un termociclador (Mastercycler personal, Eppendorf). La mezcla de reactivos tuvo las siguientes concentraciones finales para ambas: Tampón 1X (Tris-HCl 250 mM a pH 9, NaCl 250 mM), cebadores a 0,5 mM, MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, Taq polimerasa 1 U/µL y agua destilada, lo cual todo tuvo un volumen final de 25 µL. El programa de la PCR externa fue de desnaturalización inicial de ADN a 94 °C por 3 minutos, luego 20 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, hibridación a 50 °C por 30 segundos, extensión a 72 °C por 45 segundos y la última extensión a 72 °C por 10 minutos.

El programa de la PCR anidada fue idéntico al externo a excepción de 35 ciclos de repetición.

Cebador mitocondrial CytbS, CytbA Cytb2S y Cytb2A (Cytb de haemosporidios)

Se emplearon los cebadores CytbS y CytbA externos y Cytb2S y Cytb2A internos de secuencias 5'-TAATGCCTAGACGTATTCCTGATTATCCAG-3', 5'-TGTTTGCTTGGGAGCTGTAATCATAATGTG-3', 5'-TCAACAATGACTTTATTTGG-3' y 5'-TGCTGTATCATACCCTAAAG-3' respectivamente, los cuales amplifican una región conservada del gen mitocondrial del citocromo b, este producto fue de 607 pb (Figura 4). Para la primera PCR se utilizaron de 10 a 123 ng de ADN en función de la concentración de

cada aislamiento y para la PCR interna se empleó 1 µL de la PCR externa en cada reacción, los programas se llevaron a cabo en un termociclador (Mastercycler personal, Eppendorf). La mezcla de reactivos tuvo las siguientes concentraciones finales para ambas: Tampón 1X (Tris-HCl 250 mM a pH 9, NaCl 250 mM), cebadores a 0,5 mM, MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, Taq polimerasa 1 U/µL y agua destilada, lo cual todo tuvo un volumen final de 25 µL. El programa de la PCR externa fue de desnaturalización inicial de ADN a 94 °C por 4 minutos, luego 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 20 segundos, hibridación a 60 °C por 30 segundos, extensión a 68 °C por 50 segundos y la última extensión a 68 °C por 7 minutos (Martinsen y col. 2008).

El programa de la PCR anidada fue de una desnaturalización inicial de ADN a 94 °C por 1 minutos, luego 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 20 segundos, hibridación a 52 °C por 20 segundos, extensión a 68 °C por 50 segundos y la última extensión a 68 °C por 7 minutos. Las muestras se mantendrán a 4 °C.

Cebador mitocondrial COXIF, COXIR, COXI2F y COXI2R (Citocromo Oxidasa I de Haemosporidios)

Se emplearon los cebadores COXIF y COXIR externos y COXI2F y COXI2R internos de secuencias 5'-CTATTTATGGTTTTCATTTTTATTTGGTA-3', 5'-AGGAATACGTCTAGGCATTACATTAATCC-3', 5'-ATGATATTTACARTTCAYGGWATTATTATG-3' y 5'-GTATTTTCTCGTAATGTTTTACCAAAGAA-3' respectivamente, los cuales amplifican un producto de 998 pb (Figura 4). Para la primera PCR se utilizaron de 10 a 123 ng de ADN en función de la concentración de cada aislamiento y para la PCR interna 1 µL de la PCR externa en cada reacción, los programas se llevaron a cabo en un termociclador

(Mastercycler personal, Eppendorf). La mezcla de reactivos para ambas tuvo las siguientes concentraciones finales: Tampón 1X (Tris-HCl 250 mM a pH 9, NaCl 250 mM), cebadores a 0,5 mM, MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, Taq polimerasa 1 U/μL y agua destilada, lo cual todo tuvo un volumen final de 25 μL. El programa de la PCR externa fue de una desnaturalización inicial de ADN a 94 °C por 4 minutos, luego 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 20 segundos, hibridación a 60 °C por 30 segundos, extensión a 68 °C por 50 segundos y la última extensión a 68 °C por 7 minutos (Martinsen y col. 2007).

El programa de la PCR anidada fue de una desnaturalización inicial de ADN a 94 °C por 1 minutos, luego 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 20 segundos, hibridación a 54,8 °C por 20 segundos, extensión a 68 °C por 50 segundos y la última extensión a 68 °C por 7 minutos. Las muestras se mantendrán a 4 °C.

Cebador nuclear de CSF y CSR (Circumsporozoito de Haemosporidios)

Se emplearon los cebadores CSF y CSR externos 5'-ATGATGAGAATTAGCTATTTTATCTG-3' y 5'-CTAAATAAGGAACAAGAAGGATAATACC-3' respectivamente, los cuales amplifican al gen que codifica para la proteína de membrana circumsporozoito (CS), este producto debe ser de 990 pb (Figura 4). El programa se llevará a cabo en un termociclador (Mastercycler personal, Eppendorf). La mezcla de reacción contuvo de 10 a 123 ng de ADN en función de la concentración de cada aislamiento, tampón 1X (Tris-HCl 250 mM a pH 9, NaCl 250 mM), cebadores a 0,5 mM, MgCl₂ 2,5 mM, dNTPs 0,2 mM, Taq polimerasa 1 U/μL y agua destilada, lo cual todo tuvo un volumen final de 25 μL. El programa tuvo una desnaturalización inicial de ADN a 94 °C

por 4 minutos, luego 36 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 60 segundos, hibridación a 56 °C por 60 segundos, extensión a 72 °C por 120 segundos y la última extensión a 72 °C por 10 minutos (Pacheco y col. 2013).

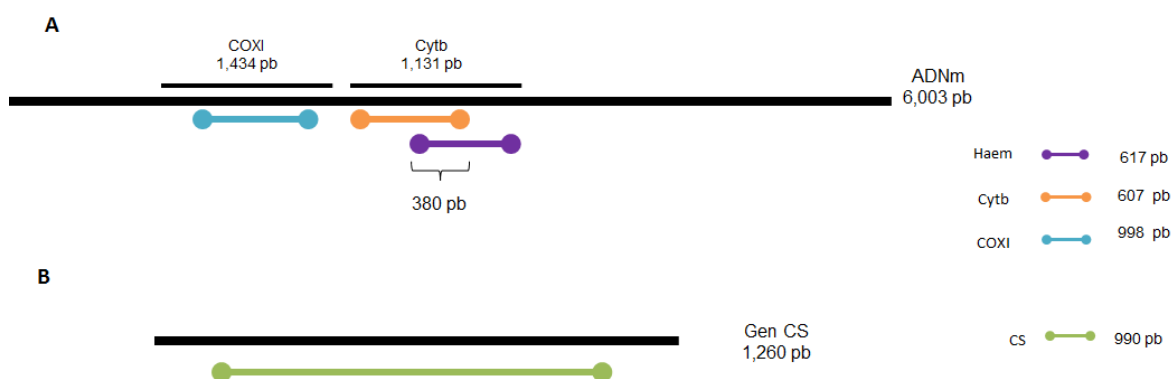


Figura 4. Anclaje de cebadores parásito-específico de malaria aviaria. A: Cebadores mitocondriales, B: Cebador nuclear.

3.8 Purificación de producto de PCR

La purificación de los productos de PCR se realizó con el escuche comercial “Wizard® Gel and PCR Clean-up System”, se agregó un volumen igual al del contenido del tubo de reacción de la solución fijadora de membrana (Tiocianato de guanidino 4,5 M, acetato de potasio 0,5 M a pH 5), se insertó la minicolumna en un vial de 1,5 mL catalogado tubo colector. Se transfirió el contenido del tubo de reacción con la solución a la minicolumna y se incubó por 1 minuto, luego se centrifugó a 16.100 g por 1 minuto, se descartó por completo el contenido del vial y se insertó de nuevo la columna.

Se agregaron 700 µL de la solución de lavado de membrana con etanol añadido (Acetato de potasio 10 mM a pH 5, EDTA 16,7 µM a pH 8, Etanol 80%), se centrifugó a

16.100 g por 1 minuto, se descartó el contenido del vial y se repitió este mismo paso pero solo con 500 µL de dicha solución, se centrifugó nuevamente a 16.100 g por 5 minutos. Al descartar nuevamente el vial se dejó incubando por 5 minutos para la evaporación de cualquier residuo de etanol.

Se transfirió la minicolumna a un tubo vial nuevo de 1,5 mL y se le agregó 50 µL de agua libre de endonucleasas, se incubó por 1 hora a temperatura ambiente, pasada la hora, se centrifugó por 1 minuto a 16.100 g, se descartó la minicolumna y se guardó el contenido a -20 °C hasta el momento de su uso.

3.9 Secuenciación

Una vez purificado el producto, fue secuenciado con la compañía MacroGen, la cual utilizó un secuenciador ABI 7730 (Applied Biosystems), empleando el cebador sentido (S). Para ello se envió 50 ng/µl del producto de PCR purificado y se preparó el volumen necesario (5 µL por reacción) del cebador a una concentración de 5 pmol/µL. Una vez obtenidas las secuencias se determinó el género de los parásitos por comparación con secuencias publicadas en el portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mediante un análisis de identidad o BLAST.

3.10 Búsqueda y selección de secuencias para el análisis filogenético y matriz de distancia

Para la construcción de los árboles filogenéticos, se hizo uso de portal NCBI para obtener como grupo externo la secuencia de *Leucocytozoon* sp. (EU254518.1), se empleó

como grupo externo debido a que se ha demostrado es el ancestro común de todos los haemosporidias.

Las secuencias utilizadas para construir las matrices de distancias se ubicaron en la base de datos del MalAvi y fueron descargadas por medio del portal NCBI. Para las infecciones por Haemosporidios de Sur América, se emplearon 34 secuencias de *Haemoproteus* sp. y 41 secuencias de *Plasmodium* sp., como se presenta en el anexo 3. Asimismo, 42 morfo-especies de *Haemoproteus*, 20 morfo-especies de *Plasmodium* y 1 morfo-especie de *Parahaemoproteus*, todas ellas presentadas en anexo 4.

3.11 Análisis de secuencias provenientes de los productos de PCR obtenidos

Los electroferogramas de cada amplicon fueron revisados por picos de nucleótidos para descartar posibles casos de infección múltiple, posteriormente, se alinearon las secuencias utilizando el programa Bioedit versión 7.0.0 mediante el algoritmo CLUSTALW (Li, 2003).

3.12 Matriz de distancia

La matriz de distancia refleja el resultado de comparar dos secuencias (distancia- p), donde el resultado de la fracción es la diferencia de nucleótidos, en este trabajo los gaps fueron ignorados. Cuanto menos esté relacionada la secuencia o cuanto más diversa es, su distancia será cercana o igual a 1 y cuando su secuencia este más relacionada o cuanto menos diversa es, su distancia será cercana o igual a cero.

El uso del programa MEGA versión 6.06 (Tamura y col. 2013) junto con las secuencias obtenidas por la base de datos de MalAvi, permitió realizar cuatro matrices de distancia, la primera y segunda, de infecciones por Haemosporidios de Sur América para *Haemoproteus* sp. y *Plasmodium* sp., las cuales fueron alineadas con las secuencias obtenidas en el presente trabajo. Es importante destacar que fueron alineadas en función de los resultados obtenidos mediante el análisis BLAST realizado.

La tercera y cuarta matriz se realizó con las morfo-especies de cada género, cada matriz incluyó las muestras obtenidas en este trabajo en función del análisis BLAST realizado.

3.13 Diversidad haplotípica y nucleotídica

Para el cálculo de índices de diversidad haplotípica y nucleotídica se hizo uso del software DnaSP: Secuencia Polimórfica ADN (DNA Sequencing Polymorphism) versión 5.10.1 (Rozas y col. 2010). El programa muestra valores de número de haplotipos (H), diversidad haplotípica (H_d) y diversidad nucleotídica (π) (Nei y Li, 1979; Nei y Tajima, 1981).

La diversidad haplotípica es un valor que muestra el número de haplotipos distintos en una población y el cálculo se realizó como el número de haplotipos entre el N total de la muestra. Sus valores están entre 0 y 1, indicando la máxima diversidad haplotípica para un valor de $H_d=1$ y una nula diversidad entre sus haplotipos un $H_d=0$ (Nei y Li, 1979).

En el caso de la diversidad nucleotídica (π), es una aproximación estadística de la frecuencia de cambios a nivel de mutación y es medida como el promedio del número de

nucleótidos diferentes por sitio entre secuencias de ADN tomadas en pares y de manera azarosa. Sus valores también se representan en un rango de 0 a 1, los cuales indican la misma tendencia que Hd pero con respecto a la variación de sus nucleótidos (Nei y Tajima, 1981).

3.14 Análisis filogenéticos

Para la construcción del árbol filogenético por el método del vecino más cercano (NJ: Neighbor-joining) y de máxima verosimilitud (ML: Maximum likelihood), se utilizó el programa MEGA; previamente se determinó el modelo de evolución más apropiado para los datos de las amplificaciones de este trabajo, utilizando el mismo programa. Adicionalmente, se realizó el análisis filogenético con cada una de las matrices realizadas. Todos los árboles filogenéticos contaron con el soporte estadístico de 1.000 réplicas de *Bootstrap*.

El modelo de evolución más apropiado para las morfo-especies de *Haemoproteus* y *Plasmodium* GTR+I, infecciones por Haemosporidios de Sur América por *Haemoproteus* sp. fue GTR+I, por *Plasmodium* sp. fue GTR+G+I.

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1 Material genético obtenido del papel de filtro

Partiendo de las 251 muestras sanguíneas de aves, preservadas en papel de filtro y utilizando como método de extracción, el protocolo de Bereczky y col. (2005), se obtuvo una elevada concentración (10 a 123 ng) de ADN, anexo 2, así como la calidad del mismo. Con el fin de confirmar la calidad del ADN, se seleccionaron de manera aleatoria 20 muestras de esta extracción y se emplearon los cebadores de CYTB de Vertebrados, obteniendo amplificaciones en la totalidad de las muestras seleccionadas. En la figura 5 se puede observar un gel de agarosa al 1,5% representativo de estas amplificaciones.

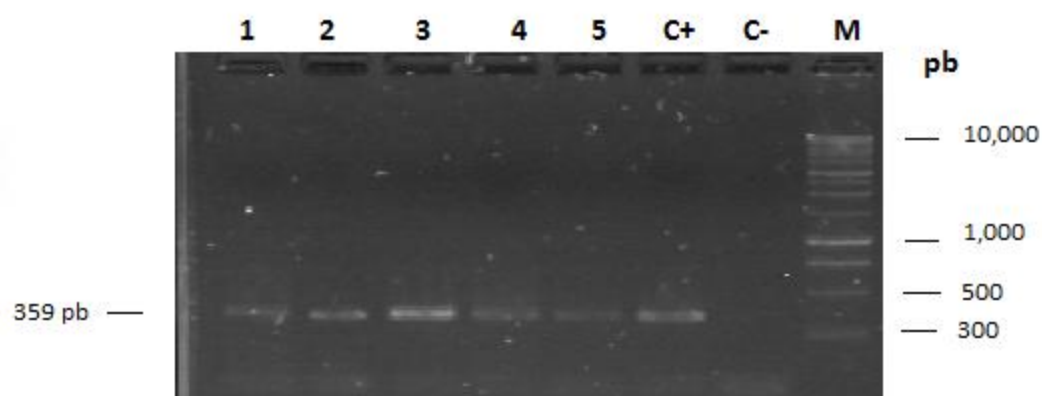


Figura 5. Amplicones de cytb de vertebrados (aviares) de muestras de sangre completa preservada en papel de filtro. Carril 1 al 5: Amplicones de 359 pb; C+: Control positivo (Familia Columbiforme); C-: Blanco (Agua bidestilada-estéril); M; Marcador de tamaño molecular de 1kb).

Como método de diagnóstico de infección por haemosporidios, mediante la PCR, se empleó un cebador nuclear, CS y dos cebadores mitocondriales, CYTB y COXI (Anexo 5), los cebadores mitocondrial CYTB, fueron tomados de distintitos artículos científicos, el primero de Hellgren y col. (2004) representado por 3 pares de cebadores y el segundo de Martinsen y col. (2008), así como el cebador COXI, ambos con 2 pares de cebadores.

Se obtuvo amplificación de los cebadores mitocondriales de la región conservada de Cytb y del COXI, obteniendo 31 amplicones (Tabla 2) con cytb, un amplicon para el gen COXI (Simultáneo con el gen cytb para la misma muestra). Debido al bajo número de amplificaciones para el gen COXI, en comparación con el gen de cytb, se decidió trabajar únicamente con el último. Se realizó un análisis de identidad de los amplicones y las secuencias revelaron 17 linajes de *Plasmodium* sp., 13 linajes de *Haemoproteus* sp. y 1 linaje de *Parahaemoproteus* sp..

Tabla 2. Cebadores parásito-específico de la amplificación de linajes de malaria aviar en muestras de sangre completa preservadas en papel de filtro (2013).

Parásito	Hospedador	Cebador de amplificación
<i>Haemoproteus</i> sp. (A)	Familia Mimidae	Citocromo b (Martinsen y col. 2008)
<i>Plasmodium</i> sp. (B)	Familia Icteridae	Citocromo b (Martinsen y col. 2008)
<i>Haemoproteus</i> sp. (C)	Familia Icteridae	Citocromo b (Martinsen y col. 2008)
<i>Plasmodium</i> sp. (D)	Familia Mimidae	Citocromo b (Martinsen y col. 2008)
<i>Haemoproteus</i> sp. (E)	Familia Icteridae	Citocromo b (Martinsen y col. 2008)
<i>Haemoproteus</i> sp. (F)	Familia Mimidae	Citocromo b (Martinsen y col. 2008)
<i>Plasmodium</i> sp. (G)	Familia Thraupidae	Citocromo b (Martinsen y col. 2008)
<i>Haemoproteus</i> sp. (H)	Familia Mimidae	Citocromo b (Martinsen y col. 2008)
<i>Plasmodium</i> sp. (I)	Familia Icteridae	Citocromo b y Citocromo C oxidasa I (Martinsen y col. 2008)
<i>Plasmodium</i> sp. (J)	Familia Icteridae	Citocromo b (Martinsen y col. 2008)
<i>Haemoproteus</i> sp. (K)	Familia Icteridae	Citocromo b (Martinsen y col. 2008)
<i>Plasmodium</i> sp. (L)	Familia Columbidae	Citocromo b (Martinsen y col. 2008)
<i>Plasmodium</i> sp. (M)	Familia Icteridae	Citocromo b (Martinsen y col. 2008) y Citocromo b (Hellgren y col. 2004)
<i>Plasmodium</i> sp. (N)	Familia Mimidae	Citocromo b (Martinsen y col. 2008) y Citocromo b (Hellgren y col. 2004)
<i>Haemoproteus</i> sp. (Ñ)	Familia Icteridae	Citocromo b (Martinsen y col. 2008) y Citocromo b (Hellgren y col. 2004)
<i>Haemoproteus</i> sp. (O)	Familia Polioptilidae	Citocromo b (Martinsen y col. 2008) y Citocromo b (Hellgren y col. 2004)
<i>Haemoproteus</i> sp. (P)	Familia Columbidae	Citocromo b (Hellgren y col. 2004)
<i>Haemoproteus</i> sp. (Q)	Familia Icteridae	Citocromo b (Hellgren y col. 2004)
<i>Parahaemoproteus</i> sp. (R)	Familia Tyrannidae	Citocromo b (Hellgren y col. 2004)
<i>Haemoproteus</i> sp. (S)	Familia Mimidae	Citocromo b (Hellgren y col. 2004)
<i>Haemoproteus</i> sp. (T)	Familia Troglodytidae	Citocromo b (Hellgren y col. 2004)
<i>Haemoproteus</i> sp. (U)	Familia Emberizidae	Citocromo b (Hellgren y col. 2004)
<i>Plasmodium</i> sp. (V)	Familia Icteridae	Citocromo b (Hellgren y col. 2004)
<i>Plasmodium</i> sp. (W)	Familia Icteridae	Citocromo b (Hellgren y col. 2004)
<i>Plasmodium</i> sp. (X)	Familia Icteridae	Citocromo b (Hellgren y col. 2004)
<i>Plasmodium</i> sp. (Y)	Familia Icteridae	Citocromo b (Hellgren y col. 2004)
<i>Plasmodium</i> sp. (Z)	Familia Icteridae	Citocromo b (Hellgren y col. 2004)
<i>Plasmodium</i> sp. (AA)	Familia Icteridae	Citocromo b (Hellgren y col. 2004)
<i>Plasmodium</i> sp. (BB)	Familia Icteridae	Citocromo b (Hellgren y col. 2004)
<i>Plasmodium</i> sp. (CC)	Familia Icteridae	Citocromo b (Hellgren y col. 2004)
<i>Plasmodium</i> sp. (DD)	Familia Icteridae	Citocromo b (Hellgren y col. 2004)

4.2 Normalización de la extracción de ADN partiendo de extendidos sanguíneos

Al comparar los tres protocolos empleados para la extracción de los extendidos sanguíneos de vieja data, se obtuvo que el mejor protocolo para la obtención del material genético fue el Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico, como se observa en la Figura 3, donde se presenta un gel de agarosa a 0,8%.

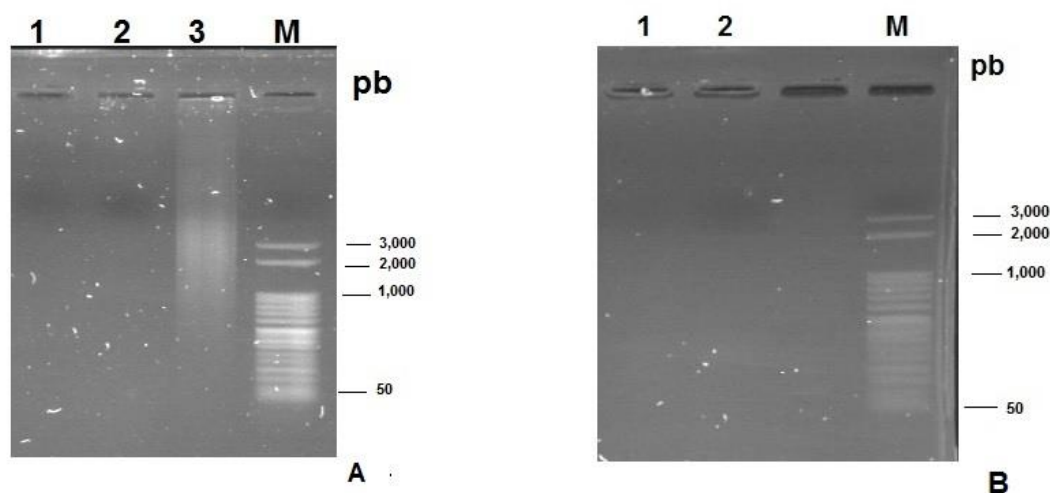


Figura 6. Integridad del ADN en la normalización de extracción partiendo de extendidos. (A) 1: Soluciones del Manual de Sambrook (Sin incubar), 2: Soluciones del Manual de Sambrook (Incubando), 3: F:Cl:A, M: Marcador de tamaño molecular de 50 pb (Promega). (B) 1: Estuche comercial Wizard® (Promega) (Sin incubar), 2: Estuche comercial Wizard® (Promega) (Incubando), M: Marcador de tamaño molecular de 50 pb (Promega).

Posteriormente se cuantificó el material por cada método, obteniendo los resultados observados en la tabla 3.

Tabla 3. Cuantificación por espectrofotometría de la normalización de la extracción de ADN de los extendidos sanguíneos.

Muestra	Tipo de extracción	260 nm	280 nm	260/280	ng/μL
24694 E686 7:53 (27/08/1981)	F:Cl:A	1,26	0,66	1,9	63,3
24694 E686 7:57 (27/08/1981)	Soluciones del manual de Sambrook (Sin incubar)	0,027	0,107	0,25	0,25
24694 E686 8:00 (27/08/1981)	Soluciones del manual de Sambrook (Incubando)	0,012	0,03	0,4	0,6
24694 E686 8:02 (27/08/1981)	Estuche comercial Wizard® (Promega) (Sin incubar)	0,204	0,229	0,89	10,2
24694 E686 8:09 (27/08/1981)	Estuche comercial Wizard® (Promega) (Incubando)	0,38	0,25	1,5	20,4

4.3 Parasitemia de los extendidos sanguíneos del material de archivo

Se cuantificó la parasitemia de 6 extendidos sanguíneos, como se observa en la tabla 4, todos los extendidos de la colección del Dr. Gabaldón presentan parasitemia elevada.

Tabla 4. Parasitemia de los extendidos sanguíneos

Muestra	Eritrocitos parasitados	Eritrocitos sanos	Parasitemia
24694 E685 7:59	85	400	21%
24694 E686 8:21	260	400	65%
24694 E686 8:23	92	400	23%
24694 E686 7:49	98	400	25%
24694 E686 8:17	206	400	52%
24694 E682 7:37	49	400	12%

4.4 Amplificación de los extendidos sanguíneos del material de archivo

De 17 muestras de extendidos sanguíneos, 2 muestras presentaron amplificación con cebadores mitocondriales de la región conservada de Cytb de Hellgren y col. (2004) (Tabla 5). Las los amplicones obtenidos revelaron 100% de identidad para los linajes *Haemoproteus* sp.-*Parahaemoproteus* sp..

Tabla 5. Cebadores parásito-específico de la amplificación de linajes de malaria aviar en muestras de sangre completa de la colección del Dr. Arnoldo Gabaldón (1981).

Parásito	Hospedador	Cebador de amplificación
<i>Haemoproteus</i> sp. (EE) *	Familia Columbidae	Citocromo b (Hellgren y col. 2004)
<i>Haemoproteus</i> sp. (FF) *	Familia Columbidae	Citocromo b (Hellgren y col. 2004)

El * muestra los linajes que mediante el análisis BLAST mostraron 100% de identidad para *Haemoproteus* y *Parahaemoproteus*.

Por otro lado, el ensayo de la amplificación del cebador mitocondrial que amplifica la región conservada del cytb del vertebrado (el ave) no arrojó ningún resultado positivo, se realizó un gel de agarosa al 3% para observar integridad de los cebadores (Figura 7), notando que el cebador antisentido presentaba degradación.

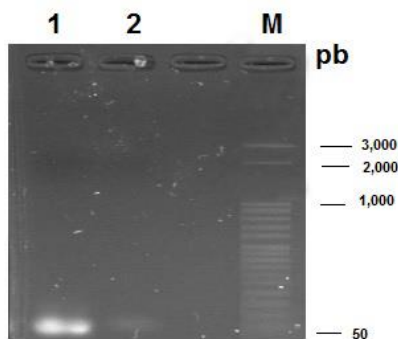


Figura 7. Evaluación de la integridad de los cebadores de cytb de vertebrados. 1: Cebador sentido, 2: Cebador antisentido, M: Marcador de tamaño molecular de 50 pb (Promega).

4.5 Matriz de distancia de infecciones en Sur América

4.5.1 Matriz de distancia entre linajes de *Haemoproteus* (reportados) de Sur América vs. *Haemoproteus* y *Parahaemoproteus* de este estudio

Para Sur América, se han reportado en el portal de MalAvi, 34 secuencias completas de los linajes de *Haemoproteus*, las cuales han sido amplificadas con cebadores mitocondriales, específicamente, citocromo b. Estas secuencias fueron alineadas y comparadas con los amplicones de este trabajo, 15 linajes de *Haemoproteus* sp., donde se incluye 2 linajes que presentan 100% de identidad para *Haemoproteus* sp.-

Parahaemoproteus sp. y el linaje que presenta 100% de identidad de *Parahaemoproteus* sp., trabajando con un total de 352 pb.

Al observar la Figura 8, notamos que dos linajes reportado de Sur América presenta distancia cero entre ellos, *Haemoproteus* sp. posición 27 de Colombia con *Haemoproteus* sp. posición 20 de Venezuela. Asimismo se reflejan 11 pares de linajes reportados para este trabajo que presentan entre ellos, una distancia de cero.

La distancia máxima entre los linajes de la matriz es de 0,159, esta distancia resaltada en rojo perteneciente a *Haemoproteus* sp. posición 42 de Venezuela (reportada en este estudio) con *Haemoproteus* sp. posición 5 de Guyana. La distancia máxima entre los linajes de este estudio es de 0,156, resaltada en color verde y corresponde a la posición 43 (Linaje P) con la posición 37 (Linaje E). Todas las secuencias son provenientes de aves passeriformes, con la única excepción de las dos secuencias de la colección del Dr. Gabaldón y el linaje P, las cuales provienen de aves columbiformes.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	
1	Haemoproreus sp. (KJ361259.1)																																																	
2	Haemoproreus costaei (KM211350.1)																																																	
3	Haemoproreus jennaei (JN827318.1)																																																	
4	Haemoproreus macrocephalus (KJ175076.1)																																																	
5	Haemoproreus sp. (DQ241539.1)																																																	
6	Haemoproreus sp. (DQ241541.1)																																																	
7	Haemoproreus sp. (DQ241542.1)																																																	
8	Haemoproreus sp. (DQ241546.1)																																																	
9	Haemoproreus sp. (DQ241546.1)																																																	
10	Haemoproreus sp. (EF153646.1)																																																	
11	Haemoproreus sp. (EF153647.1)																																																	
12	Haemoproreus sp. (EF153650.1)																																																	
13	Haemoproreus sp. (EF153652.1)																																																	
14	Haemoproreus sp. (EF153653.1)																																																	
15	Haemoproreus sp. (EF153654.1)																																																	
16	Haemoproreus sp. (F462651.2)																																																	
17	Haemoproreus sp. (F462655.2)																																																	
18	Haemoproreus sp. (F462656.2)																																																	
19	Haemoproreus sp. (GJ96227.1)																																																	
20	Haemoproreus sp. (JQ764618.1)																																																	
21	Haemoproreus sp. (JQ764620.1)																																																	
22	Haemoproreus sp. (JQ764621.1)																																																	
23	Haemoproreus sp. (JQ764622.1)																																																	
24	Haemoproreus sp. (KF482344.1)																																																	
25	Haemoproreus sp. (KF482346.1)																																																	
26	Haemoproreus sp. (KF482350.1)																																																	
27	Haemoproreus sp. (KF482360.1)																																																	
28	Haemoproreus sp. (KF482360.1)																																																	

Figura 8. Matriz de distancia entre *Haemoproreus* de Sur América (reportados) vs. *Haemoproreus* y *Parahaemoproreus* de este estudio.

El * muestra los linajes que mediante el análisis BLAST mostraron 100% de identidad para *Haemoproreus* y *Parahaemoproreus*.

4.5.2 Matriz de distancia entre especies de *Plasmodium* de Sur América (reportados) y *Plasmodium* de este estudio

Se han reportado en el portal de MalAvi, 41 secuencias completas de los linajes de *Plasmodium*, las cuales han sido amplificadas con cebadores mitocondriales, específicamente, citocromo b. Estas secuencias fueron alineadas y comparadas con los 17 linajes de *Plasmodium* sp. obtenidos, trabajando con un total de 352 pb.

Al observar la figura 9, notamos que un solo linaje de Sur América presenta entre ellos distancia cero, *Plasmodium* sp. posición 38 del Perú con *Plasmodium* sp. posición 33 del cual no se especifica el país de origen solo que pertenece a Sur América. Asimismo se reflejan 11 pares de linajes reportados para este trabajo que presentan entre ellos, una distancia de cero.

La distancia máxima entre los linajes de la matriz es de 0,135, esta distancia resaltada en rojo perteneciente a *Plasmodium* sp. posición 25 de Ecuador con *Plasmodium* sp. posición 17 de Brasil. La distancia máxima entre los linajes de este estudio es de 0,093, resaltada en color verde y corresponde a la posición 47 (Linaje L) y posición 50 (Linaje V), ambos con la posición 46 (Linaje J). Todas las secuencias son provenientes de aves passeriformes, con la única excepción de la posición 47, secuencia de este estudio, la cual pertenece a un ave columbiforme.

4.6 Diversidad haplotípica y nucleotídica

De los 13 linajes obtenidos de *Haemoproteus* sp. y los 17 linajes de *Plasmodium* sp. resultó:

Tabla 6. Diversidad haplotípica y nucleotídica

Linaje	H	Hd	π
<i>Haemoproteus</i> (sin incluir las dos secuencias de Gabaldón)	10	0,911	0,03
<i>Haemoproteus</i> (con las secuencias de Gabaldón)*	11	0,919	0,03
<i>Plasmodium</i>	12	0,931	0,07

H: Número de haplotipo, Hd: Diversidad haplotípica y π : Diversidad nucleotídica, *Linajes de la colección del Dr. Gabaldón presentaban 100% de identidad para *Haemoproteus* sp.-*Parahaemoproteus* sp.

Como se presenta en la tabla 6, tenemos valores de diversidad haplotípica muy cercanos a 1, presentando así, para los linajes obtenidos una máxima diversidad, esto también lo podemos observar en las matrices de distancia (Figura 8 y 9). Al comparar entre los linajes de *Haemoproteus* y *Plasmodium*, los linajes de *Plasmodium* son más diversos que los de *Haemoproteus*.

4.7 Árbol filogenético de las infecciones por haemosporidios en Sur América y las de este estudio

La figura 10 y 11 se muestra la construcción del árbol filogenético de máxima verosimilitud (ML) y sobre este, se colocó el soporte obtenido con la construcción del

vecino más cercano (NJ), el cual se lee ML/NJ. Se puede destacar a *Leucocytozoon* como grupo externo y como los linajes de este estudio se agrupan con las infecciones Sur Americanas reportadas en MalAvi.

En la figura 10, se destaca que los amplicones obtenidos de las secuencias del Dr. Gabaldón están en clados diferentes agrupados con amplicones obtenidos en este estudio, de los cuales ambos presentan un buen soporte estadístico. Se observa cómo los linajes del estudio se agrupan junto con los reportados en MalAvi en distintos clados; el linaje de *Parahaemoproteus* se agrupa junto a una secuencia reportada como *Haemoproteus*, esta secuencia publicada por Martínez y col. (2006), pertenece a una publicación de la cual se trabajaron infecciones múltiples por Haemosporidios, esto podría reflejar posiblemente que este linaje presenta una clasificación errónea.

La figura 11 se muestra a 15 de los 17 linajes obtenidos para *Plasmodium*, en un gran clado, el cual presenta un soporte estadístico de 59/60 y los clados formados dentro de este, presentan un buen soporte estadístico, los dos linajes restantes, los cuales no se lograron resolver dentro de este clado, se agrupan con otras secuencias de Sur América pero solo uno de ellos (*Plasmodium* sp. (Y)) está en clado robusto.

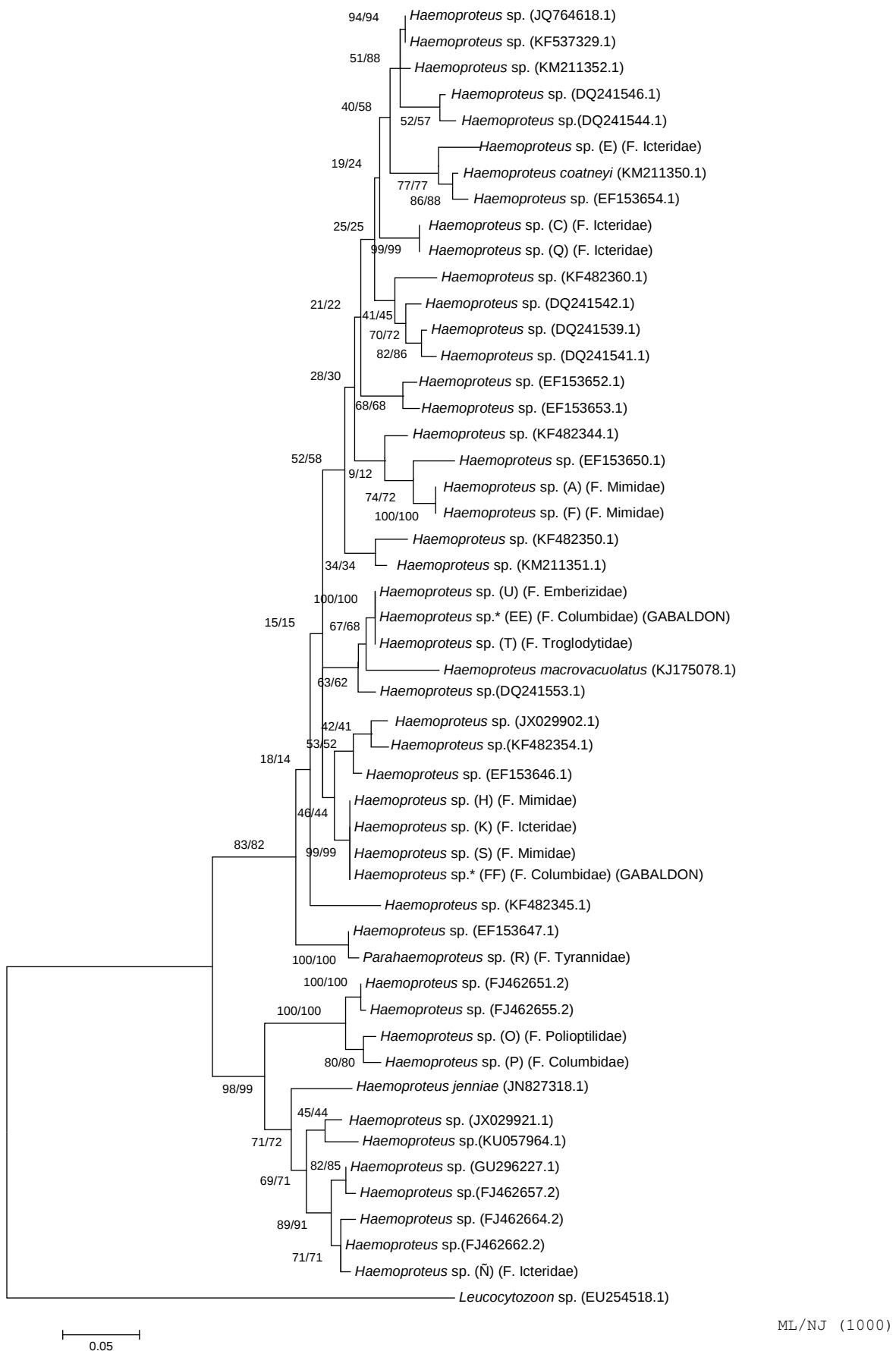


Figura 10. Árbol filogenético de ML junto al Bootstrap del NJ para *Haemoproteus* y *Parahaemoproteus* de este estudio junto con linajes de *Haemoproteus* reportados en Sur América.

El * muestra los linajes que mediante el análisis BLAST mostraron 100% de identidad para *Haemoproteus* y *Parahaemoproteus*.



Figura 11. Árbol filogenético de ML junto al Bootstrap del NJ para *Plasmodium* junto con linajes de *Plasmodium* reportados en Sur América.

4.8 Matriz de distancia junto a morfo-especies reportadas

4.8.1 Matriz de distancia de morfo-especies *Haemoproteus* y *Parahaemoproteus* (reportados) vs. *Haemoproteus* y *Parahaemoproteus* de este estudio

Las morfo-especies reportadas en la base de datos de MAIAvi para *Haemoproteus* es de 42 especies y solo 1 especie ha sido reportada como *Parahaemoproteus*. Estas secuencias fueron alineadas con los 13 linajes de *Haemoproteus* sp., 2 linajes que presentan 100% de identidad para *Haemoproteus* sp.-*Parahaemoproteus* sp. y el linaje que presenta 100% de identidad de *Parahaemoproteus* sp., trabajando con un total de 350 pb.

En la figura 12, 11 pares de linajes de este estudio presentan distancia cero entre ellos. La distancia máxima lo cual es resaltada en rojo, presenta un valor de 0,701 y pertenece a *Haemoproteus* sp. (Ñ) posición 50 de la Familia Icteridae (Paseriforme) de Venezuela, con *Haemoproteus attenuatus* posición 1 de Familia Mimidae (Paseriforme) de Suecia. La distancia máxima entre los linajes de este estudio es de 0,153, resaltada en color verde y corresponde a la posición 52 (Linaje P) con la posición 46 (Linaje E). La pequeña variación con el valor obtenido en la matriz de distancia con los linajes de Sur América (0,156) se debe a las dos pares de bases adicionales obtenido luego de realizar el alineamiento de las secuencias de este estudio.

4.8.2 Matriz de distancia de morfo-especies de *Plasmodium* (reportados) vs.

Plasmodium de este estudio

Para *Plasmodium* sp. se han reportado en la base de datos de MalAvi 20 morfo-especies. Estas secuencias fueron alineadas con los 17 linajes obtenidos en este trabajo, trabajando con un total de 350 pb.

En la figura 13, se presentan 11 pares de linajes de este estudio con distancia cero entre ellos. La distancia máxima es resaltada en rojo, la cual presenta un valor de 0,112 y pertenece a *Plasmodium* sp. (J) posición 25 de la Familia Icteridae (Paseriforme) de Venezuela con *Plasmodium rouxi* posición 17 de la Familia Icteridae (Paseriforme) de Asia. La distancia máxima entre los linajes de este estudio es de 0,094 resaltada en color verde y corresponde a la posición 29 (Linaje V) y posición 26 (Linaje L) con la posición 25 (Linaje J). La pequeña variación con el valor obtenido en la matriz de distancia con los linajes de Sur América (0,093) se debe a las dos pares de bases adicionales obtenido luego de realizar el alineamiento de las secuencias de este estudio.

4.9 Comparación de diversidad observada por distancia genética (distancia- p) reportada por la matriz de distancia y diversidad nucleotídica reportada por la DnaSP.

En este estudio se utilizó, aparte de la diversidad haplotípica, dos métodos adicionales para estimar de diversidad, la distancia genética, proporcionado por el estudio de las matrices de distancia, el cual refleja el valor absoluto de diferencias nucleotídica de pares de secuencias y la diversidad nucleotídica, el cual es el promedio del número de nucleótidos diferentes por sitio entre dos secuencias tomadas en pares.

Tabla 7. Distancia- p máxima (p) vs. Diversidad nucleotídica (π)

	<i>Haemoproteus</i>						<i>Plasmodium</i>					
Sur América	Secuencias descargadas de pubmed con los linajes de este estudio		Secuencias descargadas de pubmed		Linajes obtenidos en este estudio		Secuencias descargadas de pubmed con los linajes de este estudio		Secuencias descargadas de pubmed		Linajes obtenidos en este estudio	
	p	π	p	π	p	π	p	π	p	π	p	π
	0,159	0,90	0,156	0,80	0,153	0,030	0,135	0,086	0,132	0,078	0,091	0,070
Morfo-especies	Secuencias descargadas de pubmed con los linajes de este estudio		Secuencias descargadas de pubmed		Linajes obtenidos en este estudio		Secuencias descargadas de pubmed con los linajes de este estudio		Secuencias descargadas de pubmed		Linajes obtenidos en este estudio	
	p	π	p	π	p	π	p	π	p	π	p	π
	0,701	0,050	0,694	0,036	0,153	0,030	0,112	0,081	0,109	0,079	0,091	0,070

Como se observa en la tabla 7, al comparar ambos métodos para obtener diversidad, se aprecia como hay mayor diversidad en los linajes de *Haemoproteus* que de *Plasmodium* utilizando como referencia la distancia- p dada por las matrices de distancia, solo para los linajes de *Haemoproteus* de este estudio, se obtuvo 0,153, en contraste con el 0,091 de los linajes de *Plasmodium*. Al observar estos mismo linajes pero con el método

de Nei y Tajima (1981), donde la diversidad es estimada mediante el cálculo de diversidad nucleotídica (π), es más diverso el género *Plasmodium* que *Haemoproteus*.

4.10 Árbol filogenético de morfo-especies y los linajes de obtenidos en este estudio

En la figura 14 se muestra el árbol filogenético de máxima verosimilitud (ML) y sobre este, se colocó el soporte obtenido con la construcción del vecino más cercano (NJ), el cual se lee ML/NJ.

Se observa como 15 linajes de *Plasmodium* de este estudio se agrupan en un solo clado robusto (83/85) junto con la morfo-especie *Plasmodium ashfordi*, por lo que esta especie puede ser más cercana a este grupo de linajes, uno de los linajes restantes, (Y), se agrupa con un buen soporte (82/82) con la morfo-especie *Plasmodium cathemerium*, el linaje J de este estudio no se agrupa con buen soporte con ninguna morfo-especie descrita.

Para los linajes de *Haemoproteus*, se presenta una distribución diferente, ya que estos se agrupan en distintos clados robustos, las secuencias del Dr. Gabaldón, no se encuentran en el mismo clado pero logran resolverse con las secuencias del Estado Zulia del año 2013, con un buen soporte, asimismo, el linaje de *Parahaemoproteus* de este estudio no se logra resolver dentro de ningún clado.

Tanto el estudio filogenético de las infecciones por Haemosporidios de Sur América y este realizado para las morfo-especies, presenta comportamientos similares.

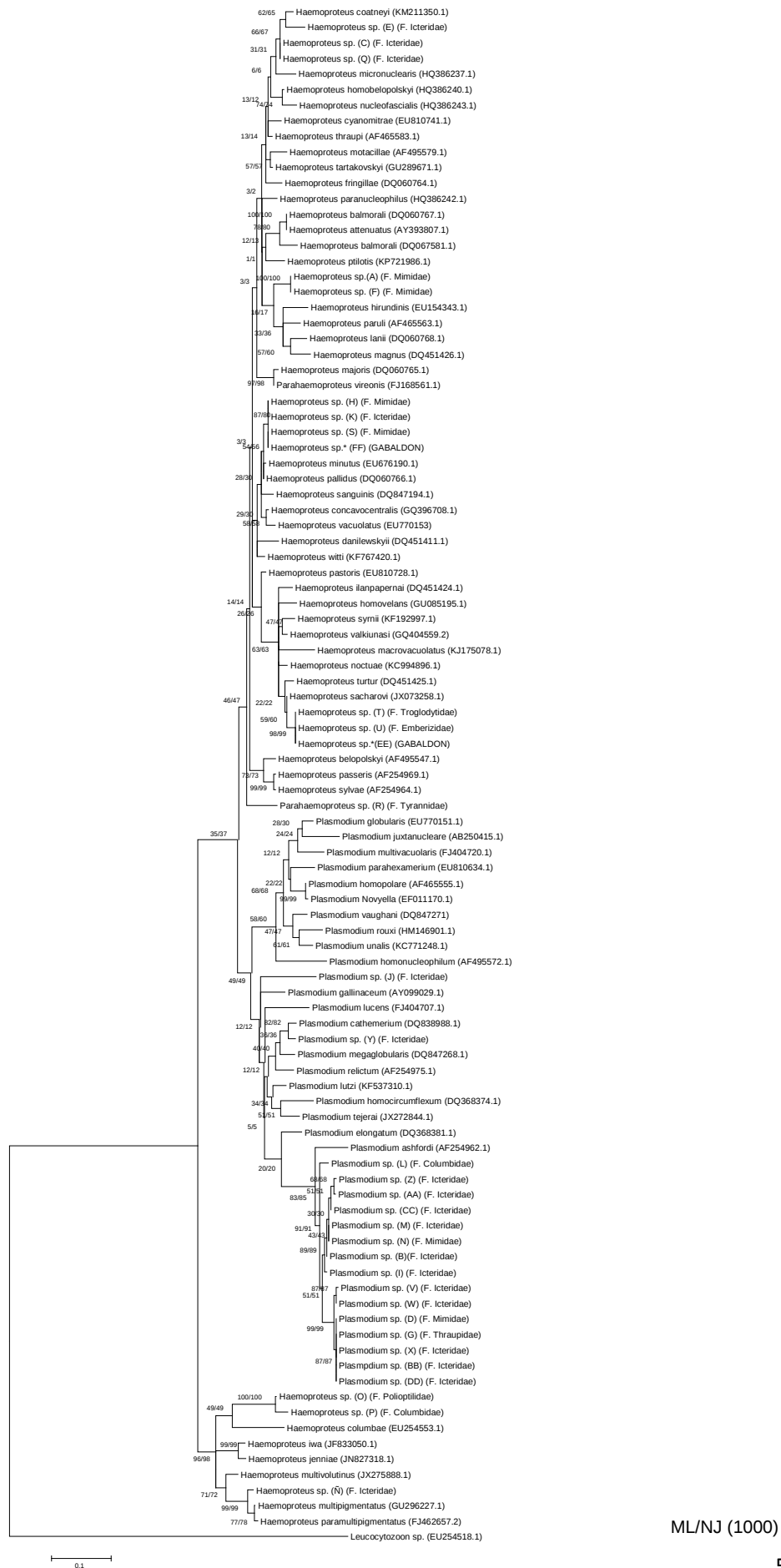


Figura 14. Árbol filogenético de ML junto al *Bootstrap* del NJ de morfo-especies y linajes de este estudio

El * muestra los linajes que mediante el análisis BLAST mostraron 100% de identidad para *Haemoproteus* y *Parahaemoproteus*.

CAPITULO V

DISCUSIÓN

El ensayo molecular realizado (PCR) para la detección y amplificación de los Haemosporidios aviares utilizando cebadores conservados en una región nuclear (CS) y en dos mitocondriales (CYTB y COXI), revelaron para este trabajo que los cebadores mitocondriales siguen estableciéndose como los más indicados para obtención de los distintos linajes de *Haemoproteus* y *Plasmodium* (Bensch y col., 2004; Hellgren y col., 2004; Richard y col., 2002; Waldenstrom y col., 2004).

El circumsporozoito es la principal proteína de superficie de los esporozoitos, también puede encontrarse en la membrana plasmática y en el interior de la cápsula de ooquistes, esta proteína permite la salida de los esporozoitos de los ooquistes para sus fases iniciales de invasión a la célula hepática por medio de sus dominios, es aquí donde se expresa la proteína, en conocimiento de esto y por medio de ensayos in vitro, se ha demostrado que la infección por esporozoitos mutados en esta región no son infecciosos en ratas jóvenes. Esto sugiere que los esporozoitos presentan un proceso único derivado en la proteína del CS, lo cual proporcionaría nuevos aportes sobre la invasión del hígado (Pacheco y col., 2013; Wang y col., 2005).

La amplificación de la proteína de superficie del CS, hasta la fecha, sigue siendo compleja, en vista de que esta proteína de superficie puede presentar variaciones en su secuencia, los cuales pueden producir cambios importantes en su estructura, es decir, es polimórfica y puede generar resultados filogenéticos engañosos; es bien conocido que

esta proteína presenta regiones de repetición para provocar al sistema inmune el montaje de una respuesta innata y dejar al hospedador indefenso ante la falta memoria inmunológica contra este patógeno en particular. De haberse logrado su amplificación pudiera aportar data valiosa a estos parásitos provenientes de aves y permitir estudios comparativos entre las amplificaciones en mamíferos (Hughes, 1991; Mas-Coma y Bargües, 2009). En contraste con la regiones mitocondriales, las cuales no están comprometidas por el sistema inmune, la mayoría de sus cambios o sustituciones de nucleótidos son simples, estas cualidades permiten que estos cebadores se adapten adecuadamente a estudios de especies estrechamente relacionadas (Martinsen y col., 2008; Mas-Coma y Bargües., 2009; Valkiūnas, 2005).

Las descripciones de parásitos Haemosporidios venezolanos se basaron principalmente en la observación bajo microscopio de luz del Dr. Arnoldo Gabaldón y colaboradores, este aporte dio a la comunidad científica venezolana la colección de parásitos maláricos, contando con 221 registros originales de infecciones experimentales y 22.989 réplicas. Asimismo, para Venezuela describió 4 especies endémicas de malaria aviar; un estudio de la literatura muestra que anualmente se describen especies basándose solo en criterios morfológicos (Outlaw y Ricklef, 2014).

El estudio simultáneo de los extendidos sanguíneos o clásicos y técnicas moleculares, como la PCR, permite no solo corroborar la identificación de la especie observada en el microscopio, sino conocer y trabajar la historia evolutiva de estos patógenos, así como su diversidad (Valkiūnas, 2010). Es por ello la importancia de rescatar

la vieja data y darle paso a la nueva era molecular pero sin dejar atrás los hallazgos y descripciones de los métodos clásicos, los cuales aún son empleados.

Para la obtención del material biológico de los extendidos sanguíneos de la Colección del Dr. Arnoldo Gabaldón (vieja data), primero se observaron al microscopio de luz para corroborar la presencia del patógeno, así como el porcentaje de parasitemia (Tabla 4), tomando en cuenta el tiempo de preservación del material -35 años- y las condiciones en las que pudo encontrarse antes de ser ordenada, clasificada y almacenada de manera adecuada por el Instituto de Altos Estudios Dr. Arnoldo Gabaldón (Maracay), los resultados son muy prometedores, el mejor método de extracción es el de Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico, lo cual se refleja en la concentración del ADN, así como en la calidad de la extracción (Figura 6 y tabla 3), lo cual posiblemente se deba al uso de estas fases inmiscibles y el papel doble del Cloroformo como desnaturalizador de proteínas y en disolución de lípidos, además, del Fenol, que contribuye asimismo a la desnaturalización de las proteínas. Este paso, luego de utilizar la proteinasa K, demuestra que cualquier endonucleasa que escapara de ella, podría ser separada del material genético y encontrarse en la fase orgánica (o más densa) (Herráez, 2012). A pesar de que todos los extendidos dieron positivo al microscopio de luz, solo dos mostraron amplificación de citocromo b del parásito; aun cuando no se logró amplificar con el marcador mitocondrial de CYTB de vertebrados dado a la degradación del cebador antisentido (Figura 4), la detección de infección con cebadores parásito-específicos y posterior secuenciación permitió comparar lo descrito por el Dr. Gabaldón en 1981, quien clasificó estos aislados como *Plasmodium novyella* y *Plasmodium* sp., mientras que el

análisis de las secuencias arrojó que dichos aislados pertenecen al género de *Haemoproteus*, por lo que probablemente se cometió un error en la clasificación original, este tipo de errores ya han sido detectados por el personal encargado de la organización de esta colección.

La obtención de un 12% positivo de las muestras de este trabajo para el estado Zulia mediante la técnica molecular de PCR, contrastado con un 16,94% de muestras positivas observadas al microscopio de luz por Praderes (2016), quien trabajó con el mismo conjunto de muestras, permite considerar la importancia del material biológico del que se está realizando la extracción del ADN, la cantidad de ADN total extraído del tejido sanguíneo es mayor en aves que en mamíferos, debido a que los eritrocitos en aves son nucleados, por lo que la gran cantidad de ADN podría inhibir la PCR, dando como resultado falsos negativos y por ello la necesidad de realizar ambos estudios de manera simultánea. Otra razón por la que es necesario seguir utilizando ambos métodos es que la PCR es una técnica que presenta una alta sensibilidad y puede enmascarar más de un parásito en sangre, como casos de coinfección, los cual podría solo amplificar uno de los dos parásitos en sangre, estos casos son muy comunes en aves, donde se han llegado a reportar más de dos linajes por microscopia de luz (Martinsen y col. 2008; Palinauskas y col. 2013; Richard y col. 2002).

Las matrices de distancia y los análisis filogenéticos realizados a los 33 linajes obtenidos, de los cuales 2, son de los extendidos sanguíneos de vieja data, permitieron realizar aportes interesantes para estos patógenos en Venezuela. Al construir las matrices con infecciones de *Haemoproteus* y *Plasmodium* de Sur América, se quiso observar donde

se podrían agrupar los distintos linajes obtenidos en este trabajo. En la matriz donde se encuentran las infecciones por *Haemoproteus* (Figura 8), dos linajes descargados de la base de datos que entre ellos presentan distancia cero, uno de ellos es reportado para Venezuela en el 2012 por Mijares y col. (posición 20) en el paso migratorio “Paso de Portachuelo”, localizado en el Parque Nacional Henri Pittier, con uno, reportado en el 2015 por González y col. (posición 27) para la Región Andina de Colombia. Lo cual refleja una similitud de los linajes encontrados en Venezuela con los linajes de Colombia, la cercanía geográfica y el hecho de que ambos países son pasos migratorios de aves, facilita esta homogeneidad de linajes entre ambos países.

A partir de la posición 35 comienzan los linajes obtenidos en este estudio, se puede observar que entre ellas presentan distancia cero (11 de 174 pares de linajes) y aun cuando las del Dr. Gabaldón son de otra localidad, se agrupan muy bien con las muestras obtenidas del Estado Zulia, lo cual refleja que 35 años es un periodo de tiempo muy corto para determinar un patrón de cambio en la región de citocromo b de estos parásitos, lo cual es respaldado con la diversidad nucleotídica obtenida (Tabla 6), siendo para el caso de *Haemoproteus*, incluyendo los dos linajes obtenidos del Dr. Gabaldón y al excluirlos, el mismo valor (0,03), mostrando baja tasa mutacional.

La menor distancia obtenida para el linaje de *Parahaemoproteus* es de 0,006, comparada con la posición número 11, un linaje del Perú catalogado como *Haemoproteus* (Figura 8), el mismo linaje en el cual se agrupa con un soporte estadístico de 100/100 (Figura 10). Al analizar la matriz de las morfo-especies de *Haemoproteus*, la cual incluye un solo linaje de *Parahaemoproteus*, la distancia entre estos dos es 0,061 (Figura 12), lo cual

es significativamente mayor. Esto refleja una posible clasificación errónea de linajes de *Parahaemoproteus* descritos como *Haemoproteus* o viceversa. Recientemente ha sido descrito la necesidad de separar el género *Haemoproteus* en dos subgéneros: *Haemoproteus* y *Parahaemoproteus* (Martinsen y col. 2008), en dicho trabajo se utilizan cuatro cebadores para llegar a estas conclusiones, dos mitocondriales, uno nuclear y uno del plástido; las secuencias que Martinsen y col. (2008) utilizaron para la construcción del árbol filogenético están clasificadas como *Haemoproteus* en el portal NCBI, luego de los análisis filogenéticos realizados por ellos es que dichos linajes se catalogaron como *Parahaemoproteus*, pero la clasificación hasta la fecha, en el portal NCBI sigue siendo *Haemoproteus*, lo cual es una muestra de los errores presentes en la base de datos del portal, por lo que es necesario realizar una revisión sobre la validez de los *Haemoproteus* y *Parahaemoproteus* descritos y hacer correcciones de los posibles errores.

Para las comparaciones de los linajes de *Plasmodium* obtenidos en este trabajo con los linajes de *Plasmodium* reportados para Sur América (Figura 9), un par de linajes obtenidos de la base de datos presenta distancia cero: un linaje del Perú (posición 38) que es comparado con un linaje del Continente Sur Americano, del cual no se especifica su localidad por Rickles y Fallon (2002) (posición 33). A partir de la posición 42 comienzan los linajes de este estudio y al igual que para *Haemoproteus*, entre ellos, 11 pares de linajes de los 190 pares presentan distancia cero entre ellos.

Con las morfo-especies de *Haemoproteus* y *Plasmodium* (Figura 12 y 13), no se logró identificar las especies de los linajes de este estudio. La distancia máxima de ambas matrices es una secuencia de este estudio comparada con morfo-especies que se

encuentran en distintos continentes, lo cual tiene sentido por su distribución geográfica. Asimismo y descrito anteriormente, el linaje de *Parahaemoproteus* no presenta similitud con ninguna especie, lo cual era esperado dado el debate sobre este subgénero.

Los linajes que presentan distancia cero de este estudio, se puede deber a que son de la misma localidad y en los casos de los dos extendidos de la colección del Dr. Gabaldón, es interesante observar que presentan distancia cero con otros linajes, mostrando así que pasado 35 años desde sus infecciones experimentales con estos patógenos hay conservación de la región estudiada del citocromo b. En las morfo-especies de *Plasmodium* (Figura 13) aún falta mucho por describir y esto se refleja en la cantidad de especies descritas, 20 en total, aun así, al igual que las matrices anteriores vemos como se agrupan nuestros linajes dándole importancia así su lugar de origen.

Con el fin de agrupar los resultados obtenidos en este estudio, se construyó un árbol filogenético (Figura 14) donde se muestra linajes de este estudio que arrojaron pertenecer a los géneros *Haemoproteus*, *Plasmodium* y *Parahaemoproteus*, las morfo-especies de los géneros *Haemoproteus*, *Plasmodium* y *Parahaemoproteus* más un grupo externo, *Leucocytozoon*. En *Haemoproteus* los linajes se agrupan en distintos clados, aun así, presentan ramas robustas y logran resolverse dentro del grupo de morfo-especies descritas de este género, en el caso contrario, se ve a *Parahaemoproteus* de este estudio, el cual no logra resolverse dentro estos caldos pero la morfo-especie descrita como *Parahaemoproteus vireonis*, está un clado junto con *Haemoproteus majoris* y posee una soporte Bootstrap de 97/98, dando respaldo al debate de Martinsen y col. (2008), así

como de las clasificaciones erróneas. Lo mismo puede observarse en la matriz de distancia (Figura 9).

Es interesante destacar, que aun cuando al realizar el análisis BLAST, las secuencias obtenidas de los extendidos sanguíneos del Dr. Gabaldón, presentaban 100% de identidad entre *Haemoproteus* y *Parahaemoproteus*, tanto las matrices de distancia (Figura 8 y 12) como los análisis filogenéticos (Figura 10 y 14) los agrupa dentro del grupo *Haemoproteus*. En este caso, se realizó la búsqueda de secuencias del portal NCBI para el subgénero de *Parahaemoproteus*, con la finalidad de ser comparadas con el linaje de *Parahaemoproteus* de este estudio junto con los dos linajes obtenidos de los extendidos sanguíneos, en la página se reportan un total de 400 secuencias amplificadas para la región conservada de CYTB, desafortunadamente, la mayoría de estas secuencias son parciales y al momento de realizar el CLUSTALW casi todas presentaban numerosos gaps, haciendo difícil y poco confiable el modelado de estos datos.

Con el grupo del género *Plasmodium*, se observa un comportamiento diferente, puesto que, de los 17 linajes, 15 se agrupan en un gran clado, a excepción de los linajes Y y J, los cuales no logran resolverse en este clado pero aun así, el linaje Y se agrupa con una morfo-especie en una rama robusta. Al observar el comportamiento de ambos linajes se podría decir que faltan aún muchas morfo-especies por definir para *Plasmodium*, donde la distancia-*p* máxima en Sur América (0,135) es mayor que en las morfo-especies (0,112), lo cual es una muestra de que se han secuenciado más linajes de lo que se han definido como especie, caso contrario el de *Haemoproteus*, la distancia-*p* máxima de morfo-

especies (0,701) que las de Sur América (0,159) por lo que se han definido más morfo-especies que linajes secuencias para Sur América.

Se han propuesto muchas medidas o estimadores de diversidad de especies y su literatura es muy extensa, muchas de sus interpretaciones se deben a como el investigador aborde el problema presentado, se puede denominar diversidad a la riqueza de especies por un lado y por el otro hablar de heterogeneidad e incluso la equidad de la población, cada estimador de diversidad presenta propios parámetros y no es de extrañar que cada estimador de valores diferentes. Para las secuencias descargadas de Sur América y de las morfo-especies, la diferencia entre las distancia- p máxima obtenida en las matrices de los linajes de este estudio refleja una mayor diversidad de los linajes de *Haemoproteus* en comparación con los linajes de *Plasmodium*, esto muestra que se obtuvo una muestra muy diversa, casi alcanzando el valor máximo de distancia- p (Tabla 7), esta diversidad también es reflejada en las topologías de los tres árboles filogenéticos de este estudio (Figura 10,11 y 14), donde los linajes de *Haemoproteus* de este estudio se agrupan en distintas ramas, caso contrario el de los linajes de *Plasmodium*, donde la mayoría de los linajes se agrupan en un solo grupo, quedando solo dos linajes fuera de este gran grupo. Estos dos linajes, los cuales no lograron resolverse dentro de un clado con buen soporte estadístico pudieron aportar mucha diversidad a este grupo, lo cual puede observarse al momento de utilizar el valor de diversidad nucleotídica como referencia, donde vemos como el género de *Plasmodium* (0,070) presenta ahora una diversidad mayor que el género de *Haemoproteus* (0,030).

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

- La obtención de ADN partiendo de la preservación en papel de filtro es eficiente con la metodología empleada de Bereczky y col., 2005.
- Entre los tres métodos de extracción de ADN partiendo de los extendidos sanguíneos del Dr. Arnoldo Gabaldón, el mejor método de obtención del material fue el de Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamilico.
- El uso de cebadores mitocondriales, específicamente citocromo b, para este estudio, fueron los más adecuados para la identificación, diagnóstico, amplificación y estudios filogenéticos de la malaria aviar.
- Los linajes de *Haemoproteus* y *Plasmodium* presenta una mayor diversidad haplotípica que nucleotídica.
- La topología de los arboles filogenéticos presentó a los linajes de *Haemoproteus* como los más diversos.
- Los análisis de diversidad haplotípica, nucleotídica y los análisis filogenéticos de la región del citocromo b mostraron que 35 años no es tiempo suficiente para ver variaciones significativas de los parásitos maláricos aviares.

RECOMENDACIONES

- Se sugiere estandarizar y hacer uso de distintitos cebadores nucleares para parásitos maláricos de Venezuela.
- Usar técnicas moleculares en las réplicas experimentales de los extendidos sanguíneos del Dr. Gabaldón para realizar estudios ecológicos, evolutivos e historias de vida de los Haemosporidios presentes en el Territorio Nacional.
- Realizar revisión bibliográfica y nucleotídica de las clasificaciones de *Haemoproteus* y *Parahaemoproteus* reportadas.
- Hacer estudios simultáneos de los hospedadores aviares y vectores presentes en áreas de muestreo para hacer relaciones vector-específico con sus distintos hospedadores aviares.

BIBLIOGRAFIA

- Astudillo, V., Hernandez, S., Kistler, W., Boone, S., Lipp, E., Shresthe, S., Yabsley, M. 2013. Spatial, temporal, molecular, and intraespecific differences of haemoparasites infection and relevant selected physiological parameters of wild birds in Georgia, USA. *Int. Jou. For Para.: Para. And Wil.* 178-189.
- Atkinson, C., Van Riper, C. 1991. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon* and *Haemoproteus*. Oxford University Press, Oxford. 19-48.
- Atkinson, C., Lease, J., Dusek, R., Samuel, M. 2005. Prevalence of pox-like lesions and malaria in forest bird communities on Leeward Mauna Loa Volcano, Hawaii. *The Coo.* 537-546.
- Belo, N., Rodriguez-Ferraro, A., Braga, E. 2012. Diversity of avian haemosporidians in arid zones of zones of northern Venezuela. *Para.* 1-8.
- Bennett, G. 1960. On some ornithophilic blood-sucking diptera in Algonquin Park, Ontario, Canada. *Can. J. Zool.* 377-389.
- Bennett, G., Aguirre, A. 1991. Blood parasites of some birds from northeastern Mexico. *Jour. Para.* 38-41
- Bensch, S., Stjernman, M., Hasselquist, D., Ostman, O., Hasson, B., Westerdahl, H., Pinheiro, R. 2000. Host specificity in avian blood parasites: A study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 1583-1589.
- Bensch, S., Perez-Tris, J., Waldenstrom, J., Hellegren, O. 2004. Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences in avian malaria parasites: multiple cases cryptic speciation?. *Evo.* 1612-1621
- Bensch, S., Waldenstrom, J., Jozen, N., Westerdahl, H., Hansson, B., Sejberg, D., Hasselquist, D. 2007. Temporal dynamics and diversity of avian malaria parasites in a single host species. *H. Anim, Ecol.* 112-122.
- Bereckzy, S., Martensson, A., Gil, P., Farnet, A. 2005. Short report: Rapid DNA extraction from archive blood spots on filter paper for genotyping of *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 249-251.
- Boletín de Malariología y Salud Ambiental. Colección de Parásitos Maláricos y otros Haemosporidios en Aves “Dr. Arnoldo Gabaldón”. [En línea]. 2014. vol. 54 n.2. [Citado el 30/10/15].

Disponible
en:

http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-46482014000200016%20
- Castillo, A. 2008. Prevalencia e intensidad de haemoparasitos en aves montanas de Venezuela. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela, Caracas. Venezuela.
- Combes, C. 1997. Fitness of parasites: pathology and selection. *Int. Jour Para.* 1-10.
- Clark, N., Clegg, S., Lima, M. 2014. A review of global diversity in avian haemosporidians (*Plasmodium* and *Haemoproteus*: Haemosporida): new insights from molecular data. *Inter. Jour. Para.* 329-338.
- Dobson, A. 2004. Population dynamics of pathogens with multiple host species. *Am. Nat.* 64-78.
- Ewald. PW. 1983. Host-parasite relations vectors and the evolution of disease severity. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 465-485.
- Escalante, A., Ayala, F. 1994. Phylogeny of the malarial genus *Plasmodium*, derived from rRNA gene sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 11373-11377.

- Fallon, S., Ricklefs, R., Swanson, B., Bermingham, E. 2003. Detecting avian malaria: an improved polymerase chain reaction diagnostic. *Jour. Para.* 1044-1047.
- Feldman, R., Freed, L., Cann, R. 1995. A PCR test for avian malaria in Hawaiian birds. *Mol. Eco.* 663-673.
- Freile, J., Santander, T. 2005. Aéreas Importantes para la conservación de las Aves en los Andes Tropicales: sitios prioritarios para la conservación de la biodiversidad. BirdLife International, serie de conservación de BirdLife número 14. Quito, Ecuador.
- Gabaldón, A. 1998. Malaria Aviar en un país de la Región Neotropical-Venezuela. Fondo Editorial Interfundaciones, Caracas, Venezuela.
- Garvin, M-C. 1997. Remsen JV. An alternative hypothesis for heavier parasite loads of brightly colored birds: exposure at the nest. *Auk*. 179-191.
- Garnham, P. 1966. Malaria parasites and other Haemosporidia. Oxford: Blackwell.
- Garnham, P., 1977. A new malaria parasite of pigeons and ducks from Venezuela. *Prot.* 113-126.
- González, A., Lotta, I., García, L., Moncada, L., Matta, N. 2015. Avian haemosporidians from Neotropical highlands: Evidence from morphological and molecular data. *Par. Int.* 48-59.
- Gutierrez, S. Arróspide, N. 2003. Manual de procedimientos en el Laboratorio para el diagnóstico de la malaria. Instituto Nacional de Salud. Lima-Perú.
- Gwynne, J., Tudor, G. 2003. Birds of Venezuela. Princeton University Press, Second Edition, Princeton, New Jersey.
- Hellgren, O., Waldenstrom, J., Bensch, S. 2004. A New Nested Polymerase Chain Reaction Method Very Efficient in Detecting *Plasmodium* and *Haemoproteus* Infections From Avian Blood. *Jour. Para.* 191-194.
- Herráez, Á. 2012. Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Segunda Edición, Elsevier, España.
- Hughes, A. 1991. Circumsporozoite Protein Genes of Malaria Parasites (*Plasmodium* spp.): Evidence for Positive Selection on Immunogenic Regions. *Gene. Soc. Ame.* 345-353.
- Li, J., Wirtz, R., McConkey, G., Sattabongkot, J., Waters, A., Rogers, M., McCutchan, T. 1995. *Plasmodium*: Genus conserved primers of species identification and quantitation. *Expe. Para.* 182-190.
- Li, K. 2003. ClustalW-MPI: ClustalW analysis using distributed and parallel computing. *Bioi.* 1585-1586.
- Martinsen, E-S., Perkins, S., Schall, J. 2008. A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): Evolution of life-history traits and host switches. *Mol. Phy. and Evo.* 261-273.
- Mas-Coma, S., Bargües, M-D. 2009. Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vectors inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA. *Act. Tro.* 112-136.
- Martínez, J., Merino, S., Moreno, J., Vasquez, R. 2006. Avian Haemotozoa in forest birds from south Chile: Prevalence and parasite richness across a latitudinal gradient. *Mic. AND Par.* 600-605.
- Marzal, A., Bensch, S., Reviriego, M., Balbontin, J. De Lope, F. 2008. Effects of malaria double infection in birds: One plus one is not two. *Jou. evol. Biol.* 979-987.
- Mijares, A., Rosales, R., Silva-Iturriza, A. 2012. Haemosporidian parasites in forest birds from Venezuela: Genetic lineage analyses. *Avi. Dess.* 583-588.

- Moller, A., Nielsen, J. 2007. Malaria and risk of predation: A comparative study of birds. *Eco. Soc. Ame.* 871-881.
- Nei, M., Li, W. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA.* 5269-5277.
- Nei, M., Tajuma, F. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Gen.* 145-163.
- Olsen, O. W. 1974. *Animal parasites, their life cycles and ecology.* Dover Publications Inc, Mineola, New York, 564.
- Outlaw, D., Ricklefs, R. 2014. Species limits in avian malaria parasites (Haemosporida): how to move forward in the molecular era. *Par.* 1223-1232.
- Pacheco, M., Cranfield, M., Cameron, K., Escalante, A. 2013. Malarial parasite diversity in chimpanzees: the value of comparative approaches to ascertain the evolution of *Plasmodium falciparum* antigens. *Mala. Jour.* 328.
- Palinauskas, V., Krizanauskiene, A. Jezhova, T., Bolshakov, C. 2013. A new method for isolation of purified genomic DNA from hemosporidian parasites inhabiting nucleated red blood cells. *Exp. Par.* 275-280.
- Poulin, R. 2007. *Evolutionary Ecology of Parasites.* 2nd ed. Princeton, New Jersey: Princeton University Press.
- Praderes, G. 2016. Prevalencia de parásitos maláricos y otros Haemosporidios en aves en la estación del Planetario Simón Bolívar Maracaibo Estado Zulia. Tesis Doctoral. Universidad Central de Venezuela, Caracas. Venezuela.
- Promega Corporation. Catalog A1120. Wizard® Genomic DNA Purification Kit.
- Pryzwansky, K., Rausch, P., Spitznagel, J., Herion, C. 1979. Immunocytochemical distinction between primary and secondary granule formation in developing human neutrophils: Correlations with Romanowsky stains. *Blood.* 179- 185.
- Richard, F., Ravinder, N., Hugh, J., Thomas, S. 2002. A comparative analysis of PCR-based detection methods for avian malaria. *Jour. Para.* 819-822.
- Ricklefs, R., Fallon, S. 2002. Diversification and host switching in malaria parasites. *Proc. Roy. Soc. Lon.* 885-892.
- Ricklefs, R., Fallon, S., Bermingham, E. 2004. Evolucionary relationships, cospeciation, and host switching in avian malaria parasites. *Syst. Bio.* 111-119.
- Rozas, J., Librado, J., Sánchez-DelBarrio, X. 2010. DnaSP, DNA Sequence Polymorphism: an interactive program for estimating Population Genetics parameters from DNA sequence data. *Com. App. Bio.* 621-625.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" .Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schrader, M., Walters, E., James, F., Greiner, E. 2003. Seasonal prevalence of a haemotozoan parasite of fredbellied woodpeckers (*Melanerpes carolinus*) and its association with host condition and overwinter survival. *Auk.* 130-137.
- Sousa, O., Herman, C. 1982. Blood parasites of birds from Chiriqui and Panama providences in the Republic of Panama. *Jou. Wil. Dis.* 205-221.
- Steuber, S. Abdel-Rady, A., Clausen, P-H. 2005. PCR-RFLP analysis: a promising technique for host species identification of blood meals from tsetse flies (Diptera: Glossinidae). *Para. Res.* 247-254.
- Stotz, D., Fitzpatrick, J., Parker, t., Moskovits, D. 1996. *Neotropical birds: ecology and conservation.* University of Chicago Press.

- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Foliański, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2725–2729.
- Valkiūnas, G., Salaman, G., Lezhova, T. 2003. Paucity of hematozoa in Colombian birds. *Jou. Wil. Dis.* 445-448.
- Valkiūnas, G., Lezhova, T., Brooks, D., Hanelt, B., Brant, S., Sutherlin, M., Causey, D. 2004. Additional observations on blood parasites of birds in Costa Rica. *Jou. Wil. Dis.* 555-561.
- Valkiūnas, G. 2005. Avian malaria parasites and other haemosporidia. Editorial CRC Press, Boca Raton, FL.
- Valkiūnas, G., Sehgal, R., Lezhova, T., Hull, A. 2010. Identification of *Leucocytozoon toddi* (Haemosporidia: Leucocytozoidae), with remarks on the species taxonomy of Leucocytozoids. *Jou. Par.* 170-177.
- Whang, Q., Fujioka, H., Nussenzweig, V. 2005. Exit of *Plasmodium* Sporozoites from Oocysts Is an Active Process That Involves the Circumsporozoite Protein. *Plo. Pat.* e9
- Waldenstrom, J., Bensch, S., Hasselquist, D., Ostman, O. 2004. A new nested Polymerase Chain Reaction method very efficient in detecting *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections from avian blood. *Jour. Para.* 191-194.
- Wenyon, CM. 1988. Protozoology: a manual for medical men, veterinarians and zoologist, etc. Part 2. London: Baillière, Tindal and Cox.
- White, E., Greiner, E., Bennett, G., Herman, C. 1978. Distribution of the hematozoa of neotropical birds. *Rev. Biol. Trop.* 43-102.
- Woodworth-Lynas, C., Caines, J., Bennett, G. 1989. Prevalence of avian haematozoa in Sao Paulo State, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 515-526.
- Young, B., Garvin, M., McDonald, D. 1993. Blood parasites in birds from Monteverde, Costa Rica. *Jou. Wil. Dis.* 555-560.
- URL:<http://www.yourgenome.org/facts/what-is-malaria> [Consultada el 26 de agosto de 2015].
- URL:[http://www.pioneerherbalproducts.co.uk/Culicoides-Midges\(354294\).htm](http://www.pioneerherbalproducts.co.uk/Culicoides-Midges(354294).htm) [Consultada el 28 de agosto de 2015].
- URL:http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Hippoboscidae&guide=Groups_Insecta&flags=glean:&mobile=iPhone [Consultada el 28 de agosto de 2015].
- URL:https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ochlerotatus_taeniorhynchus_syn._Aedes_taniorhynchus_aka_the_Black_Salt_Marsh_Mosquito.jpg [Consultada el 28 de agosto de 2015].
- URL:http://www.metafysica.nl/nature/nomos_16.html [Consultada el 28 de agosto de 2015].

ANEXOS

Anexo 1: Glosario

- **Clado:** Porción de una filogenia que desciende de un antecesor común.
- **Hemocele:** Cavidad general secundaria de los artrópodos que constituyen un sistema lagunar lleno de líquido hemático y forma parte del aparato circulatorio abierto.
- **Gaps:** Representan la introducción de espacios (en el modelo evolutivo, una mutación por inserción o borrado) en secuencias de nucleótidos.
- **Máxima parsimonia:** Método de construcción de árboles filogenéticos que opera directamente sobre las secuencias de ADN (método discreto) que predice el árbol evolutivo o árboles que reducen el mínimo de número de pasos requeridos para generar una variación observada en las secuencias.
- **Máxima verosimilitud:** Método discreto de construcción de árboles que predice el árbol (o arboles) más probable que explique los datos observados tomando en cuenta el modelo de evolución de las secuencias (previamente determinado).
- **Membrana peritrófica:** Malla de quitina embebida en una matriz de proteína y carbohidratos, cuya principal función es la protección de las células del intestino medio para evitar daño mecánico por el paso del alimento, además es permeable a las enzimas digestivas y productos de la digestión.
- **Parafilético:** Subconjunto de especies descendientes de un ancestro en común. Un grupo parafilético incluye la especie ancestral y solo algunos de sus descendientes.
- **Red de haplotipo:** Árboles filogenéticos multifurcados que permite la observación de la relación génica entre individuos.
- **Taxón:** Grupo particular de organismos definido por una serie de caracteres compartidos.
- **Vecino más cercano:** Reconstrucción de árboles filogenéticos a partir de distancia evolutiva (número de pares de bases distintas entre secuencias), mediante el encuentro de vecinos que minimicen la longitud de las ramas.

**Anexo 2: Tabla de concentración de la extracción de ADN de muestras provenientes del
Estado Zulia colectados en papel de filtro**

Muestra/Entrada	Abs 260/280	ng/μL
04192	1	64
0425	1,96	49
04192	2	66
0424	1,02	60
04207	1	32
04208	1	66
04209	1	150
04228	1	108
04227	1,50	80
04229	0,90	42
04131	1	123
04132	2	99
04133	2,70	59
0462	1,98	60
0463	1,99	59
0464	1,02	107
0465	1,03	100
04118	1,03	60
04119	1	88
04120	1	89
0484	1	90
0485	1	101
0486	1	157
0487	1	200
04139	1	201
04140	1,01	60
04141	0,90	20
04142	1	50
04122	2,21	58

Muestra/Entrada	Abs 260/280	ng/μL
04130	2,11	59
0474	2,13	120
0475	2,14	88
0476	2,15	92
0477	2,22	34
0478	2,20	38
0479	2,20	45
0480	2	40
0403	2	41
0404	2	30
0405	1	66
0406	1	69
0407	1	72
0408	1,07	67
0409	1,87	73
0410	1,89	69
0411	1,20	80
0431	1,02	81
0432	1,03	36
0433	1,10	78
0434	1,11	80
0435	1,50	90
0436	1,80	100
0438	1,89	106
0439	2	120
0440	1,70	170
0441	1,22	190
0413	1,20	40
0414	1	60
0415	1	58
0416	1	59
0418	1	60

Muestra/Entrada	Abs 260/280	ng/μL
0419	1	63
0420	1	20
04143	1	90
04144	1	71
04145	1	74
04146	1	63
04147	1	73
04148	1	42
04149	1	123
04236	1	130
04235	1	86
04208	1	88
04211	1	60
04216	1	10
04218	1,02	32
04219	1	32
04172	1	100
04147	1	101
04220	1	100
04200	1	98
04197	1	98
04196	1	98
04195	1	70
04194	2	50
04181	2	51
04178	2	30
04149	2	20
04150	2	21
04217	2	20
04161	2	60
04144	2	68
04136	2	70

Muestra/Entrada	Abs 260/280	ng/μL
04134	2	80
04132	2	99
04166	2	90
04163	2	100
04142	1,04	28
04137	1,96	45
04145	2,11	47
04100	1	48
04101	1	49
04102	2,03	50
04103	1,03	98
04104	1,03	73
04105	1,03	60
04106	1	65
04107	1	66
04108	1	70
04109	1	70
04110	1	89
04111	1	80
04112	1	61
04113	1	45
04114	1	64
04193	1	64
04194	1	23
04195	1	20
04196	1	78
04197	1	40
04198	1	78
04199	1	70
0424	1	49
0425	1	37
0426	1	69

Muestra/Entrada	Abs 260/280	ng/μL
0427	1	89
0428	1	88
0429	1	80
0430	1,03	90
0431	2	98
0432	2	10
0433	2	99
0434	2	101
0436	2	100
0437	2	99
0438	2	98
0439	2	98
0426	2,68	63
0427	2,30	21
0428	2,87	36
0429	2,88	39
0430	2,89	40
0444	2,30	61
0446	2	73
0445	2	79
0447	2	59
0448	2	43
0449	2	25
0450	2	69
0456	2	79
0457	2	90
0458	2	99
0460	2	90
0400	2	80
0401	2	60
0402	2,60	50
0403	2,50	65

Muestra/Entrada	Abs 260/280	ng/μL
0404	2,30	67
0405	2,30	70
0406	2,30	88
0407	2,30	80
0408	2,69	90
0409	1,97	92
0477	1,96	100
0478	1,52	101
0479	1,41	105
0480	1,41	106
0481	1,79	80
0482	1,79	90
0483	1,33	90
0484	1,42	100
0497	1,52	101
0485	1,53	102
0486	1,66	104
0487	0,16	30
041	2,27	20
042	2,27	67
044	2,28	68
043	1,79	70
045	1,80	42
046	1,80	79
047	1,81	89
048	1,81	80
049	0,65	42
04999	1,53	44
04998	2,90	63
04997	1	41
04996	1	27
04995	1	90

Muestra/Entrada	Abs 260/280	ng/μL
04994	1	91
04993	1	101
04992	1,10	100
04991	1,19	90
04989	1,22	41
04988	1,50	88
04987	1	46
04986	1	65
04985	1	68
04984	1	78
04983	1	79
04980	1	80
04700	1	100
04701	1	43
04702	1	46
04703	1	67
04704	2,60	78
04705	2,50	74
04706	2,51	45
04707	2,51	40
04708	2	60
04709	2	70
04711	2	99
04712	2	20
04713	2	67
04714	2	70
04715	2	60
04716	2	65
04717	2	68
04718	2	69
04719	2	80
04720	1,68	85

Muestra/Entrada	Abs 260/280	ng/μL
04722	1,68	86
04723	1,50	88
04725	1,03	90
04728	0,90	101
04729	0,70	103
04730	0,30	108
04731	1	111
04732	1	123
04800	1	90
04801	1	99
04802	1	98
04803	1	101
04804	2,01	100
04805	2,03	36
04806	1	79
04807	1	88
04808	1	89
04809	1	30
04810	1	20
04811	2	26
04812	2	60
04813	2	31
04814	2,03	100
04815	2,04	106
04816	2	160
04817	2	50
04818	2	55
04819	2	50
04820	2	77
04821	2,68	79
04822	2,01	90

Anexo 3: Tabla de localidad de las infecciones de Haemosporidios en Sur América

Género	Especie	Acceso	Localidad
<i>Haemoproteus</i>		KJ661259	Ecuador
<i>Haemoproteus</i>		KF537300	Colombia
<i>Haemoproteus</i>	<i>coatneyi</i>	KM211350	Colombia
<i>Haemoproteus</i>		EF153652	Chile
<i>Haemoproteus</i>		EF153646	Chile
<i>Haemoproteus</i>		DQ241553	Guyana
<i>Haemoproteus</i>		KM211346	Colombia
<i>Haemoproteus</i>		JX029902	Brasil
<i>Haemoproteus</i>		DQ241539	Guyana
<i>Haemoproteus</i>		JQ764618	Venezuela
<i>Haemoproteus</i>		GU296227	Ecuador
<i>Haemoproteus</i>		FJ462655	Ecuador
<i>Haemoproteus</i>		KU057964	Brasil
<i>Haemoproteus</i>		FJ462657	Venezuela
<i>Haemoproteus</i>		FJ462662	Venezuela
<i>Haemoproteus</i>		FJ462664	Venezuela
<i>Haemoproteus</i>		JX029921	Brasil
<i>Haemoproteus</i>	<i>jenniae</i>	JN827318	Ecuador
<i>Haemoproteus</i>	<i>macrovacuolatus</i>	KJ175078	Colombia
<i>Haemoproteus</i>		EF153647	Chile
<i>Haemoproteus</i>		KC121053	Australia
<i>Haemoproteus</i>		FJ462651	Ecuador
<i>Haemoproteus</i>		KM211352	Colombia
<i>Haemoproteus</i>		DQ241546	Uruguay
<i>Haemoproteus</i>		DQ241542	Guyana
<i>Haemoproteus</i>		KM211351	Colombia
<i>Haemoproteus</i>		DQ241544	Uruguay
<i>Haemoproteus</i>		KF482360	Perú
<i>Haemoproteus</i>		KF482354	Perú
<i>Haemoproteus</i>		KF482345	Perú
<i>Haemoproteus</i>		EF153650	Chile
<i>Haemoproteus</i>		EF153654	Chile
<i>Haemoproteus</i>		EF153653	Chile
<i>Haemoproteus</i>		DQ241541	Guyana
<i>Haemoproteus</i>		KF482344	Perú
<i>Haemoproteus</i>		KF482350	Perú

Género	Especie	Acceso	Localidad
Haemoproteus		KF537329	Colombia
<i>Plasmodium</i>	<i>elongatum</i>	KU057965	Brasil
<i>Plasmodium</i>	<i>juxtannucleare</i>	DQ017964	Sur América
<i>Plasmodium</i>	<i>lutzi</i>	KF537310	Colombia
<i>Plasmodium</i>	<i>relictum</i>	HM031937	Brasil
<i>Plasmodium</i>		DQ241515	Guyana
<i>Plasmodium</i>		DQ241525	Uruguay
<i>Plasmodium</i>		DQ241529	Uruguay
<i>Plasmodium</i>		EF153640	Chile
<i>Plasmodium</i>		EF153641	Chile
<i>Plasmodium</i>		HM146903	Perú
<i>Plasmodium</i>		JX021451	Brasil
<i>Plasmodium</i>		JX021452	Brasil
<i>Plasmodium</i>		JX021469	Brasil
<i>Plasmodium</i>		JX021471	Brasil
<i>Plasmodium</i>		JX021496	Brasil
<i>Plasmodium</i>		JX021497	Brasil
<i>Plasmodium</i>		JX029863	Brasil
<i>Plasmodium</i>		JX029866	Brasil
<i>Plasmodium</i>		JX029880	Brasil
<i>Plasmodium</i>		JX029884	Brasil
<i>Plasmodium</i>		JX029895	Brasil
<i>Plasmodium</i>		JX029899	Brasil
<i>Plasmodium</i>		KC867672	Ecuador
<i>Plasmodium</i>		KF482348	Perú
<i>Plasmodium</i>		KF482353	Perú
<i>Plasmodium</i>		KF482357	Perú
<i>Plasmodium</i>		KF537316	Colombia
<i>Plasmodium</i>		KF537328	Colombia
<i>Plasmodium</i>		KT373869	Ecuador
<i>Plasmodium</i>		KT373873	Ecuador
<i>Plasmodium</i>		AF465555	Sur América
<i>Plasmodium</i>		DQ241537	Guyana
<i>Plasmodium</i>		JX021492	Brasil
<i>Plasmodium</i>		JX021493	Brasil
<i>Plasmodium</i>		JX029894	Brasil
<i>Plasmodium</i>		KF482349	Perú
<i>Plasmodium</i>		KU057966	Brasil

Género	Especie	Acceso	Localidad
<i>Plasmodium</i>	<i>tejerai</i>	JX272844	Brasil
<i>Plasmodium</i>	<i>unalis</i>	KC771248	Colombia
<i>Plasmodium</i>		JQ764622	Venezuela
<i>Plasmodium</i>		JQ764621	Venezuela
<i>Plasmodium</i>		JQ764620	Venezuela

Anexo 4: Tabla de localidad de las morfo-especies reportadas

Especie	Acceso	Localidad
<i>H. tartakovskyi</i>	GU289671	Italia
<i>H. enucleator</i>	DQ659592	Hawái
<i>P. parahexamerium</i>	FJ389155	Camerún
<i>P. globularis</i>	EU770151	Ghana
<i>H. vacuolatus</i>	EU770153	Ghana
<i>P. multivacuolaris</i>	FJ389157	Camerún
<i>H. coatneyi</i>	KF537327	Colombia
<i>H. belopolskyi</i>	KJ627801	Rusia
<i>P. homopolare</i>	KF537294	Colombia
<i>H. sanguinis</i>	EU254651	Israel
<i>H. fringillae</i>	EU254658	EEUU
<i>H. majoris</i>	DQ060765	Suecia
<i>H. magnus</i>	DQ451426	Israel
<i>H. noctuae</i>	KP794612	Rusia
<i>H. danilewskii</i>	DQ451411	Israel
<i>H. multipigmentatus</i>	GU296227	Ecuador
<i>H. columbae</i>	EU254553	EEUU
<i>H. pallidus</i>	DQ060766	Bulgaria
<i>H. balmorali</i>	DQ067581	República Checa
<i>H. paramultipigmentatus</i>	FJ462657	Ecuador
<i>H. columbae</i>	EU254553	EEUU
<i>H. jenniae</i>	JN827318	Ecuador
<i>H. syrnii</i>	KF192997	Alemania
<i>H. cyanomitrae</i>	EU810741	Camerún
<i>P. lucens</i>	FJ404707	Camerún
<i>H. hirundinis</i>	KJ499183	Bulgaria
<i>H. macrovacuolatus</i>	KJ175078	Colombia
<i>P. lutzi</i>	KF537310	Colombia
<i>H. valkiunasi</i>	GQ404559	Indonesia
<i>H. iwa</i>	JF833050	Ecuador
<i>P. gallinaceum</i>	AY099029	Vietnam
<i>P. juxtannucleare</i>	AB250415	Vietnam
<i>H. sylvae</i>	AF254964	Suecia
<i>P. ashfordi</i>	AF254962	Bulgaria
<i>P. relictum</i>	AF254975	Bulgaria
<i>P. elongatum</i>	DQ368381	EEUU
<i>H. concavocentralis</i>	GQ396708	Bulgaria

Especie	Acceso	Localidad
<i>H. pastoris</i>	EU810728	Gabón
<i>H. paranucleophilus</i>	HQ386242	Uganda
<i>H. nucleofascialis</i>	HQ386243	Uganda
<i>H. ptilotis</i>	KP721986	Australia
<i>H. sacharovi</i>	JX073258	EEUU
<i>H. passeris</i>	AF254969	África
<i>P. rouxi</i>	HM146901	Asia
<i>H. homovelans</i>	GU085195	Bulgaria
<i>H. thraupi</i>	AF465583	Antillas menores
<i>H. homobelopolskyi</i>	HQ386240	Uganda
<i>H. micronuclearis</i>	HQ386237	Uganda
<i>P. megaglobularis</i>	DQ847268	Australia
<i>H. lanii</i>	DQ060768	Bulgaria
<i>H. attenuatus</i>	AY393807	Suecia
<i>H. multivolutinus</i>	JX275888	México
<i>P. cathemerium</i>	DQ838988	Hawái
<i>P. tejerai</i>	JX272844	Brasil
<i>H. ilanpapernai</i>	DQ451424	Singapur
<i>H. turtur</i>	DQ451425	Israel
<i>P. homonucleophilum</i>	AF495572	Nigeria
<i>P. vaghani</i>	DQ847271	Brasil
<i>H. paruli</i>	AF465563	Camerún
<i>P. unalis</i>	KC771248	Colombia
<i>H. witti</i>	KF767420	Perú
<i>H. minutus</i>	EU676190	Rusia
<i>Para. vireonis</i>	FJ168561	Asia
<i>H. motacillae</i>	AF495579	Nigeria
<i>P. homocircumflexum</i>	DQ368374	Europa
<i>P. novyella</i>	EF011170	EEUU

Anexo 5: Tabla resumen de cebadores utilizados

Cebadores	¿Qué amplifica?	pb	Autores
Cytb V (Citocromo b)	Subunidad principal de complejos b6f y bc1 (C.R)	359	Steuber y col. 2005
Haem (Citocromo b)	Subunidad principal de complejos b6f y bc1 (C.R)	617	Hellgren y col. 2004
Cytb (Citocromo b)	Subunidad principal de complejos b6f y bc1 (C.R)	607	Martinsen y col. 2008
CoI (Citocromo C oxidasa I)	Última enzima de la cadena transportadora de electrones (C.R)	998	Martinsen y col. 2008
CSP (Circumsporozoito)	Proteína de superficie (Regula el desarrollo)	990	Pacheco y col. 2013