

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA  
FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA “ALBERTO CAZORLA TALLERÍ”



Factores que afectan la prevalencia de parásitos hemosporidios en una población silvestre del gorrión de collar rufo, *Zonotrichia capensis*.

David Alfonso Chang van Oordt, B.Sc.

Tesis para optar el título de  
Licenciado en Biología

Asesora: Katya Balta Abadie

Lima, Perú

2017

*Para A Ma  
Que estuvo orgullosa de mí  
hasta el final*

## TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN .....	4
ABSTRACT.....	5
INTRODUCCIÓN .....	6
MARCO TEÓRICO.....	7
OBJETIVOS .....	14
HIPÓTESIS.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS .....	15
RESULTADOS.....	21
DISCUSIÓN .....	34
CONCLUSIÓN.....	41
REFERENCIAS.....	43
ANEXOS .....	51

## RESUMEN

Los hemosporidios son un grupo de protozoarios parasitarios ampliamente prevalentes en vertebrados, y un objeto de estudio recurrente en aves debido a su amplia presencia en los ecosistemas del mundo. Estudiar el rol que cumplen estos organismos sobre poblaciones de aves silvestres es un paso crucial para comprender los mecanismos de un ecosistema. Este trabajo analiza el efecto de variables intrínsecas y extrínsecas de una población del gorrión de collar rufo, *Zonotrichia capensis*, sobre la prevalencia de parásitos del género *Plasmodium* y *Haemoproteus* en Lomas de Lachay. Se evaluó la presencia de endoparásitos sanguíneos mediante microscopía y detección por PCR. Se estudió su asociación con el sexo, la temporada, la presencia de ectoparásitos y la masa corporal. La longitud del ala tuvo el mayor efecto sobre la prevalencia de gorriones indicando una posible relación entre el movimiento de hospederos y la infección. También, se encontró un efecto significativo de la estación y la interacción entre la estación y la presencia de ectoparásitos indicando una posible relación entre la emergencia de vectores, y los efectos de distintos estresores sobre la prevalencia de hemosporidios. El estrés generado por condiciones ambientales debe tener un papel importante en la dinámica hospedero-parásito de aves y hemosporidios. Otras variables intrínsecas como tamaño corporal o sexo no tuvieron ningún papel sobre la prevalencia indicando que podría ser dependiente de variables externas a los gorriones. Es necesario aclarar el papel de los estresores y otras variables extrínsecas a las aves sobre la prevalencia porque esta información será importante para asegurar la conservación de poblaciones silvestres saludables.

Palabras clave: Hemosporidios, prevalencia, *Zonotrichia capensis*, estación, sexo

## ABSTRACT

Haemosporidians are a group of protozoan parasites widely prevalent in vertebrates, and a recurring object of study in birds because of its widespread presence in the world's ecosystems. Studying the role that these organisms play on wild bird populations is a crucial step to understanding the mechanisms of an ecosystem. This project analyses the effect of intrinsic and extrinsic variables of a population of rufous-collared sparrows, *Zonotrichia capensis*, on the prevalence of *Plasmodium* and *Haemoproteus* parasites in Lomas de Lachay. I evaluated the presence of blood parasites through microscopy and PCR detection, in relation to sex, season, presence of ectoparasites and body mass. Wing length had the strongest effect on parasite prevalence indicating a possible relationship between bird movement and infection. I also found a significant effect of the season and the interaction between season and ectoparasitism. Increased seasonal exposure has different effects on the prevalence of Haemosporidia in healthy birds compared to unhealthy ones. Elevated disease exposure generated through environmental conditions plays an important role in host-parasite interaction between birds and Haemosporidia. Other intrinsic variables such as body mass and sex had no effect on prevalence, which might suggest that external factors acting on the sparrows might be more important for infection. It is necessary to further understand the possible role of stressors and other external variables that act on haemoparasite prevalence on birds because this information will be important for the conservation of healthy wildlife populations.

Keywords: Haemosporidia, prevalence, *Zonotrichia capensis*, season, sex

## INTRODUCCIÓN

Las interacciones hospedero-parásito han sido ampliamente aceptadas como elementos cruciales de los ecosistemas al jugar un papel importante sobre los procesos ecológicos (1) y sobre la evolución (2). Aunque menos estudiadas, la importancia de entender las relaciones entre los hospederos y los parásitos en estas interacciones antagónicas se ha hecho clara en tiempos donde pasamos por rápidos cambios ambientales y ecosistémicos (3–5).

La transformación de paisajes, tal como la urbanización o el avance de la frontera agrícolas, implica cambios en las comunidades y en el comportamiento de vertebrados que puede influenciar los patrones de transmisión y/o prevalencia de especies parasitarias (e.g. en el caso urbano: Delgado & French 2012 (6)). De la misma manera, cambios en las comunidades ecológicas gracias a las actividades humanas puede tener efectos devastadores sobre las poblaciones nativas por el ingreso de parásitos exóticos como lo fue el ingreso de malaria aviar a Hawai'i E.E.U.U. (7,8), o el ingreso del Virus del Nilo Occidental a E.E.U.U. en 1999 (9).

Las poblaciones de fauna silvestre se encuentran permanentemente expuestas a parásitos infecciosos que se han integrado efectivamente dentro de los ecosistemas. En muchos casos, estas poblaciones funcionan como reservorios para diversos organismos parasitarios que pueden, o no, generar patologías en las especies que infectan. La malaria aviar, por ejemplo, es una enfermedad prevalente en poblaciones domésticas y silvestres de aves en todo el mundo.

Con los cambios en la conectividad entre algunos ecosistemas y la inminente amenaza del cambio climático sobre la prevalencia de malaria y otros parásitos similares (10), es necesario entender las características ambientales o intrínsecas de las especies que puedan estar condicionando la transmisión de parásitos sanguíneos. En base a la historia conocida sobre parásitos invasores, es importante comprender estas condicionantes para prever o prevenir la pérdida de especies por enfermedades.

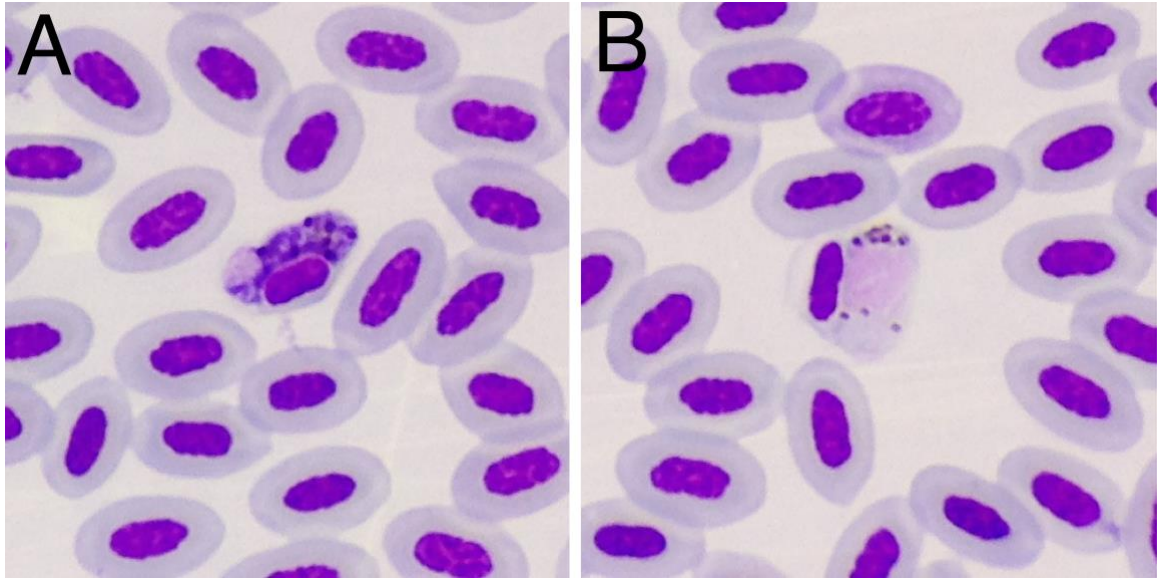
Por este motivo, el siguiente trabajo estudia qué factores pueden afectar la prevalencia de parásitos hemosporidios en una población silvestre de aves de lomas costeras. Esto permitirá conocer qué factores promueven o reducen la prevalencia de parásitos hemosporidios en condiciones naturales.

## MARCO TEÓRICO

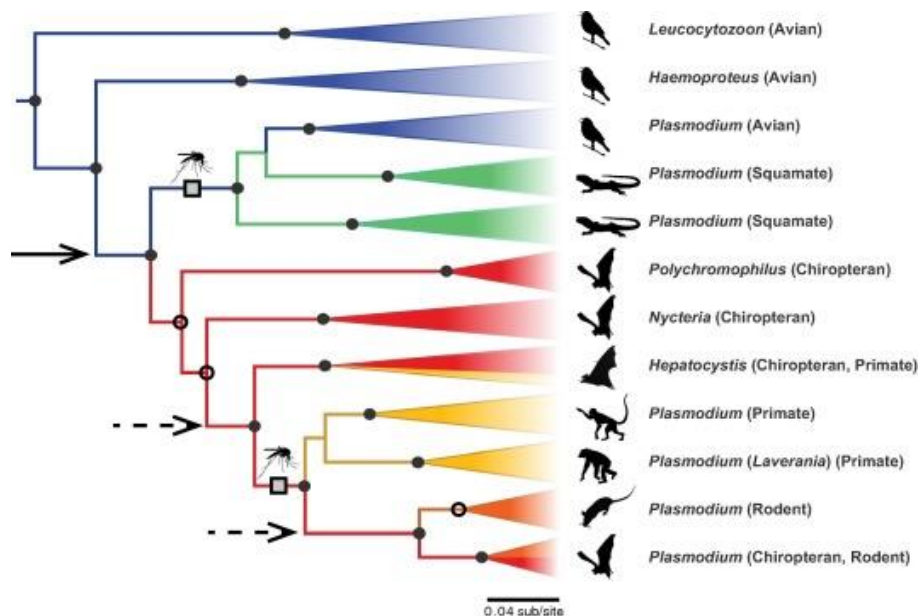
La malaria aviar es generada por protozoarios del género *Plasmodium* (Clase: Apicomplexa, Subclase: Haemosporidia) (Figura 1B). Más de 40 especies de *Plasmodium* conocidas parasitan aves, en especial del Orden Passeriformes (11). El género *Plasmodium* es transmitido por mosquitos de al menos 26 especies en 4 géneros (*Culex*, *Aedes*, *Anopheles* y *Culiseta*) que le permite tener una distribución global y espacialmente heterogénea (11). *Plasmodium* tiene una fase haploide dentro de los organismos hospederos donde se multiplica en los eritrocitos o en tejido hepático. Los gametocitos son liberados en el torrente sanguíneo donde esperan pasar al vector. Una vez que ingresan al vector mediante una picadura de mosquito, el parásito pasa por una fase de reproducción sexual dentro del sistema digestivo. El cigoto resultante puede atravesar el tejido del sistema digestivo y se divide en esporozoitos que migran a las glándulas salivales del vector para infectar a un nuevo hospedero (11).

El género *Haemoproteus* (Figura 1A) es un protozoario de la misma clase y subclase del género *Plasmodium* que puede infectar aves, reptiles y mamíferos (12,13). Ambos géneros, además del género *Leucocytozoon*, se encuentran dentro de los patógenos causantes de la malaria aviar. Se han podido identificar mediante microscopía cerca de 130 especies de *Haemoproteus* que infectan aves pero la información en base a secuencias de ADN mitocondrial han mostrado aún mayor diversidad entre estos parásitos y *Plasmodium* (14). *Haemoproteus* tiene un ciclo de vida similar al de *Plasmodium* pero puede utilizar una mayor variedad de vectores lo cual le ha permitido ser el parásito sanguíneo más común encontrado en aves (15). De esta manera, *Haemoproteus* es transmitido por moscas chatas (Diptera: Hippoboscidae), chinches chupadoras como el género *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) (15) y tábanos (Diptera: Tabanidae) (16).

Los hemosporidios aviares se encuentran en la base del árbol filogenético de la malaria (17). Estos parásitos pueden infectar una gran variedad de vertebrados entre aves, reptiles, murciélagos, roedores y primates. Como interacción basal, la infección de hospederos aviares tiene una larga historia co-evolutiva, y es ancestral a las infecciones que vemos en humanos por *P. falciparum* y *P. vivax* (Figura 2).



**Figura 1.** Gametocitos de *Haemoproteus erythrogravidus* (A), y de *Plasmodium* sp. (B) en una muestra de sangre de *Zonotrichia capensis* teñida en Giemsa al 10% observados a 1000X de magnificación. Los gametocitos (en el centro) crecen dentro de los glóbulos rojos que son las estructuras nucleadas en las imágenes.



**Figura 2.** Árbol filogenético de los parásitos hemosporidios mostrando los grupos de hospederos. Las aves (en azul) son el grupo basal de los parásitos de malaria. La malaria humana “*Plasmodium* (Primates)” se encuentra en amarillo. La transmisión por mosquitos apareció dos veces en la historia evolutiva de este grupo: para *Plasmodium* en aves y squamátidos, y en *Plasmodium* que infecta quirópteros, roedores y primates. Imagen obtenida de Lutz *et al.* 2016 (17)

Se sabe muy poco de la patogenicidad de la malaria aviar o de los otros parásitos hemosporidios. Se presume que hay diferencias en la virulencia dependiendo de la especie y linaje del hemoparásito, así como la historia evolutiva del vector, el hospedero y el protozoario (18–20). En poblaciones domésticas se ha visto que brotes de malaria generados por *Haemoproteus lophortyx* causa aletargamiento, anemia y muerte en perdices (21). Estos síntomas estarían relacionados a episodios de infección aguda que son más comunes cuando la infección se da entre especies con una corta interacción co-evolutiva. Esto es especialmente común en poblaciones nativas aisladas como las que habitan en islas alejadas de continentes (7). Mientras que en poblaciones silvestres donde hay menos hacinamiento, las infecciones con *Haemoproteus majoris* y *Leucocytozoon majoris* han mostrado también ser patógenas y reducir ligeramente el desempeño de individuos de *Parus caeruleus* (22).

El efecto más directo y evidente sobre poblaciones silvestres parece encontrarse sobre el éxito reproductivo. Un estudio sobre el carricero tordal (*Acrocephalus arundinaceus*, Passeriformes: Acrocephalidae) encontró que la infección crónica de parásitos hemosporidios afecta ligeramente rasgos de la historia de vida de las hembras, reduciendo el éxito reproductivo mientras mayor sea la intensidad de la infección (23). En otros estudios en Europa, se ha reportado una compensación entre la capacidad inmune y el éxito reproductivo, resultando en parasitemias más intensas y elevación de la prevalencia con el esfuerzo reproductivo (24–26). Consecuentemente, en *Cyanistes caeruleus* (Passeriformes: Paridae) se encontró que individuos medicados para infecciones crónicas de hemosporidios tenían mejor desempeño reproductivo que individuos sin medicar (27). Estudios recientes, además, han encontrado que las infecciones crónicas de malaria aviar aceleran el acortamiento de los telómeros (28,29). En consecuencia, probablemente los individuos infectados envejecen más rápido, y por tanto, reducen su éxito reproductivo total.

La disparidad entre los efectos de infecciones crónicas y agudas, y la persistencia de los parásitos en condiciones silvestres ha permitido que estas interacciones se conviertan en modelos de estudio de co-evolución entre hospederos y parásitos. Interacciones naturales pueden ser elementos importantes en los ecosistemas y parte de los mecanismos de supervivencia de ambas especies incluso hasta ser beneficiosas (30). Sin embargo, el contacto entre hemosporidios exóticos con fauna silvestre nativa ha mostrado tener efectos

devastadores. El caso emblemático de los efectos de hemosporidios invasores es el de las islas de Hawaii, EE.UU. donde se extinguieron varias especies endémicas. La pérdida se debió a la introducción del vector *Culex quinquefasciatus* en 1826 que estableció el contacto entre aves endémicas y hemosporidios (*Plasmodium relictum* y *Haemoproteus* spp.) que llegaban con las aves playeras migratorias (7,31).

Existen muchos reportes de malaria aviar en poblaciones silvestres de aves en América del Sur: como Brasil (32), Colombia (33,34), Venezuela (35), Ecuador (13,36–38), Chile (39), y Argentina (40). En el caso de Perú, sin embargo; son pocos los reportes de parásitos palúdicos en la fauna nativa porque han sido escasamente estudiados. Marzal *et al.* (2014) (41) reportan infecciones de hemosporidios en 8 especies de aves distribuidas en 2 órdenes en humedales costeros y ecosistemas andinos, Smith & Ramey (2015) estudiaron la prevalencia en especies de la familia Anatidae en Perú y Argentina (40), Galen & Witt (2014) estudiaron la diversidad linajes de malaria aviar en *Troglodytes aedon* alrededor del Perú (42), y Sallaberry-Pincheira *et al.* (2015) (43) reportan la detección de *Haemoproteus* en pingüinos de Humboldt en Ica, Perú. Los reportes de otros países sudamericanos incluyen especies que también ocurren en ecosistemas tropicales del territorio peruano (33,38). Marzal *et al.* (41) cubre humedales costeros y andinos, y existen también registros de *Plasmodium* spp. y *Haemoproteus* spp. en lomas costeras (Balta *et al.*, *datos sin publicar*), para complementar otros ambientes de alta diversidad en el desierto del Perú. Por tanto, es evidente que los reportes de Hemosporidia en el Perú son pocos e insuficientes para entender la prevalencia y distribución del parásito dentro del país. Sin embargo, los reportes que ya existen, además de los estudios en países adyacentes, muestran que los parásitos hemosporidios se encuentran en varios ecosistemas del país y que pueden estar ampliamente distribuidos.

Los hemosporidios han demostrado ser capaces de infectar una gran diversidad de taxa y suponer una importante amenaza para la fauna nativa en otras partes del mundo (8). Marzal *et al.* (41) ha identificado *Plasmodium relictum* en aves residentes del Perú y un posible linaje invasor, pSGS1 que está registrado en Europa pero no había sido identificado antes en las Américas (41,44). Como linaje invasor, existe la posibilidad de una amenaza para las poblaciones de aves nativas, especialmente por sus rasgos generalistas durante la transmisión. Si bien las aves en territorio peruano no presentan la misma vulnerabilidad por ser especies continentales, la alta tasa de endemismo de los Andes tropicales hace más vulnerable a muchas especies residentes.

Las amenazas sobre la biodiversidad por causa de parásitos no se limitan a la introducción de especies exóticas. Se especula que el cambio climático va a jugar un rol muy importante sobre la prevalencia de hemosporidios y enfermedades de vida silvestre debido a las modificaciones de los patrones de distribución de aves y vectores (45). En el caso particular de hemosporidios, se espera que el traslado hacia mayores altitudes de las isothermas de 13° C (sobre la cual no ocurre malaria) y de 17° C (bajo la cual la malaria es altamente prevalente y de alto riesgo) pondrá en contacto a especies de aves que no tienen resistencia a determinadas especies y/o linajes de hemosporidios (46). Del mismo modo, los cambios en patrones de precipitación por consecuencia del cambio climático pueden tener un efecto importante sobre la prevalencia de parásitos sanguíneos porque se ha encontrado que la precipitación y la temperatura tienen influencia sobre ella (47).

A pesar de la amenaza del cambio climático y los riesgos sobre la biodiversidad, se sabe muy poco sobre qué modula la prevalencia en poblaciones silvestres. En zonas templadas, se ha encontrado que la prevalencia cambia de acuerdo a las estaciones en base a los patrones de precipitación que hacen a los vectores más abundantes (48–50). Pero, la información es aún escasa en zonas tropicales. Uno de los pocos estudios analizados no encontró los mismos efectos de la estacionalidad sobre la prevalencia en el neotrópico, pero sí de la edad de las aves (51). En términos generales, las infecciones de malaria y parásitos hemosporidios son altamente dinámicas y la prevalencia es variable dependiendo de variables extrínsecas e intrínsecas: desde factores ambientales como precipitación hasta el sistema inmunológico e historia evolutiva de las aves infectadas (52).

El sistema inmune de las aves podría estar influenciado por las condiciones en que viven. Condiciones de estrés, como las que ocurren durante la época reproductiva o la muda, donde existe un alto uso de energía y recursos, han mostrado aumentar la prevalencia de parásitos hemosporidios (52). El nivel y tipo de efecto que tenga dependerá de la naturaleza del estresor (53,54) y puede verse reflejado de diversas maneras como mala condición corporal, reducida masa corporal, o presencia de ectoparásitos. A pesar de eso, generalmente los individuos estresados son más susceptibles a la infección de parásitos (55,56). Por un lado, condiciones estresantes pueden generar inmunodepresión, cambios en la regulación hormonal, o cambios en el comportamiento a través de mecanismos epigenéticos (57–59) y/o afectar la expresión de genes (60) de modo que influyeran la susceptibilidad de los organismos a ser parasitados.

En condiciones de estrés relacionado a la perturbación por factores externos como altas tasas de depredación, conversión de hábitat o condiciones ambientales sub-óptimas, la prevalencia de enfermedades de vida silvestre puede verse también afectada, porque estas condiciones involucran obstáculos adicionales a la supervivencia. Bajo estrés crónico, el gasto sería permanente con una influencia directa sobre la inmunidad y otros aspectos de la historia natural de las aves.

Diversas condiciones de adversidad y estrés han mostrado tener un efecto sobre modificaciones epigenéticas en el genoma de los organismos. El epigenoma cambia dinámicamente e influye sobre la plasticidad ontogénica. La asimilación de las modificaciones en el genoma contribuyen a procesos a la evolución de las especies (61,62). En humanos, se han encontrado cambios en los patrones de metilación de adolescentes relacionado a condiciones de adversidad en etapas tempranas del desarrollo (63). De la misma manera, fetos expuestos a elevadas concentraciones intrauterinas de contaminantes han mostrado genomas hipometilados (64). En otros animales, por otro lado, se ha visto cambios en los niveles de metilación global en el cerebro de ratas tras exposición a condiciones de estrés agudo (60). Estudios sobre el gen NR3C1 del receptor de glucocorticoides (GR) han encontrado, también, cambios en los patrones de metilación en las islas CpG del promotor por efecto de diferentes condiciones de estrés, tanto en humanos como en ratas (59). El GR cumple una función crucial en la regulación de la respuesta al estrés por la vía hipotálamo-pituitaria-adrenal (65–67). Los cambios epigenéticos son producto de la interacción de los individuos con su ambiente, en consecuencia; pueden dar mayor información de los mecanismos que permiten a las especies adaptarse o sobrevivir en condiciones extremas o inferiores a su nicho óptimo (68).

En base a esto, la vía epigenética puede ser una ruta para la adaptación local a las prevalencia e infecciones crónicas de parásitos internos. Por este motivo es un mecanismo prometedor para ser investigado como indicador de estrés y de adaptaciones en poblaciones silvestres para combatir epidemias y asegurar su supervivencia en condiciones sub-óptimas o adversas.

Los modelos más comunes para estudiar malaria aviar y otros parásitos hemsporidios han sido, también, en aves de zonas templadas. Las especies de aves que se han usado como modelos han sido aves abundantes como el carbonero común *Parus major* o el herrerillo común *Cyanistes caeruleus* (Passeriformes: Paridae)

(24,25,50,52,69–71), o en aves vulnerables y recientemente infectadas como los Amakihi e Iiwis hawaianos (*Chlorodrepanis virens* y *Drepanis coccinea*; Passeriformes: Drepanidinae) (8,72). Para estudiar patrones de prevalencia y la evolución de la misma en poblaciones silvestres, es recomendable utilizar especies que sean cosmopolitas y abundantes en sus distribuciones nativas.

*Zonotrichia capensis* (Passeriformes: Emberizidae) es una especie de gorrión neotropical y austral que está ampliamente distribuida desde Centro América hasta el sur de Chile y Argentina por toda América del Sur excepto en el centro Amazónico. Con muchas subespecies, *Z. capensis* es una de las aves mejor distribuidas del neotrópico, convirtiéndola en un buen modelo para estudiar los efectos de las variaciones ambientales sobre sus poblaciones y subespecies. Su capacidad de ser abundante en un gran número de ecosistemas sudamericanos advierte que debe tener una amplia capacidad de adaptación y respuesta. Existen reportes de infecciones de malaria aviar para *Z. capensis* en el Perú a lo largo de los Andes occidentales (73) y en otros lugares de Sudamérica (34). Como especie nativa y abundante, es un modelo útil para entender cómo diferentes factores pueden afectar las tasas de prevalencia de endoparásitos y enfermedades infecciosas de vida silvestre.

## OBJETIVOS

El principal objetivo de este estudio es **entender qué factores pueden afectar la prevalencia de parásitos sanguíneos en una población infectada**. Para eso se han planteado 5 objetivos específicos:

1. Determinar la prevalencia de parásitos del género *Plasmodium* y *Haemoproteus* en una población de gorriones.
2. Determinar la prevalencia de hemosporidios entre aves parasitadas y no parasitadas con ectoparásitos.
3. Determinar la prevalencia de hemosporidios en la temporada seca y la temporada húmeda del ambiente donde viven.
4. Describir el efecto de la condición corporal del individuo sobre la presencia o ausencia de hemosporidios.
5. Encontrar la relación del estrés crónico con la prevalencia de parásitos hemosporidios en una población de gorriones.

## HIPÓTESIS

Se espera que las variables estudiadas tengan los siguientes efectos en una población silvestre de *Z. capensis*:

1. Entre 20% a 50% de los gorriones presentarán infecciones de *Haemoproteus* o *Plasmodium* sp.
2. Individuos con ectoparásitos presentan una mayor prevalencia de hemosporidios que individuos que no están parasitados.
3. La estación húmeda eleva la prevalencia de hemosporidios en una población silvestre con respecto a la temporada seca.
4. Individuos adultos de mejor condición corporal presentan una menor prevalencia de hemosporidios que individuos en peor condición corporal.
5. Individuos con genoma hipometilado como señal de estrés crónico mostrarían una mayor infección que individuos con mayor tasa de metilación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Área de estudio*

El trabajo se realizó en la Reserva Nacional de Lachay (RNL, Lon. 12.04° S, Lat. 77.03° O), un área natural protegida que se encuentra sobre las Lomas de Lachay. Las lomas son formaciones del desierto costero del Perú caracterizadas por su alta humedad y rápida tasa de crecimiento de vegetación durante el invierno austral. Estas formaciones, sus patrones meteorológicos y su vegetación, ya han sido descritas con detalle por Rundel et al. (1991) (74) y Rundel et al. (2007) (75). Las lomas están dominadas por plantas anuales que crecen durante la época húmeda entre mayo y octubre, y mueren durante la época seca entre noviembre y abril. Durante la época húmeda, la neblina que cubre las lomas son la única fuente de agua que permite la germinación vegetal. Durante la estación seca, la falta de neblina y las altas temperaturas secan la superficie y agotan toda fuente de agua.

### *Toma de muestras*

Se capturaron 145 individuos de *Z. capensis* en la Quebrada Lechuzas de la RNL por medio de redes de neblina entre enero 2013 y agosto 2014. Las redes de neblina son mallas de nylon de 3m de alto x 12m que son dispuestas verticalmente en lugares estratégicos donde pasen aves al vuelo. Las aves chocan con la red de neblina y caen dentro de los bolsones de la red al cruzarse con ella durante el vuelo, y se enredan hasta que sean retiradas por el investigador que las revisa las redes en intervalos de una hora. Las redes se abrieron entre las 05:30h y las 16:00h con un total de 367 horas-red. Los individuos de *Zonotrichia capensis* capturados fueron pesados con pesolas análogas de 30g ( $\pm 0.25$ g), se tomaron medidas morfométricas con un vernier análogo ( $\pm 0.1$ mm), se evaluó la presencia de ectoparásitos, la edad (adulto o juvenil), y se tomaron muestras sanguíneas. Las medidas de longitud de pico, cabeza-pico, tarso y longitud alar se tomaron según Sutherland et al. 2004 (76). Los individuos de otras especies fueron liberados sin tomar datos o muestras.

Se tomaron muestras de 10 a 20  $\mu$ l de sangre mediante una punción de la vena ulnar del ala izquierda del individuo usando una aguja hipodérmica 25G. Una gota de sangre fue recogida mediante un capilar hipodérmico heparinizado y se transfirió a una lámina portaobjetos para hacer frotises. Se realizaron por lo menos dos por cada

individuo. Los frotises se secaron al aire y se fijaron con etanol 96%. Otra gota de sangre producto de la punción se recogió con un capilar sin anticoagulantes y se guardó en un microtubo con alcohol 96% a temperatura ambiente. Al finalizar el proceso, los animales fueron anillados con bandas de plástico o de aluminio individuales y fueron liberados de vuelta en el lugar de captura. Los anillos de plástico individualizados permiten identificar individuos recapturados en capturas posteriores, así como los anillos de colores permiten identificar a los gorriones en otras ocasiones a través de observaciones. Estas medidas permitieron evitar duplicados en la toma de muestras, así como monitorear la supervivencia de los gorriones capturados.

La captura y toma de muestras de animales fue aprobada por el Comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia bajo la constancia 078-07-17 para el proyecto no. 66497 (ANEXO I).

#### *Detección de parásitos sanguíneos por microscopía*

Los frotises de sangre se evaluaron siguiendo el método de Merino et al. (1997) (77) con modificaciones. Se tiñeron usando Giemsa 10% v/v durante 20 minutos. Se eligió un frotis por individuo en base a la homogeneidad, tamaño y calidad de la tinción del mismo para hacer el análisis. Se contaron el número de eritrocitos en cada campo a 1000X de magnificación (aproximadamente 210 eritrocitos por campo) para determinar el número de campos totales a evaluar. Por cada frotis, se evaluaron 10 campos a 1000X de magnificación con aceite de inmersión en muestras positivas (~2000 eritrocitos evaluados). Si no se encontraban endoparásitos dentro de los primeros 10 campos, se evaluaron 50 campos (~10000 eritrocitos) a 1000X de magnificación con aceite de inmersión para corroborar la ausencia de *Plasmodium* o *Haemoproteus*. Según Merino et al. (1997) (77) no hay diferencia significativa en la intensidad de la infección si se evalúan 2000 (10 campos) ó 10000 (50 campos) eritrocitos en un frotis.

#### *Determinación de la condición corporal*

Para evaluar el efecto de la condición corporal, se analizó la relación de las variables morfométricas de longitud de pico, cabeza-pico, ala y tarso con la masa corporal para poder utilizarlas como indicadores de condición. Se realizaron regresiones lineales simples entre la masa y las medidas en busca de correlaciones estadísticamente significativas. Se tomó la medida que muestre una correlación con la masa, para usar el modelo como referencia. Individuos en mejor condición corporal

serían los que se encuentren por encima de esta referencia, y viceversa para individuos en peor condición. Posteriormente, se tomaron tres formas de indicador de condición corporal: la masa corporal, el cociente de la masa entre la medida elegida, y los residuos de la regresión entre la masa y la medida elegida.

#### *Extracción de ADN*

Las muestras de sangre coagulada se purificaron por medio de un protocolo de fenol-cloroformo (78). La sangre se lisó en 200 $\mu$ L de buffer de lisis, 180 $\mu$ L de SDS 10% y 20 $\mu$ L de Proteinasa K, y se dejó incubar por 1 semana a 55°C. Las proteínas de la muestra se eliminaron usando un volumen de fenol-cloroformo. El ADN se precipitó añadiendo 0.1 volúmenes de Acetato de Sodio (3M, pH 5.2) y 2 veces el volumen de alcohol 96%; agitando, dejando reposar por 1h a -20°C y centrifugando por 15 minutos. Después de la centrifugación, se removió el sobrenadante y se re-suspendió en alcohol 70%. Se centrifugó brevemente y se decantó el sobrenadante. La muestra de ADN resultante se dejó a secar en un horno a 55°C. Finalmente, se re-suspendió la muestra en agua y se almacenó a -20°C.

#### *Detección molecular de parásitos sanguíneos*

Con 45 muestras de la temporada de muestreo de 2014 se evaluó la presencia de parásitos de malaria aviar *Plasmodium* sp. y *Haemoproteus* sp. por medio de un PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa, por sus siglas en inglés) para poner a prueba la sensibilidad de la detección por microscopía y la detección molecular. Se utilizó el protocolo de Bensch et al. (69) que utiliza los cebadores HAEMF (5'-ATGGTGCTTTCGATATATGCATG-3') y HAEMR2 (5'-GCATTATCTGCATG-TGATAATGGT-3') que amplifican una secuencia de 525bp del gen mitocondrial de citocromo (*cyt*) b. El PCR se realizó en una reacción de 10 $\mu$ l que contenía 80 nanogramos (ng) de ADN de la muestra, 0.4 unidades de REDTaq® (Sigma-Aldrich), 1X REDTaq® PCR Reaction Buffer (Sigma-Aldrich, 10mM Tris-HCl, 50mM KCl, ajustado a 1.5mM MgCl<sub>2</sub>), 0.6 $\mu$ M de los cebadores y 0.5mM de dNTPs. Para descartar falsos negativos debido a baja concentración de ADN (en caso de que la infección haya sido demasiado pequeña), se repitieron los PCRs de los individuos cuyas muestras resultaron negativas usando una mayor concentración de ADN.

### *Determinación del sexo*

Se determinó el sexo de los individuos mediante un PCR usando los cebadores P2 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3') y P8 (5'-CTCCCAAGGATGAGRAAY-TG-3') que amplifica secuencias repetitivas de un intrón del gen de la helicasa con cromodominio de unión a ADN (Chromodomain Helicase DNA-binding protein, CHD) de los cromosomas sexuales Z y W de las aves (79,80). El PCR se realizó, a partir de una modificación del protocolo de Griffiths et al. (1998) (80) en una reacción de 10µl compuesta de 0.5 unidades de REDTaq® DNA Polymerase (Sigma-Aldrich), 1X REDTaq® PCR Buffer (Sigma-Aldrich, 10mM Tris-HCl, 50mM KCl, ajustado a 1.5mM MgCl<sub>2</sub>), 0.3µM de P2 y P8 y 0.5µM de dNTPs y 100ng de DNA genómico. La reacción se sometió a un paso inicial de denaturación a 94° C por 1min 30s; luego por 40 ciclos de 94° C por 30s, 48° C por 45s y 72° C por 45s. Finalmente, terminó con un paso final de alineamiento y extensión de 48° C por 1min y 72° C por 5min, respectivamente. Los productos se corrieron en un gel de agarosa al 3% por 1h 45min y se visualizaron por medio de tinción con bromuro de etidio (cc) y luz ultravioleta.

### *Cuantificación epigenética del estrés.*

De manera adicional, se intentó evaluar los niveles de inestabilidad genómica originada por estrés calculando los niveles de metilación global del DNA de los eritrocitos como factor de estrés que afecte la prevalencia parasitaria. Se cuantificó la metilación global del genoma de los individuos de *Z. capensis* mediante una prueba de Polimorfismos Amplificados Sensibles a Metilación (Methylation Sensitive Amplified Polymorphism, MSAP) usando las enzimas endonucleasas HpaII y EcoRI. HpaII corta en sitios 5'-CCGG-3', que corresponden a secciones con secuencias CpG donde comúnmente ocurre la metilación de una citosina en vertebrados. Si la secuencia contiene una metil-citosina, HpaII no puede efectuar el corte. Para la digestión enzimática se usaron 200ng de DNA, 50U de HpaII (New England Biolabs, NEB®), 50U de EcoRI (NEB®), 1X Buffer 4 (NEB®) y se dejó digerir por 5 días a 37° C. La ligación de adaptadores se realizó en una reacción de 20ul con 0.5µM de adaptador EcoRI (NEB®), 5µM de adaptador HpaII (NEB®) y 20U de Ligasa T4 (NEB®).

Luego, se realizó una pre-amplificación usando los cebadores E+2G (5'-GAC-TGCGTACCAATTCAG-3'), que se liga sitios cortados por EcoRI, y HM+2 (5'-GATGAGTCTAGAACGGTA-3'), que se liga a sitios cortados con HpaII. El PCR se realizó en 10µl de reacción que contenía 4.5ul del producto de la digestión y ligación,

1X GoTaq® Green Master Mix (Promega, 0.8mM de dNTPs y 1.5mM de MgCl<sub>2</sub>) y 0.25µM de cada cebador. El proceso constaba de una etapa inicial de 72° C por 5min sin tapar. Luego, con la tapa puesta, el PCR tenía una etapa de denaturación inicial a 94° C por 5min; seguidos de 25 ciclos de 94° C por 30s, 55° C por 30s, y 72° C por 30s; terminando con una etapa de extensión final a 72° C por 5min.

El producto se diluyó a 0.2X, y se amplificó en dos PCRs independientes con un programa Touch Down (81) usando el cebador HM3\_FAM (5'-GATGAGTCTAG-AACGGTAG-3', con marcador de fluorescencia FAM) y E+AGA (5'-GAC-TGCGTACCAATTCAGA-3') o E+AGC (5'-GACTGCGTACCAATTCAGC-3') respectivamente. El PCR con el cebador E+AGA se realizó en una reacción de 10µl usando 3µl de la dilución del producto, 1X GoTaq® Green Master Mix (Promega, 0.8mM de dNTPs y 1.5mM de MgCl<sub>2</sub>) y 0.25µM de cada cebador HM3\_FAM y E+AGC. El protocolo Touch Down utilizado tenía una etapa inicial de denaturación a 94° C por 3min; seguido por 10 ciclos de 94° C por 30s, 65° C por 40s con una reducción de 1° C en cada ciclo, y 72° C por 30s; para continuar con 35 ciclos de 94° C por 30s, 55° C por 30s, y 72° C por 30s; finalizando con una etapa de extensión de 72° C por 3min. El PCR con el cebador E+AGC se realizó, similarmente, en una reacción de 10µl que contenía 3µl de la dilución del producto, 0.4 unidades de REDTaq® (Sigma-Aldrich), 1X REDTaq® PCR Reaction Buffer (Sigma-Aldrich, 10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 1.1mM MgCl<sub>2</sub>), 0.3mM de dNTPs, 0.25µM de cada cebador HM3\_FAM y E+AGC. El protocolo Touch Down utilizado tenía una etapa inicial de denaturación a 94° C por 5min; seguido por 10 ciclos de 94° C por 30s, 65° C por 1min con una reducción de 0.7° C en cada ciclo, y 72° C por 1min 30s; para continuar con 35 ciclos de 94° C por 30s, 58° C por 1min, y 72° C por 1min 30s; finalizando con una etapa de extensión de 72° C por 5min.

Los productos de la amplificación se corrieron en un gel de agarosa a 4% por 10h para detectar las bandas de los productos usando tinción con bromuro de etidio y luz ultravioleta. Las muestras fueron también analizadas por medio de un secuenciador para detectar las bandas formadas y marcadas con el cebador HM3\_FAM.

### *Análisis de datos*

Los análisis estadísticos se corrieron usando el paquete estadístico R (82). Se analizó el efecto de cada factor usando pruebas de independencia chi-cuadrado para todas las variables cualitativas (sexo, temporada, presencia de ectoparásitos). Se

realizaron pruebas de Shapiro-Wilk para evaluar normalidad, y luego pruebas t de Student para las variables cuantitativas (tamaño corporal e índices de condición corporal) usando el paquete *bbmle* para R (83). Como indicador de condición corporal, se utilizaron tres variables: la masa, una variable de índice de tamaño corporal (ITC) que corresponde al cociente de la masa corporal entre la longitud alar, y los residuos del modelo lineal por método de mínimos cuadrados ordinarios (MCO) de la masa corporal en relación a la longitud alar (84–86). Las medidas morfométricas elegidas para el índice de condición corporal se tomaron en base modelos de regresión significativos entre la masa y la estructura medida. Finalmente, se hizo un análisis multivariado para incorporar todas las variables en una regresión logística que evalúe finalmente el efecto combinado de todas ellas. Usando las variables significativas resultantes se crearon modelos explicativos para la probabilidad de infección de malaria aviar, y se compararon usando los Criterios de Información de Akaike (AIC).

## RESULTADOS

### *Objetivo 1: Prevalencia de parásitos hemosporidios.*

De los 145 individuos de *Z. capensis* capturados, se obtuvieron datos de endoparasitismo sanguíneo de 104. 28 (26.92%) tenían infecciones de parásitos del género *Haemoproteus* y/o *Plasmodium*. De 145 individuos, 93 (64.14%) tenían parásitos externos (garrapatas, piojos y/o ácaros). Por medios moleculares se identificó el sexo de 98 especímenes de *Z. capensis*, donde 34 (34.69%) fueron hembras y 64 (65.31%) fueron machos. No se pudo identificar el sexo del resto de individuos por muestras en mal estado que no rindieron resultados. De 145 individuos, 101 (69.66%) no estaban mudando plumaje cuando se tomó la muestra y 44 (30.34%) sí estaban en alguna etapa de muda. De los 45 individuos de *Z. capensis* evaluados por PCR en busca de hemosporidios, 15 dieron positivos; de los cuales 14 (93.33%) pudieron confirmarse por microscopía para *Haemoproteus* y/o *Plasmodium*. No se evaluó la prevalencia de hemosporidios según la edad porque no se pudo capturar gorriones juveniles. La proporción de individuos infectados con algún parásito de malaria aviar fue independiente ( $p = 1$ ) del sexo (Tabla 1).

Malaria X Sexo		Sexo	
		Hembra	Macho
Malaria	Ausente	24	46
	Presente	9	16
		$X^2=6.40 \times 10^{-31}$ df=1	$p = 1$

*Objetivo 2: Efecto del ectoparasitismo*

La proporción de individuos infectados con algún parásito de malaria aviar fue independiente ( $p = 0.93$ ) a presencia de ectoparásitos (Tablas 2).

**Tabla 2.** Tabla de contingencia  
Malaria X Ectoparasitismo

		Ectoparasitismo	
		Ausencia	Presencia
Malaria	Ausente	27	49
	Presente	9	19
		$X^2=0.01$ df=1	$p = 0.93$

*Objetivo 3: Efectos de la estación*

La proporción de individuos infectados con algún parásito de malaria aviar fue independiente ( $p = 0.54$ ) la estación (Tablas 3).

**Tabla 3.** Tabla de contingencia  
Malaria X Estación

		Estación	
		Húmeda	Seca
Malaria	Ausente	31	45
	Presente	14	14
		$X^2=0.38$ df=1	$p = 0.54$

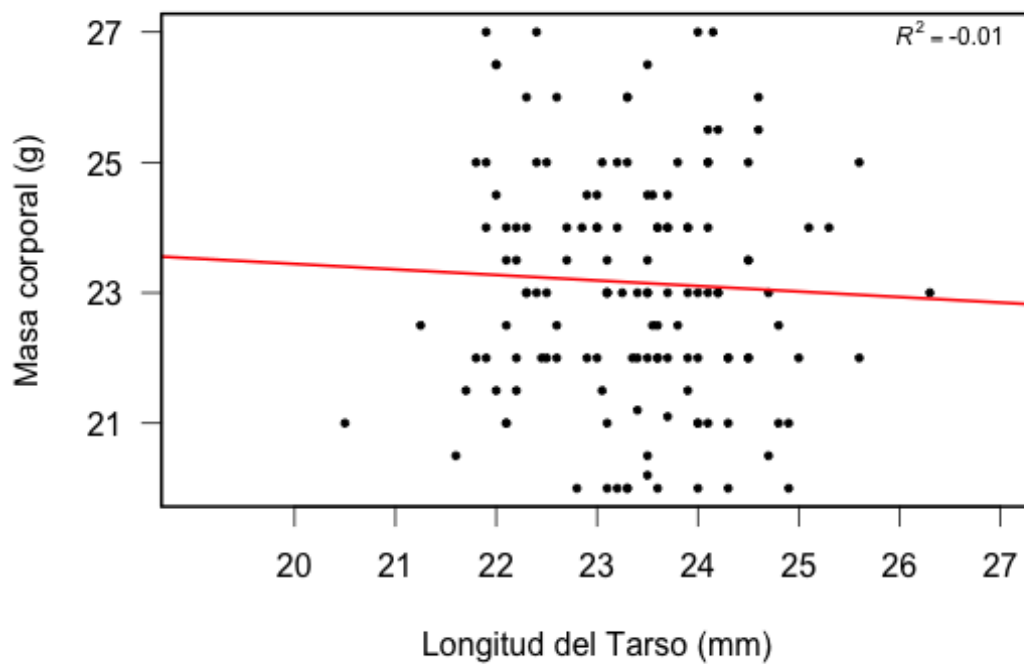
*Objetivo 4: Efecto de la condición corporal*

El peso medio de los individuos fue 23.15 g (E.S. = 0.17g, I.C.95% =  $\pm 0.33$ ,  $n = 145$ ) y el índice de tamaño corporal aplicado medio (peso dividido por el largo del tarso) fue 0.99 (E.S. = 0.01, I.C.95% =  $\pm 0.02$ ,  $n = 145$ ). Existe una diferencia significativa en

el peso promedio entre las dos estaciones ( $p = 0.02$ ) con una reducción de 3.5% del peso promedio en la estación seca con respecto a la húmeda ( $-0.81$  g I.C.95% =  $\pm 0.66$ ).

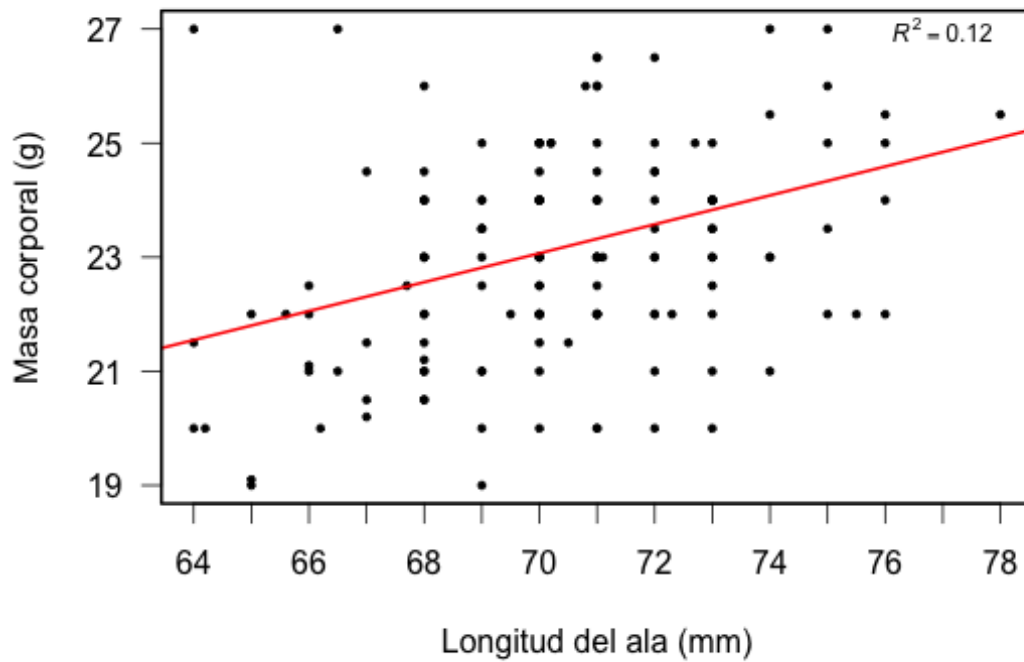
Las longitudes del tarso, el ala, el pico y la cabeza-pico fueron evaluadas para poder determinar un indicador de condición corporal.

No se encontró una relación positiva o significativa entre la masa corporal y la longitud del tarso ( $\beta = -0.08$ , E.S. = 0.17,  $t = -0.49$ ,  $p = 0.63$ ) en un modelo lineal de mínimos cuadrados ordinarios (MCO, Figura 3).



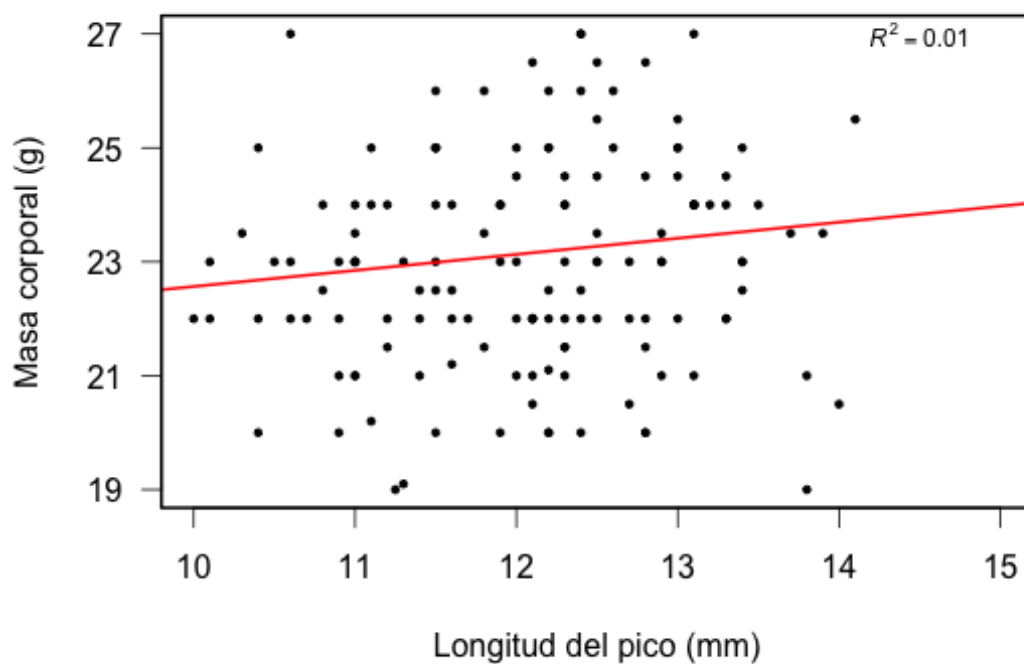
**Figura 3.** Dispersión (puntos negros) y regresión lineal de mínimos cuadrados ordinarios (línea roja) de la relación entre la masa y la longitud del tarso. No se encontró significancia estadística ( $p = 0.63$ )

Se encontró una relación positiva estadísticamente significativa entre la masa corporal y la longitud del ala ( $\beta = 0.25$ , E.S. = 0.06,  $t = 4.44$ ,  $p < 0.0001$ ) en un modelo lineal MCO (Figura 4).



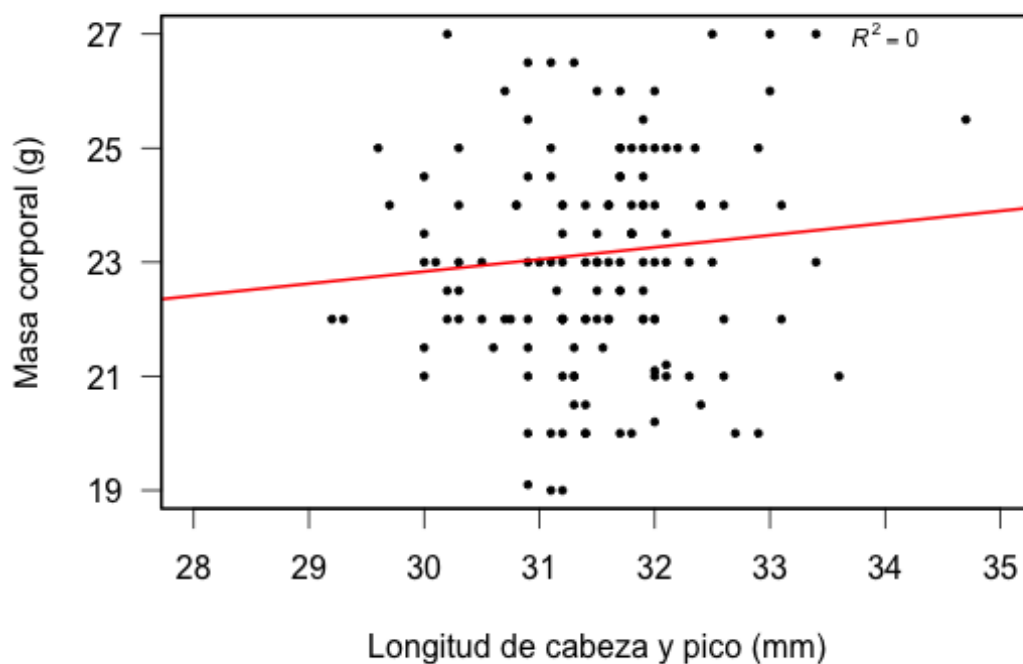
**Figura 4.** Dispersión (puntos negros) y regresión lineal de mínimos cuadrados ordinarios (línea roja) de la relación entre la masa y la longitud alar. Se encontró significancia estadística ( $p < 0.0001$ ) para esta medida.

No se encontró una relación positiva o significativa entre la masa corporal y la longitud del pico ( $\beta = 0.28$ , E.S. = 0.18,  $t = 1.54$ ,  $p = 0.13$ ) en un modelo lineal MCO (Figura 5).



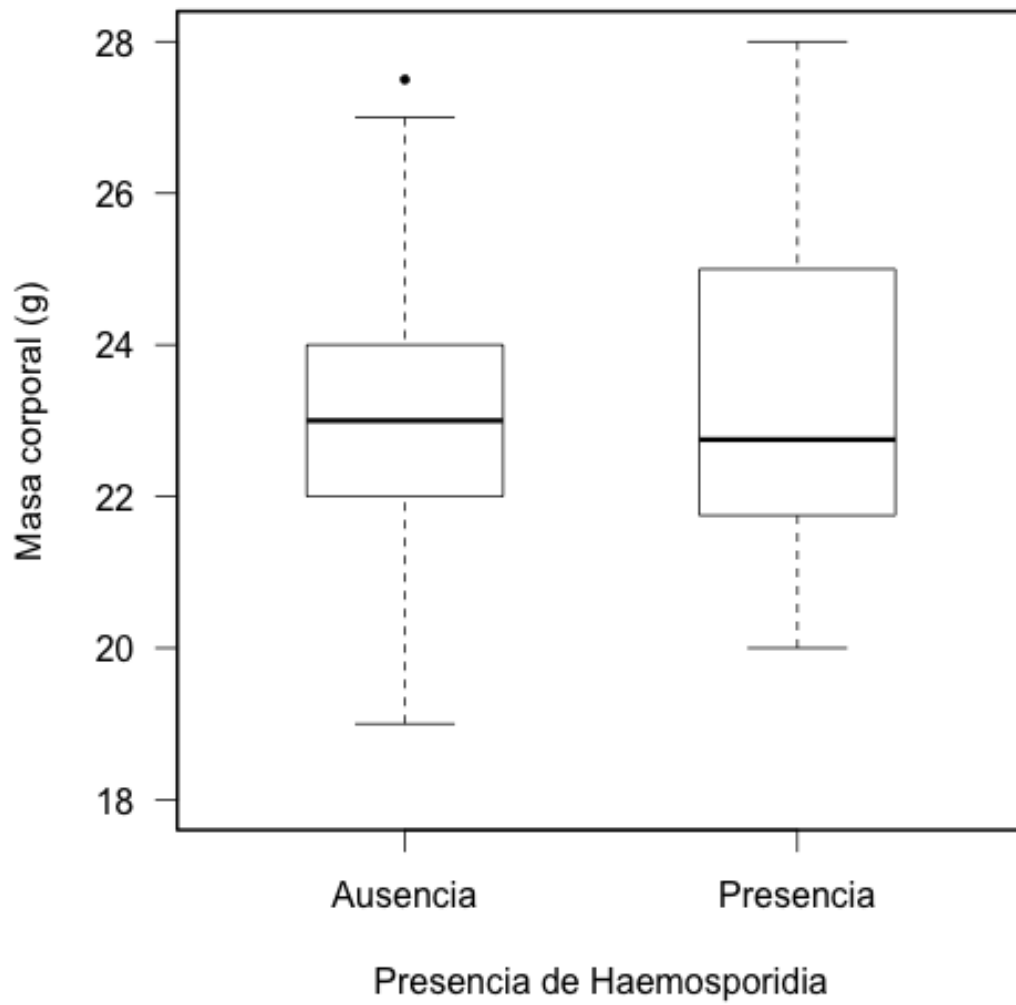
**Figura 5.** Dispersión (puntos negros) y regresión lineal de mínimos cuadrados ordinarios (línea roja) de la relación entre la masa y la longitud del pico. No se encontró significancia estadística ( $p = 0.13$ )

No se encontró una relación positiva o significativa entre la masa corporal y la longitud de la cabeza y el pico ( $\beta = 0.21$ , E.S. = 0.20,  $t = 1.09$ ,  $p = 0.28$ ) en un modelo lineal MCO (Figura 6).

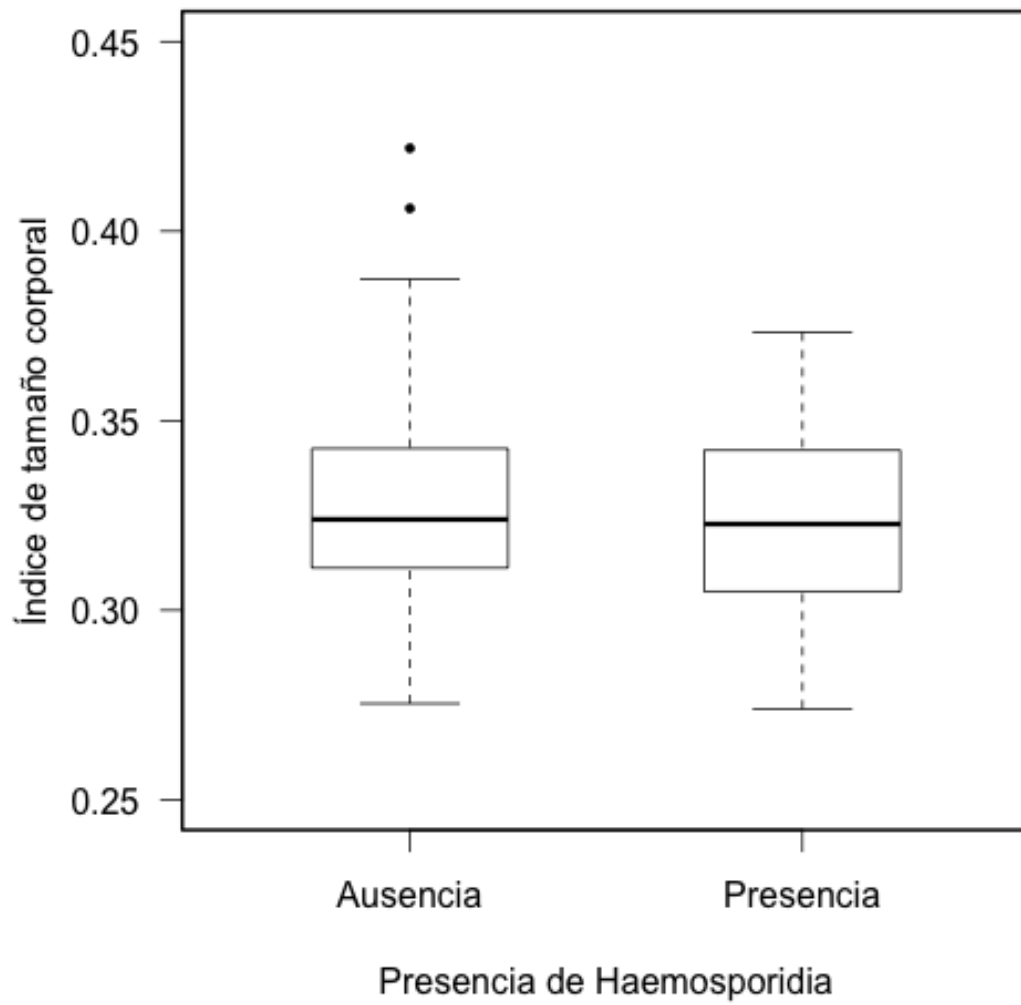


**Figura 6.** Dispersión (puntos negros) y regresión lineal de mínimos cuadrados ordinarios (línea roja) de la relación entre la masa y la longitud de la cabeza y el pico. No se encontró significancia estadística ( $p = 0.28$ )

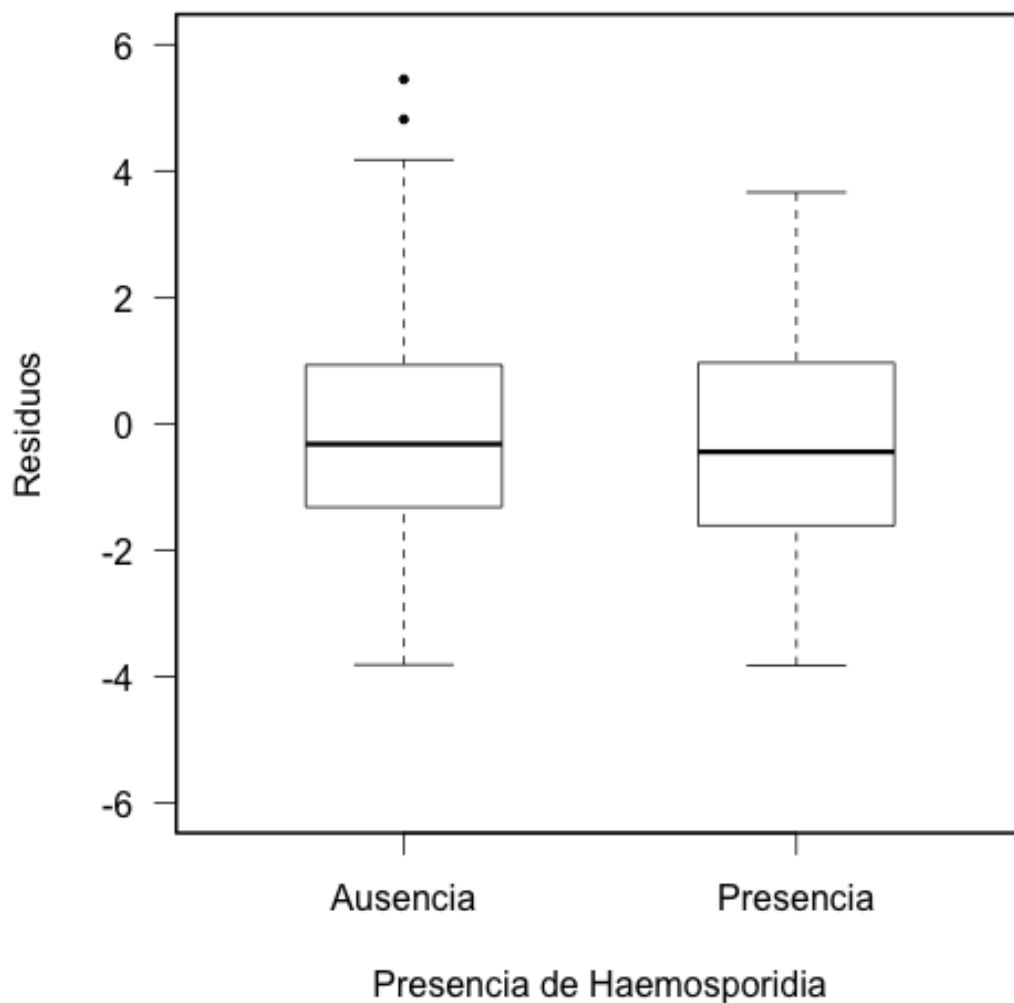
Los individuos infectados con malaria no mostraron diferencias significativas en peso ( $t = -0.62$ ,  $df = 45.13$ ,  $p = 0.54$ ), ITC ( $t = 0.70$ ,  $df = 49.30$ ,  $p = 0.49$ ), o residuos de masa corporal en base al modelo lineal de longitud del ala ( $t = -0.38$ ,  $df = 46.51$ ,  $p = 0.70$ ) con respecto a individuos adultos sanos (Figura 7-9).



**Figura 7.** Gráfico de caja y bigotes de la masa corporal de individuos con presencia y ausencia de parásitos hemosporidios.



**Figura 8.** Gráfico de caja y bigotes del ITC de individuos con ausencia y presencia de parásitos hemosporidios.



**Figura 9.** Gráfico de caja y bigotes de los residuos del modelo lineal de masa corporal para presencia y ausencia de hemsporidios parasitarios.

*Objetivo 5: Efecto del estrés crónico*

La evaluación del objetivo 5 no rindió datos adecuados. El protocolo molecular para evaluación de estrés en base a patrones de metilación no dio resultados debido a errores en el protocolo concernientes a variación entre las reacciones por efecto de la posición de los pozos en la placa. Los resultados mostraron diferencias significativas (prueba de rangos de Wilcoxon,  $p < 0.01$ ) entre muestras al borde y al centro de la placa de reacción, determinándolas incomparables e inutilizables. A falta de fondos para repetir la prueba, no se prosiguió con este factor como elemento de análisis.

### *Análisis multivariado de los efectos*

El modelo utilizado combinó las variables estudiadas para analizar el efecto del sexo, la ectoparasitosis y la estación sobre un modelo lineal logístico de infección. Se incluyó la condición corporal usando los residuos del modelo de masa corporal con respecto a la longitud del ala debido considerando la relación significativa encontrada en el modelo lineal MCO (Figura 4), a pesar de que la longitud del ala es una medida variable y no es tan buen indicador de tamaño corporal. Es mejor utilizar mediciones de estructuras óseas porque son permanentes, a diferencia de las alas que dependen de plumas que deben ser reemplazadas regularmente. Sin embargo, la relación masa-ala encontrada fue utilizada para analizar los cambios en la prevalencia en base a variables morfométricas de los gorriones.

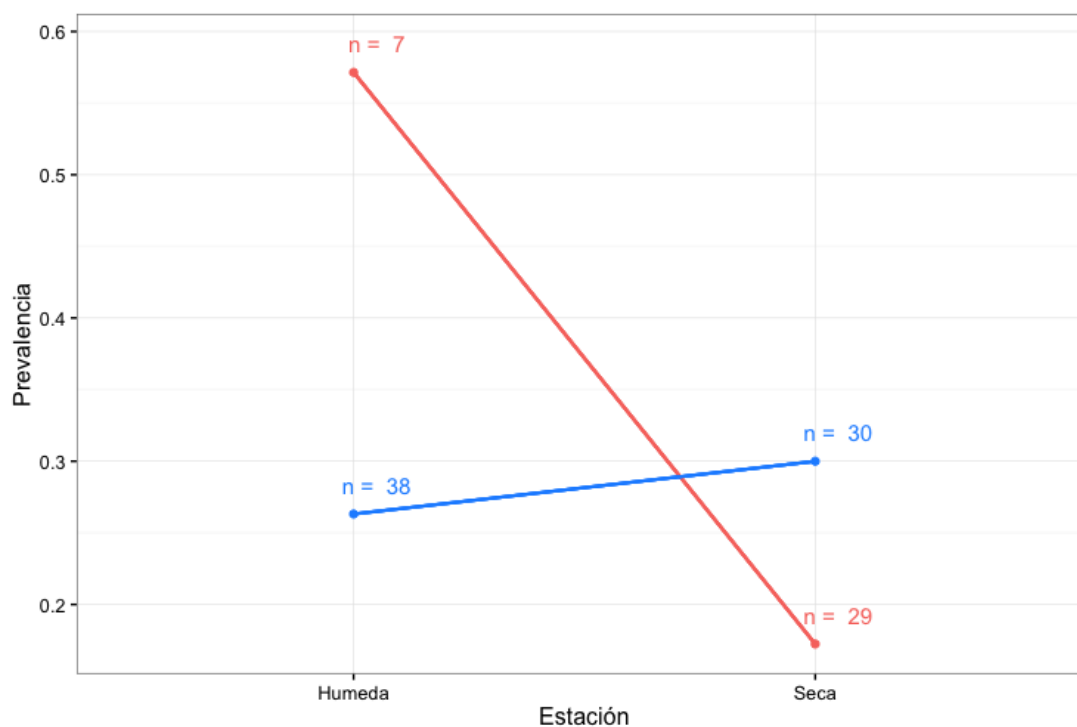
Bajo el modelo multivariado, la estación mostró efectos estadísticos marginalmente significativos de la probabilidad de infección por sí sola ( $p = 0.08$ ) y significativos por la interacción con la ectoparasitosis ( $p < 0.05$ ). El resultado y los coeficientes  $\beta$  del modelo de regresión logística se encuentran en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Valores de coeficientes del modelo lineal multivariado sobre la probabilidad de encontrar un individuo con malaria. \* indica valores de  $p$  menores a 0.05.

	$\beta$	E.S.	$z$	$p$
Intercepto	0.12	1.16	0.10	0.92
Condición corporal (Residuos)	-0.07	0.13	-0.57	0.57
Sexo (Macho)	0.31	1.22	0.26	0.80
Ectoparasitismo (+)	-0.93	1.20	-0.77	0.44
Estación (Seca)	-2.25	1.24	-1.81	0.07
Sexo(Macho) $\times$ Estación(Seca)	0.40	1.05	0.38	0.71
Ectoparasitismo(+) $\times$ Estación(Seca)	2.30	1.13	2.03	0.04*
Sexo(Macho) $\times$ Ectoparasitismo(+)	-0.87	1.19	-0.73	0.46

Se encontró que la estación y la interacción entre la estación la ectoparasitosis tienen efectos significativos sobre la presencia o ausencia de parásitos del género *Haemoproteus* y/o *Plasmodium* en gorriones de la Reserva Nacional de Lachay, pero no por el resto de variables. La prevalencia aparenta estar controlada por estas variables pero no está claro si hay otras que no se han evaluado que puedan estar jugando un

papel importante. El efecto de la interacción sobre la prevalencia de infecciones de malaria muestra una reducción significativa entre temporadas en individuos sin ectoparasitosis, pero aparentemente un cambio no significativo entre individuos con ectoparasitosis (Figura 10).

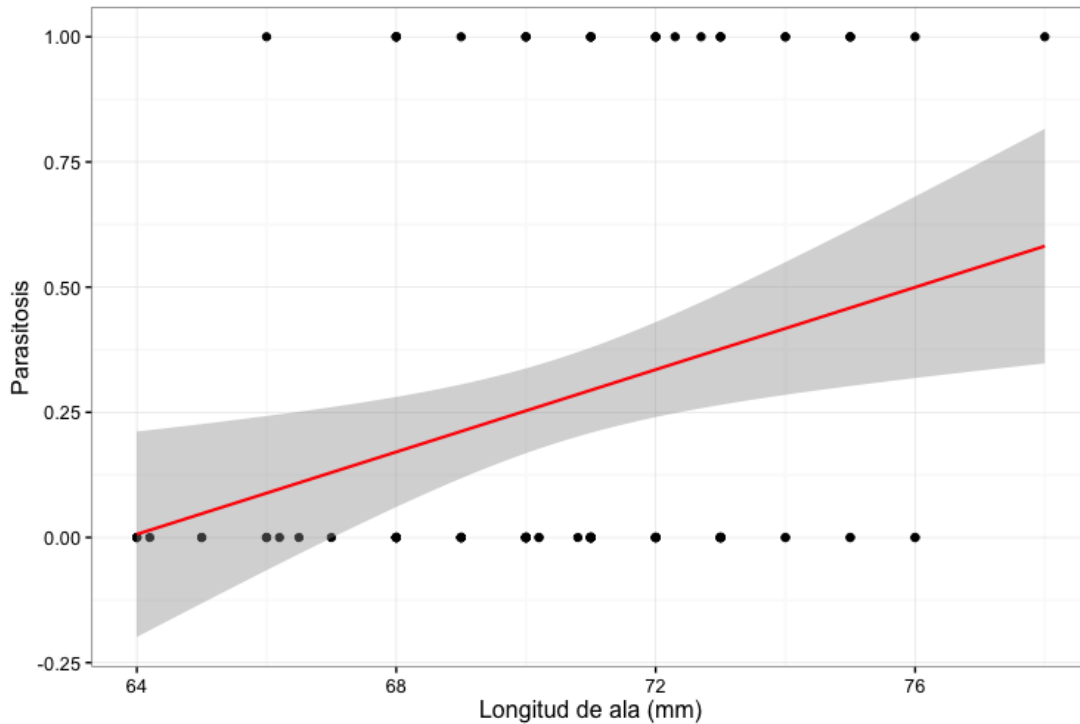


**Figura 10.** Gráfico de interacción entre la estación y la prevalencia de malaria aviar. Individuos con ectoparasitosis negativa están en rojo, individuos con ectoparasitosis positiva están en azul. El valor de  $n$  mostrado representa el número total de individuos sobre el que se calculó cada respectiva prevalencia según las categorías mostradas.

Adicionalmente, en vista de la relación positiva entre la masa corporal y la longitud del ala, se realizó un modelo logístico univariado para evaluar una posible relación entre esta variable y la prevalencia de malaria. Se encontró una relación positiva ( $\beta = 0.22 \pm 0.09$ ) y estadísticamente significativa ( $z = 2.60, p < 0.01$ ) entre la variable morfológica y la prevalencia (Figura 11). Ninguna otra variable morfológica mostró efectos estadísticamente significativos en un modelo multivariado (Tabla 5).

Se desarrollaron modelos logístico en base a la estación, ectoparasitosis y longitud del ala en base a los resultados encontrados. Se compararon 11 posibles combinaciones distribuidas entre modelos con variables independientes e interactuantes (Tabla 6). El modelo univariado con longitud del ala fue el que mejor

explica los resultados. Sin embargo, el  $\Delta AIC$  no mostró diferencias importantes entre los modelos. Todos los mejores modelos explicativos ( $\Delta AIC < 4$ ) contienen la longitud del ala de manera independiente o en interacción con la estación o ectoparasitosis. Sin embargo, incluso los dos mejores modelos tienen tan sólo una probabilidad acierto de 25.2 y 24.7% respectivamente.



**Figura 11.** Modelo logístico de presencia de parasitosis de malaria aviar en base a la longitud del ala ( $p < 0.01$ ,  $n = 104$ ). La línea roja indica el modelo, el área en gris es el margen de error para el modelo, y los puntos negros son los datos (0 = ausencia, 1 = presencia de parasitosis).

**Tabla 5.** Valores de coeficientes del modelo lineal multivariado sobre la probabilidad de encontrar un individuo con malaria según variables morfológicas.

	$\beta$	E.S.	$z$	$p$
Masa corporal	-0.04	0.13	-0.28	0.21
Ala	0.23	0.13	1.83	0.07
Pico	-0.07	0.28	-0.25	0.80
Cabeza - Pico	0.03	0.33	0.09	0.93
Altura del Pico	-0.03	0.09	-0.27	0.78
Tarso	-0.17	0.26	-0.63	0.52
Cola	0.003	0.07	0.05	0.96

**Tabla 6.** Comparación de modelos según Criterio de Información de Akaike donde A = Longitud de ala, E = Ectoparasitosis, T = Estación.

	AIC	$\Delta$ AIC	df	Peso
A	116.8	0	2	0.252
A×E	116.9	0	4	0.247
A×T	117.9	1.1	4	0.149
T + A×E	118.8	2.0	5	0.094
A×T×E	119.1	2.3	8	0.081
A + T×E	119.6	2.7	5	0.064
E + A×T	119.7	2.9	5	0.059
A + T + E	120.7	3.8	4	0.037
T	124.5	7.6	2	0.006
T×E	124.7	7.8	4	0.005
E	125.1	8.2	2	0.004

## DISCUSIÓN

Se encontraron algunas coincidencias entre este trabajo e investigaciones anteriores. Sin embargo, la mayor parte de trabajos en hemosporidios, a la fecha, provienen de zonas templadas (24,26,27,70). Existen pocas investigaciones tropicales y aún menos en América del Sur para poder comparar los resultados encontrados en este estudio. Sin embargo, incluso entre el Paleotrópico y latitudes Paleárticas y Neárticas existen coincidencias en los factores que determinan la prevalencia de parásitos hemosporidios que permiten comparar los resultados de este estudio con otros.

No se encontró efecto del sexo sobre la presencia de parásitos. La falta de efecto coincide con la información obtenida por Fecchio *et al.* (2014) (51) y por Svensson-Coelho *et al.* (2013) (38) en aves del Neotrópico, específicamente de Mata Atlántica y bosques Amazónicos respectivamente. En áreas templadas, sin embargo, Knowles *et al.* 2011 (52) encontró efecto con ligera significancia estadística donde las hembras presentaban mayor prevalencia en un passerino del Paleártico. Los resultados del presente trabajo indican que el sexo no juega un papel importante en la prevalencia de hemosporidios.

En la literatura existe un consenso que indicaría que la testosterona reduce la inmunocompetencia y haría que los machos sean más susceptible a las infecciones (87,88). En estos resultados, sin embargo, no se ha encontrado una diferencia suficiente para corroborar esta hipótesis. Dentro del espectro de este estudio no estuvo investigar cambios en la capacidad inmune de los individuos que podría ayudar a entender mejor la interacción hospedero-parásito en machos y hembras.

Dunn *et al.* 2011 (89) discute el valor de las diferencias etológicas sexo-dependientes sobre la prevalencia de *Plasmodium* y *Leucocytozoon*, estudiando una población de *P. major* en el Reino Unido. Diferencias comportamentales entre sexos podrían ser un factor importante sobre la prevalencia de malaria tal como se ha visto en este estudio, y cuando se hacen comparaciones a nivel comunitario o se evalúan características de la historia de vida de las especies. Individuos con áreas de vida más grande y con tasas de exploración más altas podrían estar en mayor contacto con individuos infectados y más expuestos a vectores de parásitos hemosporidios. En ese sentido, los resultados de este trabajo no indican un efecto de diferencias hormonales o comportamentales que puedan incidir sobre la prevalencia de malaria aviar en gorriones.

Esta falta de diferencias podría deberse a que la tasa de transmisión y prevalencia también depende de las estrategias de los vectores para encontrar a los huéspedes. Estrategias olfativas, como la atracción hacia el CO<sub>2</sub> o a compuestos volátiles de la glándula uropigial como en vectores de la familia Culicidae (90,91), no deberían ser afectados por la movilidad de los individuos. Aunque machos y hembras puedan tener patrones de movimiento y selección de recursos diferentes por una mayor dedicación de tiempo de la hembra durante la reproducción (92), la transmisión no se vería afectada si los vectores se ven igualmente atraídos hacia hembras o machos menos móviles por las señales olfativas. Coincide, por tanto, que no haya encontrado diferencias de prevalencia entre sexos en *Z. capensis*.

Lamentablemente, la investigación en vectores de hemosporidios ha sido aún más escasa que la investigación en los propios endoparásitos. Esto impide conocer con certeza la diversidad de vectores o identificar las especies que puedan estar participando en la infección y las señales que puedan utilizar para encontrar a los hospederos. No es posible determinar la importancia de factores relacionados a vectores porque no conocemos qué vectores están presentes en las zonas estudiadas.

En otros estudios de prevalencia de malaria aviar en comunidades ecológicas, la tendencia a la congregación y la formación de colonias reproductivas ha mostrado aumentar la prevalencia de parásitos externos y sanguíneos (93–96). En el caso de *Z. capensis*, la especie no forma colonias reproductivas, los machos mantienen territorios durante la época reproductiva, son estacionalmente monógamos y son de cuidado biparental (97). No existen, por tanto, otros indicios de comportamientos o diferencias etológicas intersexuales que sugieran prevalencias distintas y este estudio tampoco las ha encontrado. Si bien no se encontraron diferencias en la prevalencia que evidencien diferentes exposiciones entre hembras y machos, es posible que características propias del hábitat homogenicen la exposición y resten importancia a diferencias en los patrones de movimiento. Por ejemplo, si la distribución de vectores es homogénea a través de las lomas se puede esperar que la prevalencia sea la misma alrededor del área y que diferentes patrones de movimiento no influyeran en la exposición.

La combinación de otras variables con el sexo podrían tener efectos sobre la prevalencia, a diferencia del sexo por sí solo. La interacción entre las estaciones y el sexo podría ser importante sobre la inmunidad de las aves considerando los cambios hormonales en machos y hembras durante las temporadas reproductivas y de muda.

Elevaciones de la testosterona en machos que estimule una mejor protección territorial y lo prepare para el apareamiento con la hembra podría afectar en mayor medida la inmunidad de las aves y elevar la parasitemia. Los análisis de los datos, sin embargo, no mostraron ningún efecto estadísticamente significativo de la interacción entre sexo y la estación. Diferencias a este nivel podrían verse mejor reflejadas en cambios en la intensidad de la infección (número de gametocitos en relación al número de eritrocitos) que en cambios en la prevalencia. Por otro lado, también podría estar relacionado a la tendencia de aves tropicales a reproducirse más de una vez al año con camadas pequeñas, en contraste con especies de latitudes templadas. *Z. capensis* se reproduce en temporadas relativamente flexibles y con tamaños de camada menores (2-3 huevos por puesta) a especies congénicas del Neártico (97). La reproducción, en ese sentido, podría estar desacoplada de las temporadas meteorológicas de las lomas costeras.

La estacionalidad, por otro lado, ha mostrado tener efectos estadísticos marginalmente significativos ( $p = 0.07$ ) en el modelo multivariado, indicando que podría estar jugando un rol importante en la prevalencia de hemosporidios. Eso ha sido visto también en varios estudios anteriores (47,50,52,98). Beaudoin *et al.* (1971) (48) elaboró un modelo teórico que explicaría la variación estacional de la prevalencia basado en la emergencia de los vectores en temporadas de alta humedad o calor que estimule la reproducción y eclosión de larvas de dípteros. Según su estudio, el aumento en la abundancia de mosquitos e hippobóscidos durante las estaciones húmedas generaría la elevación de la prevalencia de malaria aviar. Esta predicción ha sido ratificada en varios casos, pero los resultados en zonas neotropicales no coinciden con los estudios en áreas templadas (38,51). La estabilidad climática de los trópicos podría prevenir cambios importantes sobre la abundancia de vectores de modo que neutralice el efecto predicho por Beaudoin *et al.*. Sin embargo, no hay estudios a la fecha que hayan incorporado la abundancia, diversidad, y distribución de vectores a lo largo de las estaciones que permitan corroborar esta hipótesis.

El caso particular de una población de lomas, sin embargo, no coincide con lo esperado en base a la estabilidad climática de los trópicos. Las lomas son ambientes muy estacionales, donde la estación seca puede tener una ausencia absoluta de agua que prevenga la emergencia de vectores, en contraste con la estación húmeda con precipitación relativamente alta y poca variación térmica en comparación con latitudes

más altas. La fuerte diferencia entre estaciones podría ser la causa del efecto en ecosistemas de lomas en contraste con otros ambientes en el Neotrópico.

A pesar de esto, es necesario considerar que diferencias interanuales en las prevalencias de parásitos sanguíneos como ha sido encontrado en otros estudios (38,49,52) podrían diluir los efectos encontrados en este trabajo. Estudios a largo plazo son necesarios para entender la dinámica estacional de la prevalencia considerando el resto de posibles variables.

Este estudio ha encontrado que la interacción de la estación con la ectoparasitosis también juega un rol en la prevalencia de Haemosporidia. La presencia de ectoparásitos puede tomarse como un indicador de condición corporal (estrés crónico, estado de nutrición o salud), de su capacidad para remover parásitos externos, y combatir posibles vectores. Los ectoparásitos pueden ser indicadores de una mala condición física si son más frecuentes en individuos en mala condición (99,100). La combinación de aves con mala condición corporal y posibles elevadas abundancias de vectores en la estación húmeda podrían elevar la prevalencia de parásitos sanguíneos.

En el caso de este trabajo, sin embargo, la combinación de estación seca con presencia positiva de ectoparásitos eleva la prevalencia. En este caso, la acción conjunta de dos condiciones de estrés (la ectoparasitosis y la estación seca) podrían hacer a los individuos más vulnerables y reducir la inmunocompetencia. La estación seca podría establecer condiciones ambientales que fueren un estado de estrés en los gorriones y depriman la capacidad inmune. La reasignación de energía para combatir la falta de agua, la reducción en la disponibilidad de alimento y la elevación de la exposición de los individuos a depredadores podrían condicionar una respuesta al estrés que sea especialmente perjudicial a individuos que ya eran más vulnerables a contraer hemosporidios (101). Sin embargo, los resultados indican un patrón distinto. La figura 10 muestra una elevada prevalencia en la temporada húmeda en gorriones sanos, y un patrón de prevalencia relativamente constante en gorriones con ectoparasitosis. Una hipótesis para los resultados encontrados está relacionado a la capacidad de los gorriones para resistir varios tipos de parasitemia. Una menor prevalencia de malaria aviar en individuos con ectoparasitosis podría deberse a que la combinación de ambos estresores tiene un efecto más intenso sobre la supervivencia de los individuos. Individuos con ambas condiciones tienen mayor mortalidad y son removidos de la población con mayor frecuencia, y en consecuencia, gorriones con malaria aviar sin ectoparásitos son más

comunes porque pueden sobrevivir por más tiempo. Sin embargo, en este trabajo no se pudieron obtener recapturas para hacer una evaluación longitudinal de la infección que confirmaran esta hipótesis.

La elevada prevalencia puede ser resultado, también, del tamaño de la muestra. Tan sólo el 15% (7/45) de gorriones evaluados en la época húmeda fueron encontrados sin ectoparásitos. Es claro que se necesita un muestro más intenso para evaluar el efecto de estas variables con detalle. Si la presente hipótesis es correcta a pesar del tamaño muestral utilizado, indicaría que las interacciones hospedero-parásito (la malaria aviar, en particular) juegan un papel importante en la regulación demográfica y las tasas de reclutamiento de *Z. capensis* en lomas costeras.

No se han encontrado estudios a la fecha que evalúen la presencia de ectoparásitos con relación a la prevalencia de parásitos sanguíneos. Los estudios se han concentrado más en estudiar el efecto de los hemosporidios sobre la condición corporal de las aves (102). En todo caso, no está clara la relación del estado corporal con la infección por hemosporidios. El efecto podría venir de dos modos inversos: mala condición física podría indicar una predisposición a infecciones por parásitos sanguíneos o una falta de habilidad para combatirlos (101), o podría ser un resultado de la infección misma.

Algunos trabajos han encontrado malas condiciones corporales asociados a infecciones por hemosporidios para diferentes indicadores de condición corporal como índices de masa corporal (102,103). Ha sido común usar indicadores de condición relacionados a la masa corporal porque está relacionado a la capacidad del individuo para alimentarse y permanecer en un buen estado de salud. Sin embargo, los resultados no son consistentes (86). En este trabajo no se encontró relación entre el indicador de condición corporal y la prevalencia de parásitos sanguíneos. Aves parasitadas por hemosporidios no mostraron tendencias a elevación o reducción del peso. En ese sentido, la población de gorriones estudiados no mostró que el estado físico tenga alguna asociación con la prevalencia de hemosporidios, así como tampoco muestra que los hemosporidios tengan un efecto sobre el estado de las aves.

Es importante reconocer que el uso de medidas de condición corporal tiene limitantes. La única relación significativa encontrada fue entre la longitud del ala y la masa de los gorriones. Esta medida es difícil de interpretar porque la longitud de las alas depende de una estructura que es reemplazada regularmente. Medidas más fijas como longitud de tarso o de la cabeza y pico del individuo podrían ser más fáciles de interpretar

porque están directamente relacionadas al sistema óseo y al tamaño corporal, pero ninguna de estas variables mostró un incremento estadísticamente significativo con la masa. Las alas, a pesar de estas dificultades, aún podrían ser útiles, sobre todo si se considera que individuos más pesados necesitan estructuras de vuelo más grandes, o si la longitud de las plumas de las alas varían en función de la disponibilidad de recursos.

La importancia biológica del efecto del ala sobre la prevalencia de hemosporidios no es clara. La relación no es en base al tamaño corporal porque ninguna otra variable morfológica mostró efectos significativos (Tabla 5). Es posible que el efecto se deba a rasgos de historia natural relacionados a la morfología alar. La historia natural también tienen un efecto importante sobre los patrones de prevalencia de hemosporidios en aves (104,105). Comportamientos migratorios podrían explicar las diferencias vistas en base a la longitud del ala (Figura 11, Tabla 6). Alas más largas y punteadas son comunes en aves migratorias (106). La fuerte influencia del tamaño de las alas en los modelos podría indicar que hay gorriones que se mueven más y que esto eleva la exposición de estos individuos a los hemosporidios. Comportamientos migratorios pueden aumentar la prevalencia al exponer a las aves a varios ambientes y diferentes cepas de patógenos (107). En el caso de *Z. capensis*, se han encontrado poblaciones con migración parcial en Argentina (108). Poblaciones parcialmente migratorias encajarían en este modelo si los individuos migratorios tienen alas más largas en comparación con gorriones residentes. No se sabe con certeza, sin embargo, si ese es el caso en la población de lomas de Lachay. El patrón encontrado en este trabajo podría interpretarse como indicador de que existe migración parcial de la población de Lomas de Lachay que expone a los individuos con mayor movimiento a más parásitos. Sin embargo, aún no está claro si estas diferencias morfológicas realmente implican diferentes patrones de movimiento (109).

En este trabajo no se ha incluido la variable de edad de los individuos debido a que es difícil de medir con precisión. Más allá de la distinción entre juvenil (primer año) y adulto (>1 año), no es posible llegar a mejores indicadores de la edad de los gorriones porque no presenta mudas parciales como sus congéneres de zonas templadas (110). Es recomendable incluir esta variable en el estudio de prevalencia de parásitos hemosporidios porque otros trabajos han encontrado una reducción de la parasitemia y la prevalencia con la edad, indicando una posible adquisición de inmunidad contra los protozoarios invasores (38,51,52). Mayor parasitemia y/o prevalencia de parásitos en juveniles también podría estar relacionada al desarrollo dentro del nido, al contacto y

hacinamiento en los nidos, y a la atracción de vectores cuando están en el nido debido a poca movilidad. De otro modo, la reducción de la prevalencia con la edad podría estar relacionada a la mortalidad de los individuos, pero la falta de evidencia de síntomas agudos sugiere que los hemosporidios no son tan virulentos como para causar cambios perceptibles en las poblaciones. El anillamiento de individuos en la población sería útil por estos motivos. Mantener un monitoreo de los individuos capturados e identificados permitiría estudiar las infecciones a lo largo de la vida de los gorriones, en contraste con estudios que dan una visión estática de la interacción entre aves y parásitos.

En todo caso, es aún necesario entender el rol que juegan estos parásitos sobre patrones poblacionales, las abundancias y las estructuras comunitarias. Los factores ambientales e intrínsecos que determinen una mayor o menor prevalencia de parásitos deben estar relacionados a algún efecto sobre el desempeño biológico de las especies y los individuos infectados. Considerando la amplia presencia de parásitos del género *Plasmodium* y *Haemoproteus* en casi todos los ecosistemas y comunidades de aves, es evidente que estos protozoarios han evolucionado con las aves (y otros vertebrados) por millones de años (111).

*Zonotrichia capensis*, del mismo modo, es una especie abundante y cosmopolita. Al tener una distribución tan grande, la especie debe estar expuesta a una gran diversidad de especies y linajes de hemosporidios. La especie podría ser especialmente resistente a los hemosporidios de modo que haya sido capaz de colonizar tantos ambientes y posteriormente evolucionar con una diversidad de hemosporidios hasta obtener inmunidad sobre esta variabilidad.

Es posible que los protozoarios hemosporidios estén jugando un papel crucial en las dinámicas poblacionales de los vertebrados y sean un componente importante de los ecosistemas donde habitan. El presente trabajo ha encontrado que la interacción hospedero-parásito está relacionado con las condiciones ambientales, y posiblemente de estrés, que necesitan ser investigadas con mayor profundidad para asegurar que cambios en el paisaje no perjudiquen a ninguna de las partes de esta interacción.

## CONCLUSIÓN

En este trabajo sólo se encontraron efectos estadísticamente significativos para la estación, su interacción con la presencia de ectoparásitos, y la longitud del ala en relación a la prevalencia de *Plasmodium* sp. y *Haemoproteus* sp. en una población silvestre de *Z. capensis*.

La falta de relaciones entre factores intrínsecos de las aves como diferencias sexo-dependientes o condición corporal pueden ser evidencia de una larga historia co-evolutiva entre hemosporidios y aves. Estos protozoarios han sido muy eficaces en insertarse dentro del ecosistema y mantenerse viables dentro de las poblaciones de sus hospederos. Sin embargo, el efecto de la longitud alar encontrado indica que podrían haber rasgos variables dentro de la población que afecte la probabilidad de infección entre gorriones.

El efecto significativo de factores ambientales como la estación, además del efecto de la presencia de ectoparásitos en los individuos, indican que podría haber un juego importante entre la prevalencia y variables extrínsecas a las aves. Dentro de ellos, el posible rol del estrés, además del posible efecto de la infección inicial aguda sobre patrones demográficos, en la infección y la prevalencia de hemosporidios podría ser importante para entender la importancia de estos parásitos en los ecosistemas.

La interacción entre estrés y enfermedades de vida silvestre requiere de atención especial considerando los rápidos cambios en paisajes y ecosistemas que están ocurriendo por la intervención humana y el cambio climático. Es necesario buscar tecnologías, métodos y formas que generen el menor impacto sobre las poblaciones y permitan coexistencias saludables para poder mantener las comunidades ecológicas y los procesos ecosistémicos que las sustentan en los lugares donde nos asentamos.

Aún es necesario estudiar más las interacciones entre la prevalencia y otras variables intrínsecas y extrínsecas que puedan afectar las tasas de infección de parásitos hemosporidios. El efecto encontrado de la estación y parásitos externos es suficiente para motivar nuevos estudios en el rol del estrés sobre la prevalencia e intensidad de parasitemia de malaria aviar y otros hematozoarios en las aves.

Finalmente, no está claro el rol de los hemosporidios sobre la dinámica poblacional de las aves. En otros trabajos se han encontrado perjuicios sobre el desempeño biológico pero nada sobre las tasas de supervivencia o reclutamiento. Este

será un paso importante en entender el rol que juegan parásitos que han co-evolucionado con sus hospederos para integrarse en múltiples ecosistemas.

El rol de las interacciones hospedero-parásito suelen ser ignoradas cuando tratamos de esquematizar el funcionamiento de un ecosistema. Al igual que las interacciones depredador-presa, el parasitismo es perjudicial para una de las especies interactuantes. En el caso de los hemosporidios aviares, su prevalencia mundial y persistencia en todos los biomas del planeta, los convierten en componentes importantes en sus comunidades gracias a una larga historia evolutiva con sus hospederos. La atención que estas interacciones están recibiendo en la actualidad es un paso firme en la comprensión completa de nuestros ecosistemas y de los diferentes factores que pueden estar afectándolos.

De esta manera, es importante entender las variables que modulan las prevalencias y tasas de infección, transmisión e inmunidad en poblaciones silvestres para poder integrarlo en estrategias que apunten a la conservación eficaz de la fauna silvestre.

## REFERENCIAS

1. Elton C. *Animal Ecology*. 1st. Animal Ecology. London: Sidgwick & Jackson, Ltd.; 1927. 207 p.
2. Haldane JBS. Disease and Evolution. *Ric Sci*. 1949;19:1–11.
3. Steffen W, Crutzen PJ, McNeill J. The Anthropocene: Are Humans Now Overwhelming the Great Force of Nature? *Ambio*. 2007;36(8):614–21.
4. Sih A, Ferrari MCO, Harris DJ. Evolution and behavioural responses to human-induced rapid environmental change. *Evol Appl*. 2011;4(FEBRUARY 2011):367–87.
5. Corlett RT. The Anthropocene concept in ecology and conservation. *Trends Ecol Evol*. Elsevier Ltd; 2015;30(1):36–41.
6. Delgado-V. C a., French K. Parasite–bird interactions in urban areas: Current evidence and emerging questions. *Landsc Urban Plan*. Elsevier B.V.; 2012 Mar;105(1–2):5–14.
7. van Riper C, van Riper SG, Goff ML, Laird M. The Epizootiology and Ecological Significance of Malaria in Hawaiian Land Birds. *Ecol Monogr*. 1986;56(4):327–44.
8. Woodworth BL, Atkinson CT, Lapointe D, Hart PJ, Spiegel CS, Tweed EJ, et al. Host population persistence in the face of introduced vector-borne diseases: Hawaii amakihi and avian malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(5):1531–6.
9. George TL, Harrigan RJ, LaManna JA, DeSante DF, Saracco JF, Smith TB. Persistent impacts of West Nile virus on North American bird populations. *PNAS*. 2015;1507747112-.
10. Garamszegi LZ. Climate change increases the risk of malaria in birds. *Glob Chang Biol*. Blackwell Publishing Ltd; 2011;17(5):1751–9.
11. LaPointe DA, Atkinson CT, Samuel MD. Ecology and conservation biology of avian malaria. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1249(1):211–26.
12. Martinsen ES, Perkins SL, Schall JJ. A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): Evolution of life-history traits and host switches. *Mol Phylogenet Evol*. 2008;47(1):261–73.
13. Harrigan RJ, Sedano R, Chasar AC, Chaves J a., Nguyen JT, Whitaker A, et al. New host and lineage diversity of avian haemosporidia in the northern Andes. *Evol Appl*. 2014;1–13.
14. Clark NJ, Clegg SM, Lima MR. A review of global diversity in avian haemosporidians (*Plasmodium* and *Haemoproteus*: Haemosporida): new insights from molecular data. *Int J Parasitol*. Australian Society for Parasitology Inc.; 2014;44(5):329–38.
15. Atkinson CT. Vectors, epizootiology, and pathogenicity of avian species of

- Haemoproteus (haemosporina:haemoproteidae). Vol. 16, Bulletin of the Society of Vector Ecologists. 1991. p. 109–26.
16. Degiusti DL, Sterling CR, Dobrzechowski D. Transmission of the Chelonian Haemoproteid *Haemoproteus metchnikovi* by a Tabanid Fly *Chrysops callidus*. *Nature*. 1973 Mar 2;242(5392):50–1.
  17. Lutz HL, Patterson BD, Kerbis Peterhans JC, Stanley WT, Webala PW, Gnoske TP, et al. Diverse sampling of East African haemosporidians reveals chiropteran origin of malaria parasites in primates and rodents. *Mol Phylogenet Evol*. Elsevier Inc.; 2016;99:7–15.
  18. Beadell JS, Ishtiaq F, Covas R, Melo M, Warren BH, Atkinson CT, et al. Global phylogeographic limits of Hawaii's avian malaria. *Proc R Soc B Biol Sci*. 2006;273(1604):2935–44.
  19. Ricklefs RE, Fallon SM. Diversification and host switching in avian malaria parasites. *Proc R Soc London B Biol Sci*. 2002 May 7;269(1494):885–92.
  20. Waldenström J, Bensch S, Kiboi S, Hasselquist D, Ottosson U. Cross-species infection of blood parasites between resident and migratory songbirds in Africa. *Mol Ecol*. Blackwell Science Ltd; 2002;11(8):1545–54.
  21. Cardona CJ, Ihejirika A, McClellan L. Case Report- *Haemoproteus lophortyx* Infection in Bobwhite Quail. *Avian Dis*. 2002;46(1):249–55.
  22. Merino S, Moreno J, Sanz JJ, Arriero E. Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). *Proc Biol Sci*. 2000;267(1461):2507–10.
  23. Asghar M, Hasselquist D, Bensch S. Are chronic avian haemosporidian infections costly in wild birds? *J Avian Biol*. Blackwell Publishing Ltd; 2011;42(6):530–7.
  24. Richner H, Christe P, Oppliger A. Paternal investment affects prevalence of malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(4):1192–4.
  25. Oppliger A, Christe P, Richner H. Clutch size and malaria resistance. Vol. 381, *Nature*. 1996. p. 565.
  26. Knowles SCL, Nakagawa S, Sheldon BC. Elevated reproductive effort increases blood parasitaemia and decreases immune function in birds: a meta-regression approach. *Funct Ecol*. Blackwell Publishing Ltd; 2009;23(2):405–15.
  27. Knowles SCL, Palinauskas V, Sheldon BC. Chronic malaria infections increase family inequalities and reduce parental fitness: experimental evidence from a wild bird population. *J Evol Biol*. Blackwell Publishing Ltd; 2010;23(3):557–69.
  28. Asghar M, Hasselquist D, Hansson B, Zehtindjiev P, Westerdahl H, Bensch S. Hidden costs of infection: Chronic malaria accelerates telomere degradation and senescence in wild birds. *Science* (80- ). 2015;347(6220):436–8.

29. Asghar M, Palinauskas V, Zaghdoudi-Allan N, Valkiūnas G, Mukhin A, Platonova E, et al. Parallel telomere shortening in multiple body tissues owing to malaria infection. *Proc R Soc B Biol Sci.* 2016;283(1836).
30. Sánchez MI, Pons I, Martínez-Haro M, Taggart MA, Lenormand T, Green AJ. When Parasites Are Good for Health: Cestode Parasitism Increases Resistance to Arsenic in Brine Shrimps. *PLOS Pathog.* 2016;12(3):e1005459.
31. Warner RE. The Role of Introduced Diseases in the Extinction of the Endemic Hawaiian Avifauna. *Condor.* 1968 Apr;70(2):101–20.
32. Lacorte GA, Félix GMF, Pinheiro RRB, Chaves A V., Almeida-Neto G, Neves FS, et al. Exploring the Diversity and Distribution of Neotropical Avian Malaria Parasites – A Molecular Survey from Southeast Brazil. Snounou G, editor. *PLoS One.* 2013 Mar 1;8(3):e57770.
33. González AD, Matta NE, Ellis VA, Miller ET, Ricklefs RE, Gutiérrez HR. Mixed species flock, nest height, and elevation partially explain avian haemoparasite prevalence in Colombia. Braga ÉM, editor. *PLoS One. Public Library of Science;* 2014 Jan;9(6):e100695.
34. González AD, Lotta IA, García LF, Moncada LI, Matta NE. Avian haemosporidians from Neotropical highlands: Evidence from morphological and molecular data. *Parasitol Int. Elsevier Ireland Ltd;* 2015;64(4):48–59.
35. Mijares A, Rosales R, Silva-Iturriza A. Hemosporidian Parasites in Forest Birds from Venezuela: Genetic Lineage Analyses. *Avian Dis Dig.* 2012;7(3):e56–7.
36. Munro HJ, Martin PR, Moore IT, Bonier F. Blood parasites in adult and nestling birds in the ecuadorian andes. *Ornitol Neotrop.* 2009;20(3):461–5.
37. Levin II, Zwiers P, Deem SL, Geest EA, Higashiguchi JM, Iezhova TA, et al. Multiple Lineages of Avian Malaria Parasites (*Plasmodium*) in the Galapagos Islands and Evidence for Arrival via Migratory Birds. *Conserv Biol.* 2013;27(6):1366–77.
38. Svensson-Coelho M, Blake JG, Loiselle BA, Penrose AS, Parker PG, Ricklefs RE. Diversity, Prevalence, and Host Specificity of Avian *Plasmodium* and *Haemoproteus* in a Western Amazon Assemblage. *Ornithol Monogr.* 2013;76(1):1–47.
39. Merino S, Moreno J, Vásquez R a., Martínez J, Sánchez-Monsálvez I, Estades CF, et al. Haematozoa in forest birds from southern Chile: Latitudinal gradients in prevalence and parasite lineage richness. *Austral Ecol.* 2008;33(3):329–40.
40. Smith MM, Ramey AM. Prevalence and genetic diversity of haematozoa in South American waterfowl and evidence for intercontinental redistribution of parasites by migratory birds. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 2015;4(1):22–8.
41. Marzal A, García-Longoria L, Cárdenas Callirgos JM, Sehgal RN. Invasive avian malaria as an emerging parasitic disease in native birds of Peru. *Biol Invasions.* 2014 May 22;16(6).

42. Galen SC, Witt CC. Diverse avian malaria and other haemosporidian parasites in Andean house wrens: Evidence for regional co-diversification by host-switching. *J Avian Biol.* 2014;45(4):374–86.
43. Sallaberry-Pincheira N, Gonzalez-Acuña D, Herrera-Tello Y, Dantas GPM, Luna-Jorquera G, Frere E, et al. Molecular Epidemiology of Avian Malaria in Wild Breeding Colonies of Humboldt and Magellanic Penguins in South America. *Ecohealth.* 2015;12(2):267–77.
44. Palinauskas V, Kosarev V, Shapoval A, Bensch S, Valkiūnas G. Comparison of mitochondrial cytochrome b lineages and morphospecies of two avian malaria parasites of the subgenera *Haemamoeba* and *Giovannolaia* (Haemosporida: Plasmodiidae). *Zootaxa.* 2007;(1626):39–50.
45. Şekercioglu ÇH, Primack RB, Wormworth J. The effects of climate change on tropical birds. *Biol Conserv.* 2012;148(1):1–18.
46. Atkinson CT, LaPointe DA. Introduced Avian Diseases , Climate Change , and the Future of Hawaiian Honeycreepers Introduced Avian Diseases , Climate Change , and the Future of Hawaiian Honeycreepers. *J Avian Med Surg.* 2009;23(1):53–63.
47. Sehgal RNM, Buermann W, Harrigan RJ, Bonneaud C, Loiseau C, Chasar A, et al. Spatially explicit predictions of blood parasites in a widely distributed African rainforest bird. *Proc R Soc B Biol Sci.* 2011;278(1708):1025–33.
48. Beaudoin RL, Applegate JE, Davis DE, McLean RG. A Model For The Ecology Of Avian Malaria\*. *J Wildl Dis.* 1971;7(1):5–13.
49. Bensch S, Waldenström J, Jonzén N, Westerdahl H, Bengt Hansson, Sejberg D, et al. Temporal dynamics and diversity of avian malaria parasites in a single host species. *J Anim Ecol.* 2007;76(1):112–22.
50. Cosgrove CL, Wood MJ, Day KP, Sheldon BC. Seasonal variation in *Plasmodium* prevalence in a population of blue tits *Cyanistes caeruleus*. *J Anim Ecol.* Blackwell Publishing Ltd; 2008 May;77(3):540–8.
51. Fecchio A, Lima MR, Silveira P, Ribas ACA, Caparroz R, Marini MÂ. Age, but not sex and seasonality, influence Haemosporida prevalence in White-banded Tanagers (*Neothraupis fasciata*) from central Brazil. *Can J Zool.* 2015 Jan;93(1):71–7.
52. Knowles SCL, Wood MJ, Alves R, Wilkin TA, Bensch S, Sheldon BC. Molecular epidemiology of malaria prevalence and parasitaemia in a wild bird population. *Mol Ecol.* 2011;20(5):1062–76.
53. Lafferty KD, Kuris AM. How environmental stress affects the impacts of parasites. *Limnol Oceanogr.* 1999;44(3, part2):925–31.
54. Lafferty KD, Holt RD. How should environmental stress affect the population dynamics of disease? *Ecol Lett.* BLACKWELL PUBLISHING LTD; 2003;6(7).
55. Scott ME. The Impact of Infection and Disease on Animal Populations:

- Implications for Conservation Biology. *Conserv Biol.* 1988;2(1):40–56.
56. Holmes JC. Parasites as threats to biodiversity in shrinking ecosystems. *Biodivers Conserv.* 1996;5(8):975–83.
  57. Carere C, Drent PJ, Privitera L, Koolhaas JM, Groothuis TGG. Personalities in great tits, *Parus major*: stability and consistency. *Anim Behav.* 2005 Oct;70(4):795–805.
  58. Groothuis TGG, Carere C. Avian personalities: characterization and epigenesis. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005 Mar;29(1):137–50.
  59. Turecki G, Meaney M. Effects of the social environment and stress on glucocorticoid receptor gene methylation: a systematic review. *Biol Psychiatry.* 2014 Dec;
  60. Rodrigues GM, Toffoli L V, Manfredo MH, Francis-Oliveira J, Silva AS, Raquel HA, et al. Acute stress affects the global DNA methylation profile in rat brain: Modulation by physical exercise. *Behav Brain Res.* 2014 Nov 21;279C:123–8.
  61. Badyaev A V. Maternal Inheritance and Rapid Evolution of Sexual Size Dimorphism: Passive Effects or Active Strategies? *Am Nat.* 2005 Oct;166(S4):S17–30.
  62. West-Eberhard MJ. Developmental plasticity and the origin of species differences. *Proc Natl Acad Sci.* 2005 May 3;102(Supplement 1):6543–9.
  63. Essex MJ, Boyce WT, Hertzman C, Lam LL, Armstrong JM, Neumann SMA, et al. Epigenetic Vestiges of Early Developmental Adversity: Childhood Stress Exposure and DNA Methylation in Adolescence. *Child Dev.* 2013;84(1):58–75.
  64. Guerrero-Preston R, Goldman LR, Brebi-Mieville P, Ili-Gangas C, LeBron C, Witter FR, et al. Global DNA hypomethylation is associated with in utero exposure to cotinine and perfluorinated alkyl compounds. *Epigenetics.* 2010 Aug 16;5(6):539–46.
  65. Meaney MJ, Szyf M. Environmental programming of stress responses through DNA methylation: life at the interface between a dynamic environment and a fixed genome. *Dialogues Clin Neurosci.* 2005 Jan;7(2):103–23.
  66. Szyf M, Weaver ICG, Champagne FA, Diorio J, Meaney MJ. Maternal programming of steroid receptor expression and phenotype through DNA methylation in the rat. *Front Neuroendocrinol.* 2005 Jan;26(3–4):139–62.
  67. Weaver ICG. Epigenetic effects of glucocorticoids. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2009 Jun;14(3):143–50.
  68. Bossdorf O, Richards CL, Pigliucci M. Epigenetics for ecologists. *Ecol Lett.* 2008 Feb;11(2):106–15.
  69. Bensch S, Stjernman M, Hasselquist D, Ostman O, Hansson B, Westerdahl H, et al. Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and

- Haemoproteus mitochondrial DNA amplified from birds. *Proc Biol Sci.* 2000;267(February):1583–9.
70. Merino S, Moreno J, Sanz JJ, Arriero E. Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). *Proc Biol Sci.* 2000;267(1461):2507–10.
  71. Szölloosi E, Cichoń M, Eens M, Hasselquist D, Kempnaers B, Merino S, et al. Determinants of distribution and prevalence of avian malaria in blue tit populations across Europe: Separating host and parasite effects. *J Evol Biol.* 2011;24(2011):2014–24.
  72. Atkinson CT, Dusek RJ, Woods KL, Iko WM. Pathogenicity of avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. *J Wildl Dis.* 2000;36(2):197–204.
  73. Jones MR, Cheviron ZA, Carling MD. Spatial patterns of avian malaria prevalence in *Zonotrichia capensis* on the western slope of the Peruvian Andes. *J Parasitol. American Society of Parasitologists*; 2013 Oct 7;99(5):903–5.
  74. Rundel PW, Dillon MO, Palma B, Mooney HA, Gulmon SL, Ehleringer JR. The phytogeography and ecology of the coastal Atacama and Peruvian deserts. *Aliso.* 1991;13(1):1–49.
  75. Rundel PW, Villagra PE, Dillon MO, Roig-Juñent S, Debandi G. Arid and Semi-Arid Ecosystems. In: Veblen TT, Young KR, Orme AR, editors. *Physical geography of South America*. 1st Ed. Oxford, UK.: Oxford University Press; 2007. p. 158–83.
  76. Sutherland WJ, Newton I, Green R. *Bird Ecology and Conservation: A Handbook of Techniques*. *Techniques in Ecology & Conservation*. Oxford: Oxford University Press; 2004. 404 p.
  77. Merino S, Potti J, Fargallo JA. Blood parasites of passerine birds from Central Spain. *J Wildl Dis.* 1997;33(3):639–41.
  78. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.
  79. Griffiths R, Daan S, Dijkstra C. Sex identification in birds using two CHD genes. *Proc Biol Sci.* 1996;263:1251–6.
  80. Griffiths R, Double MC, Orr K, Dawson RJG. A DNA test to sex most birds. *Mol Ecol.* 1998;7:1071–5.
  81. Reyna-López GE, Simpson J, Ruiz-Herrera J. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms. *Mol Gen Genet.* 1997;253(6):703–10.
  82. R Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2015.
  83. Bolker M, R Development Core Team. *bbmle: Tools for general maximum*

- likelihood estimation. 2014. p. 30.
84. Ardia DR. Super size me: An experimental test of the factors affecting lipid content and the ability of residual body mass to predict lipid stores in nestling European Starlings. *Funct Ecol.* 2005;19(3):414–20.
  85. Bêty J, Gauthier G, Giroux JF. Body condition, migration, and timing of reproduction in snow geese: a test of condition-dependent model of optimal clutch size. *Am Nat.* 2003;162(1):110–21.
  86. Labocha MK, Hayes JP. Morphometric indices of body condition in birds: A review. *J Ornithol.* 2012;153(1):1–22.
  87. Saino N, Møller AP, Bolzern AM. Testosterone effects on the immune system and parasite infestations in the barn swallow (*Hirundo rustica*): An experimental test of the immunocompetence hypothesis. *Behav Ecol.* 1995;6(4):397–404.
  88. Oppliger A, Giorgi MS, Conelli A, Nembrini M, John-Alder HB. Effect of testosterone on immunocompetence, parasite load, and metabolism in the common wall lizard (*Podarcis muralis*). *Can J Zool.* 2004;82(11):1713–9.
  89. Dunn JC, Cole EF, Quinn JL. Personality and parasites: Sex-dependent associations between avian malaria infection and multiple behavioural traits. *Behav Ecol Sociobiol.* 2011;65(7):1459–71.
  90. Brown AWA. The Attraction of Mosquitoes to Hosts. *JAMA J Am Med Assoc.* 1966;196(3):249.
  91. Russell CB, Hunter FF. Attraction of *Culex pipiens/restuans* (Diptera: Culicidae) mosquitoes to bird uropygial gland odors at two elevations in the Niagara region of Ontario. *J Med Entomol.* 2005;42:301–5.
  92. Holmes RT. Foraging patterns of forest birds: male-female differences. *Wilson Bull.* 1986;98(2):196–213.
  93. Alexander RD. The Evolution of Social Norms. *Annu Rev Ecol Syst.* 1974;5:325–83.
  94. Tella JL. The evolutionary transition to coloniality promotes higher blood parasitism in birds. *J Evol Biol.* 2002;15(1):32–41.
  95. Fecchio A, Lima MR, Svensson-Coelho M, Marini MÂ, Ricklefs RE. Structure and organization of an avian haemosporidian assemblage in a Neotropical savanna in Brazil. *Parasitology.* 2013;140(SEPTEMBER 2012):181–92.
  96. Sebaio F, Braga EM, Branquinho F, Fecchio A, Marini MÂ. Blood parasites in passerine birds from the Brazilian Atlantic Forest. *Rev Bras Parasitol Veterinária.* 2012;21(1):7–15.
  97. Miller AH, Miller VD. The Behavioral Ecology and Breeding Biology of the Andean Sparrow, *Zonotrichia capensis*. *Caldasia.* 1968;10(47):83–154.
  98. Applegate JE. Spring Relapse of *Plasmodium relictum* Infections in an

- Experimental Field Population of English Sparrows (*Passer domesticus*). *J Wildl Dis.* 1971;7(1):37–42.
99. Benavides JA, Huchard E, Pettorelli N, King AJ, Brown ME, Archer CE, et al. From parasite encounter to infection: Multiple-scale drivers of parasite richness in a wild social primate population. *Am J Phys Anthropol.* 2012;147(1):52–63.
  100. Whiteman NK, Parker PG. Body condition and parasite load predict territory ownership in the Galapagos Hawk. *Condor.* 2004;106(January):915–21.
  101. Magallanes S, Møller AP, García-Longoria L, de Lope F, Marzal A. Volume and antimicrobial activity of secretions of the uropygial gland are correlated with malaria infection in house sparrows. *Parasit Vectors. Parasites & Vectors;* 2016;9(1):232.
  102. Dawson RD, Bortolotti GR. Effects of Hematozoan Parasites on Condition and Return Rates of American Kestrels. *Auk.* 2000;117(2):373–80.
  103. Valkiūnas G, Zickus T, Shapoval AP, Lezhova T a. Effect of *Haemoproteus belopolyskyi* (Haemosporida: Haemoproteidae) on body mass of the blackcap *Sylvia atricapilla*. *J Parasitol.* 2006;92(5):1123–5.
  104. Fecchio A, Lima MR, Silveira P, Braga ÉM, Marini MÂ. High prevalence of blood parasites in social birds from a neotropical savanna in Brazil. *Emu.* 2011;111(2):132.
  105. Lutz HL, Hochachka WM, Engel JI, Bell JA, Tkach V, Bates JM, et al. Parasite Prevalence Corresponds to Host Life History in a Diverse Assemblage of Afrotropical Birds and Haemosporidian Parasites. *PLoS One.* 2015;1–24.
  106. Winkler H, Leisler B. On the ecomorphology of migrants. *Ibis (Lond 1859).* 2008 Apr 3;134(1):21–8.
  107. Clark NJ, Clegg SM, Klaassen M. Migration strategy and pathogen risk: non-breeding distribution drives malaria prevalence in migratory waders. *Oikos.* 2016;125(9):1358–68.
  108. Sagario MC, Cueto VR, Lopez De Casenave J. Movement patterns of three species of sparrow in the central Monte desert, Argentina: Differences between and within species. *Emu.* 2014;114(3):268–76.
  109. Fudickar AM, Partecke J. The Flight Apparatus of Migratory and Sedentary Individuals of a Partially Migratory Songbird Species. *PLoS One.* 2012;7(12).
  110. King JR. Postnuptial and postjuvinal molt in rufous-collared sparrows in Northwestern Argentina. *Condor.* 1972;74:5–16.
  111. Ricklefs RE, Outlaw DC. A Molecular Clock for Malaria Parasites. *Science (80- ).* 2010 Jul 9;329(5988):226–9.