

---

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

Trabajo de Fin de Máster Titulado:

"Estructura Filogeográfica, hospedadores y virulencia de la malaria aviar por *Plasmodium relictum*"

Realizado por:

**NAYRIS DE LA CARIDAD RUBAL GRAVE DE PERALTA**

Director del proyecto:

**Dr. Juan Carlos Navarro Castro, Ph.D.**

Como requisito para la obtención del título de:

**MAGÍSTER EN BIOMEDICINA**

Quito, 12 de julio de 2023

---

## DECLARACION JURAMENTADA

Yo, **Nayris de la Caridad Rubal Grave de Peralta**, con cédula de ciudadanía 1756939771, manifiesto bajo juramento, que soy la autora del presente trabajo y que no ha sido expuesto anteriormente para optar por otros títulos de grado académico, así mismo, afirmo que he consultado las referencias bibliográficas citadas en el mismo.

Mediante esta declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



FIRMA Y CÉDULA

1756939771

---

## DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

**“Estructura Filogeográfica, hospedadores y virulencia  
de la malaria aviar por *Plasmodium relictum*”**

Realizado por:

**Nayris de la Caridad Rubal Grave de Peralta**

como Requisito para la Obtención del Título de:

MAGÍSTER EN BIOMEDICINA

ha sido dirigido por el profesor

**JUAN CARLOS NAVARRO CASTRO**

quien considera que constituye un trabajo original de su autora



FIRMA

---

# LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

**DÁMARIS INTRIAGO BALDEÓN**

**GIANINA SUÁREZ RODRÍGUEZ**

Después de revisar el trabajo presentado,  
lo han calificado como apto para su defensa oral ante

el tribunal examinador



FIRMA



FIRMA

Quito, 12 de julio de 2023

---

## **DEDICATORIA**

*Al Artífice de mis metas científicas.*

*A NS. de la Caridad.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*Al profesor Juan Carlos Navarro, por alentarme a “dividir mi vida” entre la Anestesiología y la Bioinformática; por sus aportes oportunos, imprescindibles y siempre valiosos; por confiar en mí.*

*A la profesora Dámaris Intriago Baldeón, por su excelencia educativa, ética y humana.*

---

Este trabajo de tesis fue realizado bajo el Programa de Investigación:

**SALUD GLOBAL**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**Proyecto DII-P011617\_2 (JCN)**

Artículo de tesis

# Estructura Filogeográfica, hospedadores y virulencia de la malaria aviar por *Plasmodium relictum*

Nayris Rubal<sup>1,2</sup>, Juan-Carlos Navarro<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Maestría en Biomedicina, Fac Cs Salud, UISEK; [nayris.rubal@uisek.edu.ec](mailto:nayris.rubal@uisek.edu.ec); [juancarlos.navarro@uisek.edu.ec](mailto:juancarlos.navarro@uisek.edu.ec)

<sup>2</sup> Especialista de Primer Grado en Anestesiología y Reanimación, HMNSM; [nrubal@hospitalmunicipal.gob.ec](mailto:nrubal@hospitalmunicipal.gob.ec)

<sup>3</sup> Grupo de Enfermedades Emergentes, Desatendidas, Ecoepidemiología y Biodiversidad, Fac Cs Salud, UISEK; [juancarlos.navarro@uisek.edu.ec](mailto:juancarlos.navarro@uisek.edu.ec)

\* Autor de Correspondencia: [juancarlos.navarro@uisek.edu.ec](mailto:juancarlos.navarro@uisek.edu.ec)

**Resumen:** La malaria aviar es una enfermedad frecuente entre las aves y representa una amenaza para la avifauna global. Es causada por un grupo diverso de parásitos hemospordios, entre ellos, *Plasmodium relictum*, especie altamente invasiva por su diversidad genética y distribución cosmopolita. Aún no está exactamente dilucidado si existe correlación entre la estructura filogeográfica de *Plasmodium relictum* con los fenotipos diferenciales de virulencia en la malaria aviar, por lo que se correlacionó dicha estructura con los fenotipos diferenciales de virulencia expresados por las aves infectadas. Mediante Parsimonia Máxima, hicimos una reconstrucción filogenética del parásito a partir de secuencias parciales del gen del Citocromo *b*. Para el análisis filogeográfico, generamos redes de haplotipos con el algoritmo *TCS Network*. El linaje genético SGS1 resultó el más cosmopolita, prevalente entre los hospedadores y el más virulento. El orden Passeriformes incluyó la mayor diversidad de aves afectadas. La dinámica de la parasitemia ocasionada por *Plasmodium relictum* está en correspondencia con el estado de infección de las aves y con los fenotipos diferenciales de virulencia y es una variable que se infiere en el patrón de la estructura genética-poblacional del parásito y por el gradiente altitudinal. La estructura filogeográfica de *Plasmodium relictum* demuestra que el estado de infección de las aves ha seleccionado fenotipos diferenciales de virulencia en la malaria aviar.

**Palabras clave:** Malaria, Aves, *Plasmodium*, Filogenética, Parasitemia, Gradiente altitudinal

**Abstract:** Avian malaria is a common disease among birds and represents a threat to the global avifauna. It's caused by a diverse group of hemospordian parasites, including *Plasmodium relictum*, a highly invasive species due to its genetic plasticity and cosmopolitan distribution. The genetic-spatial structure of this group of hemoparasites has been related to the infection status of birds, however, it is still not exactly elucidated how the phylogenetic and phylogeographic differences of *Plasmodium relictum* intervenes in the differential virulence phenotypes of avian malaria. The phylogeographic structure of this morphospecies was correlated with the virulence phenotypes expressed by the infected birds. Using Maximum Parsimony, we made a phylogenetic reconstruction of the population-genetic structure of the parasite from partial sequences of the Cytochrome *b* gene. For the phylogeographic analysis, we generated haplotype networks with the *TCS Network* algorithm. The SGS1 genetic lineage was the most cosmopolitan, prevalent and virulent. The order Passeriformes included the greatest diversity of affected birds. *Plasmodium relictum* showed versatility in the dynamics of parasitemia, that was in correspondence with the state of infection of the birds. In addition, it was a variable dependent on the genetic-population structure of the parasite and the altitudinal gradient. The phylogeographic structure of *Plasmodium relictum* influences the infection status of birds and predisposes to differential virulence phenotypes in avian malaria.

**Keywords:** Malaria, Birds, *Plasmodium*, Phylogenetics, Parasitemia, Altitudinal gradient

## 1. Introducción

La malaria aviar es una enfermedad infecciosa que ha provocado la extinción de numerosas especies de aves en distintas áreas geográficas (Harvey-Samuel et al., 2021). Es causada por parásitos eucariotas unicelulares, entre ellos, los hemosporidios, propagados por vectores dípteros hematófagos (Nourani et al., 2020). Aunque han transcurrido más de 130 años de su descubrimiento, ha trascendido como el sistema modelo de estudio experimental que ha permitido comprender mejor la ecología y la evolución de los parásitos *Plasmodium* de la malaria humana (Ishtiaq, 2021).

Las aves infectadas experimentan anemia por hemólisis, fiebre, anorexia, pérdida de peso, complicaciones respiratorias, trastornos neurológicos y debilidad extrema, lo cual se refleja en un aumento del estrés, en la reducción de su éxito reproductivo, dificultad para alimentarse y la muerte, en los casos más graves (Atkinson, 2009; Grilo et al., 2016). Las lesiones orgánicas más importantes se observan en hígado, bazo, pulmones y cerebro debido a zonas isquémicas, provocadas por los embolismos derivados de las formas extra eritrocitarias del parásito (Ferrel et al., 2007). El período de mayor parasitemia (porcentaje de glóbulos rojos infectados) define la fase aguda de la infección, donde el fallo multiorgánico es frecuente y da lugar a elevadas tasas de mortalidad; las aves que sobreviven progresan a la fase crónica, con efectos subclínicos sobre la reproducción, la aptitud del hospedador (susceptibilidad o tolerancia) y la supervivencia; en esta fase, el nivel de parasitemia es muy bajo y el debilitamiento inmunitario puede provocar exacerbaciones de la enfermedad (Valkiunas, 2005).

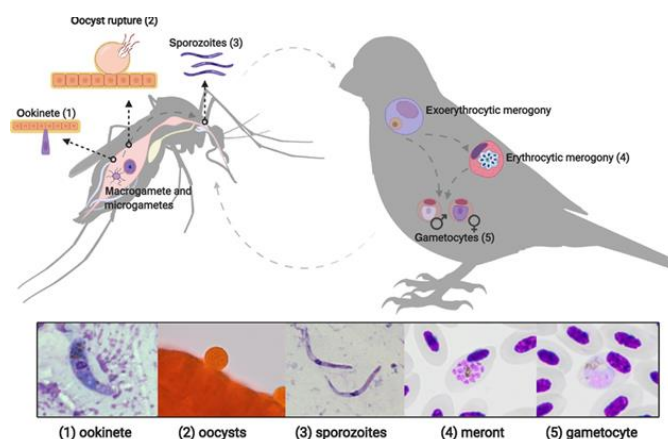
Los hemosporidios aviarios presentan una amplia diversidad genética que se expresa a través de los haplotipos mitocondriales que circulan entre las poblaciones de aves; cada haplotipo exhibe un comportamiento virulento diferente (Hellgren et al., 2021), en consecuencia, podrían presentarse distintos efectos nocivos en las aves, con variaciones en su estado de infección y cuya expresión individual en la malaria aviar podría ser subclínica, leve o grave (fenotipos diferenciales de virulencia) y dependerá de la respuesta a la interacción entre la susceptibilidad o tolerancia del sistema inmunitario del anfitrión y la virulencia del haplotipo (García-Longoria et al., 2019).

Durante los brotes de paludismo aviar, se ha observado una prevalencia y mortalidad mayor en aves jóvenes; en contraste, en aves adultas, las tasas de mortalidad suelen ser bajas y los individuos son generalmente asintomáticos (Atkinson & La Pointe, 2009). Recientemente, se descubrió que esta enfermedad acelera la senescencia de las aves debido a la degradación de los telómeros (Böhme et al., 2018). Algunas especies, como *Quiscalus mexicanus* y *Sula nebouxii*, parecen ser más tolerantes a la malaria aviar, tal vez, porque se infectaron con los linajes específicos de los parásitos locales y se convirtieron en reservorios con baja parasitemia; porque las condiciones medioambientales de su hábitat propiciaron la ausencia de vectores competentes o por una respuesta genética de resistencia mediada por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (HMC) (Pacheco et al., 2022; Roldán-Zurabián et al., 2022).

La malaria aviar puede invadir los ecosistemas mediante la introducción de aves no paseriformes migratorias infectadas y por la liberación de paseriformes no autóctonos infectados (Chalkowski et al., 2018). Todas las aves son proclives a padecer la enfermedad, exhibiendo altos niveles de mortalidad o invalidez, hecho que representa una amenaza para la avifauna global, sin embargo, los estudios relacionados con el paludismo aviar se han centrado mayoritariamente en las aves paseriformes (Marzal et al., 2011).

*Plasmodium relictum* es un parásito protozoario del orden Haemosporida, *phylum* Apicomplexa, que posee un ciclo de vida heteroxeno, donde los hospederos definitivos son los mosquitos (familia Culicidae), especialmente los del género *Culex* como *Culex pipiens* L. y *Culex quinquefasciatus* Wiedemann, catalogados como sus vectores de transmisión más comunes, aunque se han identificado especies de los géneros *Aedes*, *Lutzia*, *Culiseta* y *Anopheles* como otros vectores potenciales (La Puente et al., 2012; Gutiérrez-López et al., 2020), mientras que los hospedadores intermediarios son las aves. Su ciclo de vida (**Fig. 1**) incluye la reproducción sexual en vectores dípteros y la reproducción asexual en las aves mediante dos etapas: eritrocítica y exoeritrocítica (Valkiunas et al., 2005).

**Figura 1.** Ciclo de vida de *Plasmodium relictum* en hospedadores vertebrados e invertebrados. (Tomado de: Martínez-de la Puente et al., 2021)





El ciclo se inicia cuando un mosquito (hembra hematófaga) adquiere el protozooario presente en la sangre de un ave infectada y se convierte en su vector propagando la enfermedad a través de la saliva (Ishtiaq, 2021). Los esporozoítos se convierten en merontes exoeritrocíticos (criptozoítos) en las células reticuloendoteliales, seguido por el desarrollo de los merozoítos en la segunda etapa exoeritrocítica preeritrocítica generando los metacriptozoítos (Valkiūnas et al., 2005). Alternativamente, los merozoítos de los metacriptozoítos ingresan al torrente sanguíneo para infectar a los eritrocitos y convertirse en merontes; también, pueden dar lugar a una forma exoeritrocítica, donde los fanerozoítos poseritrocíticos desarrollan generaciones adicionales de fanerozoítos o se convierten en merozoítos (Valkiūnas et al., 2005; Grilo et al., 2016). A partir de los merozoítos, el ciclo eritrocitario continúa con el desarrollo de micro/macrogametocitos masculinos y femeninos, los cuales son capaces de infectar a otro mosquito para comenzar el proceso de esporogonia en el próximo hospedero (Grilo et al., 2016, Valkiūnas & Iezhova, 2017). Una vez dentro del mosquito, los gametocitos se convierten en gametos en el intestino medio y se unen para formar un cigoto; posteriormente, se desarrollan los oocinetos, que viajan desde el intestino medio hasta el epitelio, lo cual promueve su desarrollo en ooquistes. Dentro de los ooquistes, se forman esporozoítos haploides infecciosos que estallan a través de la pared del ooquiste una vez que alcanzan la madurez. Estos esporozoítos haploides invaden las glándulas salivales del mosquito y pueden transferirse a otra ave cuando el vector se alimenta de su sangre (Grilo et al., 2016).

La existencia de gametocitos en las aves corrobora la etapa de infectividad ocasionada por el parásito, en tanto, la definición de vector competente para el mosquito está determinada por la presencia de esporozoítos en sus glándulas salivales (Ishtiaq, 2021).

A pesar de que los hemosporidios son uno de los grupos de parásitos de aves mejor estudiados, continúan realizándose investigaciones encaminadas a discernir su especialización entre las aves hospedadoras y la variación en la prevalencia entre áreas geográficas y entre taxones de hospedadores (Rivero & Gandon, 2018).

La base de datos MalAvi (*A database for avian haemosporidian parasites*) ha reportado la existencia hasta la fecha de más de 3500 de linajes genéticos de hemosporidios que infectan alrededor de 1700 especies de aves (Bensch et al., 2009). La especie *Plasmodium relictum* Grassi & Feletti definida morfológicamente, consta de varios linajes genéticos crípticos del gen mitocondrial citocromo *b*, de ellos, los más extendidos son SGS1, GRW11 y GRW04 (Ellis & Bensch, 2018); también se le atribuyen los haplotipos LZFUS01, PHCOL01, entre otros, lo cual, revela una diversidad genética intraespecífica significativa (Valkiūnas et al., 2018).

Las diferencias filogenéticas intraespecíficas de *Plasmodium relictum* reveladas por estudios moleculares, superan el número de morfoespecies sugeridas por la taxonomía tradicional, hecho que ha generado dudas sobre la veracidad de la sistemática clásica de los hemosporidios y del conocimiento establecido sobre la especificidad del hospedador (Dimitrov et al., 2015).

El Citocromo *b* (*ctyb*), es considerado la base de la mayor parte del conocimiento de la historia evolutiva de los parásitos hemosporidios aviares. Este gen codifica proteínas involucradas en el metabolismo energético del parásito que tiene lugar en el vector (Pacheco et al., 2018). Por lo tanto, es más probable que las inferencias filogenéticas basadas en el gen *cyt-b* reflejen la evolución del desarrollo hemosporidiano en los vectores en lugar del vertebrado anfitrión. Estudios recientes han demostrado que esta hipótesis es acertada, tanto para los vectores, como para los patrones de desarrollo reflejados en las inferencias filogenéticas reconstruidas a partir de este gen (Fecchio et al., 2020).

Los linajes genéticos de *Plasmodium relictum*, tienen la capacidad de infectar a una amplia gama de familias de aves de distintos órdenes taxonómicos en diversas áreas geográficas; su comportamiento varía desde la infección altamente específica de una especie hospedadora hasta la infección de numerosas especies hospedadoras de aves lejanamente emparentadas. Su nivel de especialización puede cambiar en respuesta al medio ambiente y a la diversidad de los anfitriones (Valkiūnas et al., 2018).

Los patrones de distancia geográfica también están relacionados con la filogenética de este parásito; algunos haplotipos mitocondriales prevalecen en zonas tropicales y templadas del Viejo Mundo, mientras que otros se distribuyen globalmente, aunque su transmisión se limita a áreas con climas cálidos (Hellgrin et al., 2014; Nourani et al., 2020).

*Plasmodium relictum* es catalogado como una de las especies invasoras más importantes. Ha infectado a más de 300 especies diferentes de aves en todos los continentes, excepto en la Antártida, debido a sus condiciones ambientales. Su prevalencia y diversidad genética rivaliza con cualquier otro tipo de parásito que cause malaria en vertebrados (Rivero & Gandon, 2018).

Su propagación hacia nuevas regiones geográficas plantea un riesgo potencial para las poblaciones de aves autóctonas y de áreas protegidas y/o patrimoniales, pues podría ser muy virulento para los anfitriones locales ante la falta de adaptación evolutiva en respuesta a la introducción previa del parásito (Sorci et al., 1997; Videvall et al., 2020). Adicionalmente, *Plasmodium relictum* GRW04 fue el responsable de los efectos catastróficos que sufrió la avifauna nativa de Hawái tras la introducción accidental del mosquito *Culex quiquefasciatus* en una carga marítima, ocasionando altos niveles de mortalidad en los mieleros hawaianos, cuya población actualmente se encuentra en declive (Warner, 1968; La Puente et al., 2005).

Durante los últimos 15 años se han recopilado datos sobre los hospedadores, la distribución geográfica, los vectores, la virulencia y otras características biológicas de *Plasmodium relictum*, lo cual, ha posibilitado examinar algunos mecanismos que influyen en la epidemiología de la malaria aviar (Hellgren et al., 2015; Nourani et al., 2020). Algunos estudios, han revelado que la prevalencia del parásito en los hospedadores y su diversidad genética son atributos relacionados con su virulencia (Bensch et al., 2009).

La probabilidad de que la malaria aviar afecte negativamente a las aves a medida que se propaga a nuevas áreas geográficas es muy alta; se ha constatado un incremento en el número de especies de aves extintas en los ecosistemas recién invadidos por los hemosporidios (Miranda et al., 2022; Fecchio et al., 2020). *Plasmodium relictum* es considerado una especie *sui generis* entre el gran grupo de hemoparásitos aviarios; su extensa ubicuidad geográfica, su amplia frecuencia de distribución entre aves y mosquitos y su diversidad genética le han conferido un gran éxito en su comportamiento generalista (Valkiūnas et al., 2018).

Estudios puntuales (Gil-Vargas & Sedano-Cruz, 2019), han relacionado de manera general, la estructura genética-espacial de los hemosporidios aviarios con el estado de infección de las aves; sin embargo, aún se desconoce si existe correspondencia entre la estructura filogeográfica de *Plasmodium relictum* con los fenotipos diferenciales de virulencia de la malaria aviar, lo cual, brinda la oportunidad de desarrollar nuevas investigaciones que permitan comprender con mayor precisión la biología invasiva del parásito a través de dicha estructura.

La diversidad genética de *Plasmodium relictum* podría promover la aparición de nuevos haplotipos mitocondriales resistentes a los medicamentos que tradicionalmente son utilizados en el tratamiento de la malaria aviar; este es un aspecto que se debe tener en cuenta al momento de desarrollar futuras estrategias para el manejo de la enfermedad. Es necesario comprender a profundidad la evolución molecular de este hemoparásito, así, se podrán fomentar programas de contención de sus haplotipos que puedan considerarse como los más virulentos. Por otra parte, se requiere invertir recursos y esfuerzo para que la malaria aviar deje de representar una amenaza para la avifauna. Las poblaciones de aves constituyen un patrimonio genético para la biodiversidad y conforman la riqueza biológica de cada área geográfica en particular. Por ello, mantenerlas con una buena salud permitirá que formen parte de programas de reproducción, reintroducción o de incremento de especies *in situ* (Miranda et al., 2022).

Para comprender exactamente la intervención de las diferencias filogenéticas y filogeográficas del parásito en la virulencia de la malaria aviar, este estudio se enfocó en correlacionar la estructura filogeográfica de *Plasmodium relictum* con los fenotipos diferenciales de virulencia que expresan las aves infectadas y planteamos la hipótesis de que *la estructura filogeográfica de Plasmodium relictum está correlacionada con el estado de infección de las aves en la predisposición de fenotipos diferenciales de virulencia en la malaria aviar.*

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Selección del gen citocromo b como marcador para el análisis e identificación de los linajes genéticos de *Plasmodium relictum*

Se seleccionó el gen *cty-b* del DNA mitocondrial (mtDNA) para la identificación molecular de los linajes genéticos de *Plasmodium relictum*, por considerarse la región de código de barras para los hemospodios aviarios (Valkiūnas et al., 2018). Las variaciones en este gen, han permitido clasificar a los haplotipos mitocondriales en los parásitos protozoarios del phylum Apicomplexa (Bensch et al., 2000). Estudios moleculares efectuados a partir de un segmento del gen *cyt-b*, han revelado una gran diversidad genética de los parásitos *Plasmodium* que infectan a las aves, entre ellos, *Plasmodium relictum* (Clark et al., 2014; Videvall, 2019). Esta identificación molecular ha sido validada con técnicas como la secuenciación de transcriptomas, la amplificación selectiva del genoma completo del hemoparásito, la reacción en cadena de la polimerasa multiplex (mPCR) y recientemente, por captura de secuencias mediante sondas de hibridación en aves infectadas experimentalmente con *Plasmodium relictum* (Videvall, 2021, 2019; Meister et al., 2022; Ellis et al., 2022).

### 2.2 Muestreo de secuencias en GenBank y MalAvi

Se incluyeron 49 secuencias nucleotídicas de *Plasmodium relictum* disponibles en la base de datos de *National Center for Bioinformatic Information (NCBI)*, GenBank. Se integraron secuencias/haplotipos mitocondriales procedentes de distintas regiones geográficas en el mundo. Para identificar los linajes genéticos no etiquetados en el GenBank, (DQ451403.1, EF011193.1, DQ451407.1, KT363870.1, DQ659555.1, DQ659556.1), las secuencias se alinearon con secuencias de referencia depositadas en la base de datos MalAvi, usando el algoritmo BLASTn (Zheng et al., 2000). Se describió una coincidencia al existir un 100 % de similitud entre las identidades de los pares de bases compatibles con linajes etiquetados para *Plasmodium relictum*, de acuerdo con el protocolo de nomenclatura de MalAvi (Bensch et al., 2009).

### 2.3 Alineamiento de secuencias y construcción de la matriz

Las secuencias genéticas se alinearon para construir una matriz de homología de secuencias empleando el alineamiento múltiple, con el algoritmo MUSCLE del software MEGA 11 (Tamura et al., 2021). Como resultado, se obtuvo una matriz de 51 secuencias parciales x 269 pares de bases (pb) del gen *cty-b* del mtDNA. El grupo externo estuvo determinado por secuencias parciales *cty-b* de *Plasmodium cathemerium* y *Plasmodium gallinaceum*, por ser especies evolutivamente cercanas al compartir la misma categoría taxonómica.

### 2.4 Análisis filogenético

El análisis filogenético molecular fue realizado a partir de la matriz generada previamente. Se construyeron árboles filogenéticos (*Bootstrap consensus tree*, *Phylogram*) con el software MEGA 11 empleando el método de Parsimonia Máxima (PM). Para la obtención del filograma PM se utilizó el algoritmo de corte y reconexión de ramas (*Tree-Bisection-Reconnection-TBR*) con nivel de búsqueda 1, en el cual, los árboles iniciales se obtuvieron a través de la adición aleatoria de secuencias por medio de 100 repeticiones (Nei & Kumar, 2000). Las posiciones de codón incluidas fueron 1<sup>a</sup>+2<sup>a</sup>+3<sup>a</sup>+Sin codificación.

En la presentación final del filograma, fueron colocados el número de acceso a GenBank, la nomenclatura de los haplotipos en correspondencia con los protocolos de la base de datos MalAvi, además de la simbología asignada por los autores para identificar el orden taxonómico de los hospedadores y las regiones geográficas en que se muestrearon los haplotipos (Anexo 1). Los países fueron designados a las regiones geográficas de acuerdo con el geoesquema de las Naciones Unidas (División de Estadística de las Naciones Unidas 2020), pero se realizó una variación al unificar las regiones de Europa Septentrional y Meridional con Europa Occidental. Los clados se definieron con letras mayúsculas. El soporte de nodos se evaluó utilizando 1000 pseudorréplicas de arranque, con valores de corte superiores al 50 % para el árbol final; los caracteres no informativos fueron excluidos. La versión final del árbol se dibujó a escala, con longitudes de rama calculadas utilizando el método de ruta promedio; las longitudes de las ramas fueron medidas en base al número de sustituciones por sitio.

Para mostrar la distribución de los linajes genéticos entre las familias taxonómicas de especies hospedadoras (Anexo 1), se generó la red de haplotipos con el algoritmo *TCS Network* mediante el software PopArt 1.7, a partir del conjunto de secuencias empleadas para el análisis filogenético, exportadas en una matriz Nexus. Se calculó el estadístico D de la prueba de neutralidad de Tajima (Tajima, 1989).

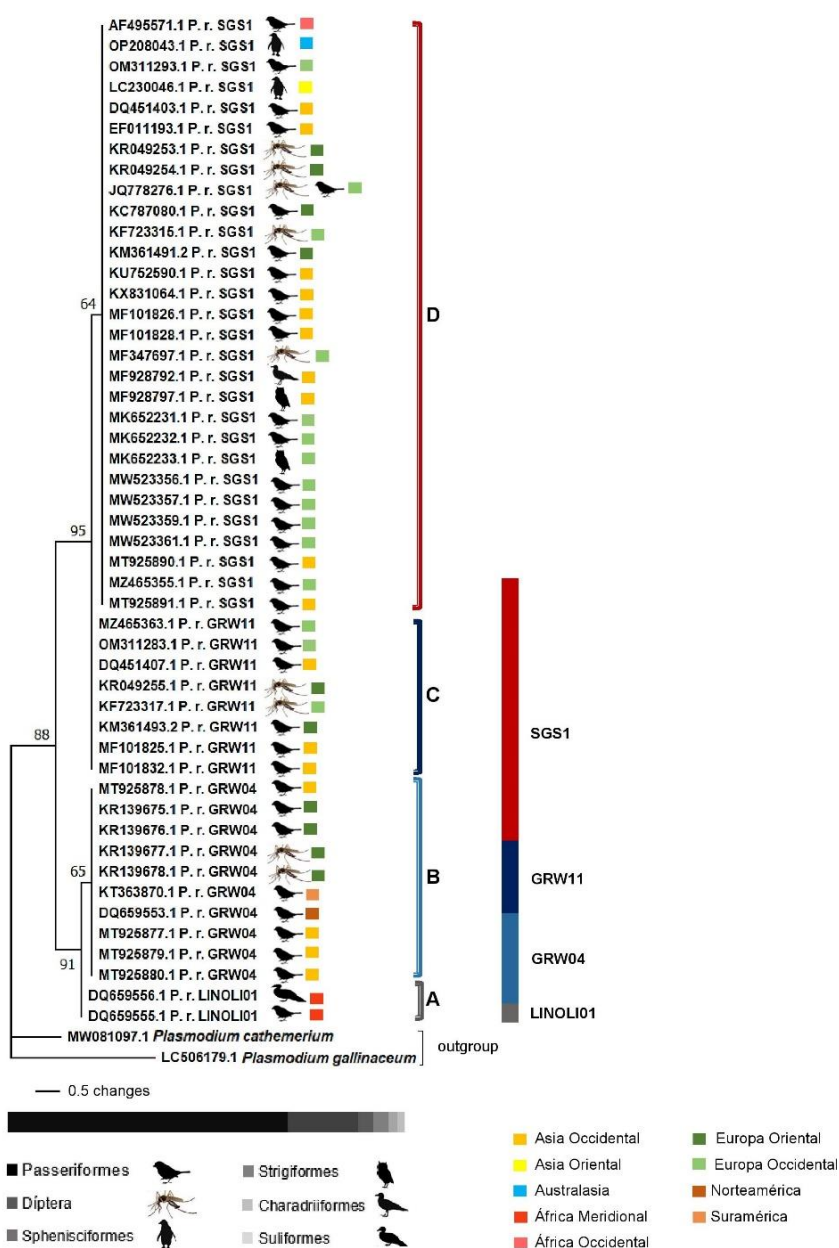
### 2.5 Análisis filogeográfico

En la matriz Nexus se incorporaron *clustering Geotags*, con la nomenclatura de los haplotipos, la latitud y la longitud geográfica de los países donde fueron muestreados y el número de veces de muestreo por país. El mapa geográfico con la distribución mundial de los haplotipos se creó a través del algoritmo *TCS Network* con el software PopArt 1.7.

### 3. Resultados

El árbol más parsimonioso (Fig. 2) tuvo una longitud total igual a 31. El índice de consistencia (CI) fue de 0,97 (0,92), el índice de retención (RI) mostró un valor de 0,99 (0,99) y el índice compuesto (RCI) fue igual a 0.96 (0.91) para todos los sitios y sitios informativos de parsimonia (entre paréntesis), exponiendo una matriz de alta homología y baja homoplasia (eventos paralelos o convergentes). El porcentaje de pseudorréplicas agrupados en la prueba de arranque (1000 repeticiones de bootstrap) aparece junto a las ramas (Felsenstein, 1985). El conjunto de datos finales tuvo un total de 269 posiciones.

**Figura 2.** Filograma de Parsimonia Máxima de *Plasmodium relictum* en el análisis de los linajes genéticos del gen *cty-b* (Taxa=51, fragmento de 269 pb). Los valores de soporte nodal (> 50 %) se muestran encima de las ramas. El árbol se enraizó con secuencias parciales del gen *cty-b* de *Plasmodium cathemerium* y *Plasmodium gallinaceum*, que determinan el grupo externo en la base del árbol. Las letras A, B, C y D identifican los clados que definen los linajes genéticos de *Plasmodium relictum*, su relación con el orden taxonómico de especies hospedadoras y con la ubicación de los haplotipos por muestreo geográfico. La barra vertical correlaciona la frecuencia de distribución de los haplotipos por clado y la barra horizontal con el orden taxonómico de las especies anfitrionas.



La reconstrucción filogenética de *Plasmodium relictum* mediante PM expuso cuatro clados monofiléticos bien respaldados por los valores de bootstrap, formados por los haplotipos mitocondriales LINOLIO1 (A), GRW04 (B), GRW11 (C) y SGS1 (D). De acuerdo con la topología del árbol, los linajes SGS1 y GRW11 se presentaron como grupos hermanos, el haplotipo LINOLIO1 como el linaje más ancestral y el haplotipo GRW04 como una variante evolutiva no lejana del anterior.

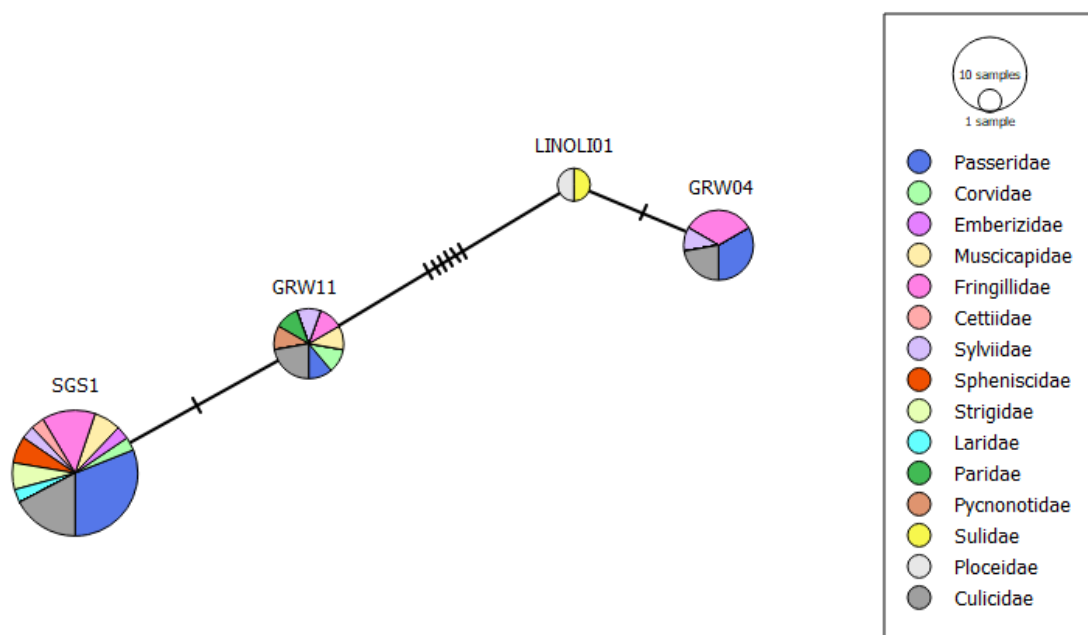
*Plasmodium relictum* SGS1 expuso la mayor prevalencia entre todos los registros de hospedadores, relacionándose con especies de distintos órdenes taxonómicos, que comprenden Passeriformes, Díptera, Sphenisciformes, Strigiformes y Charadriiformes, conformando el mayor clado (D); fue relevante su presencia en los pingüinos *Spheniscus humboldti* (OP208043.1) y *Antipodas megadyptes* (LC230046.1), estas aves, por lo general son especies cautivas. Adicionalmente, una secuencia de este linaje fue compartida por un hospedador aviar y un mosquito (JQ778276.1), hecho que expuso claramente el ciclo de vida heteroxeno del parásito. En términos de rango geográfico, su distribución fue la más extensa, que, junto a su presencia en una amplia gama de hospedadores, son razones para considerarlo un parásito muy exitoso. *Plasmodium relictum* GRW04 constituyó el segundo grupo más extenso en relación con sus hospedadores (clado B), sin embargo, solo fue muestreado en aves passeriformes y vectores dípteros, al igual que su homólogo *Plasmodium relictum* GRW11. De acuerdo con la ubicación geográfica, ambos linajes resultaron comunes en el Viejo Mundo, sin embargo, *Plasmodium relictum* GRW04 expuso mayor ubicuidad con su introducción en el Nuevo Mundo. Al igual que los anteriores, *Plasmodium relictum* LINOLIO1 fue muestreado en el orden Passeriforme, además, en un ave suliforme que habita en humedales costeros (DQ659556.1). La ubicación geográfica de este linaje quedó restringida a África Meridional.

Los mosquitos (familia Culicidae) *Culex pipiens* (secuencias JQ778276.1, KF723315.1, MF347697.1, KF723317.1, KR139677.1); *Aedes (Ochlerotatus) cantans* (secuencias KR049253.1, KR049254.1, KR049255.1) y *Culex quinquefasciatus* (KR139678.1) fueron identificados como los vectores potenciales para la transmisión de *Plasmodium relictum* SGS1, GRW11 y GRW04 en regiones geográficas con condiciones climáticas variables.

Las aves passeriformes mostraron la mayor prevalencia como anfitriones de la morfoespecie *Plasmodium relictum* a través de su estructura genética-poblacional. Los gorriones (*Passer domesticus* y *Passer montanus*) fueron los hospedadores más comunes.

La red de haplotipos (Fig. 3) incluyó 49 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones con menos del 95 % de cobertura del sitio, permitiéndose menos del 5 % de brechas de alineación, datos faltantes y bases ambiguas en cualquier posición (Tajima, 1989). Hubo un total de 269 posiciones en el conjunto de datos finales. El valor del estadístico D de la prueba de neutralidad de Tajima fue de 1.98.

**Figura 3.** Red de haplotipos mitocondriales del gen *cty-b* de *Plasmodium relictum* (Taxa=49, fragmento de 269 pb). Los círculos representan a los haplotipos y el tamaño de los mismos es proporcional al número de hospedadores que fueron muestreados para cada haplotipo. Las líneas cortas transversales corresponden al número de mutaciones que diferencian a los linajes genéticos. Los nombres de los haplotipos aparecen en los círculos asociados. Las familias taxonómicas de los hospedadores están representadas con diferentes colores.



La topología de la red, expuso a los haplotipos SGS1 y GRW04 como los de más reciente evolución y al haplotipo LINOLIO1 como el más antiguo; probablemente, los haplotipos GRW04, GRW11 y SGS1 sean sus descendientes, sin embargo, la ubicación del haplotipo GRW04 lo distinguió como un linaje evolutivamente independiente de los linajes

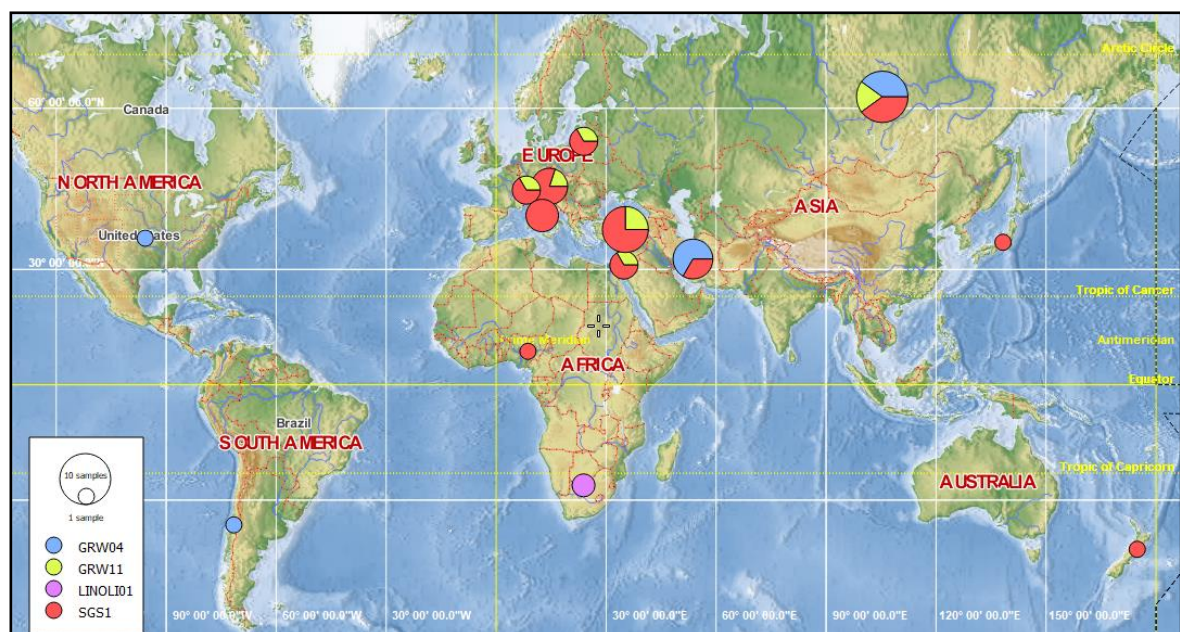
GRW11 y SGS1. Los haplotipos LINOLI01 y GRW04, al igual que los haplotipos SGS1 y GRW11, están diferenciados por una mutación, mientras que a los haplotipos LINOLI01 y GRW11 los separaron seis pasos mutacionales, hecho que refleja una alta divergencia genética.

De acuerdo con el valor positivo del estadístico D de la prueba de neutralidad de Tajima, los niveles de polimorfismos de alta frecuencia resultaron bajos en la estructura genética-poblacional de la morfoespecie *Plasmodium relictum*. Pudo existir una selección a través de mutaciones que ha mantenido baja la variedad intraespecífica, o, es evidencia de una contracción poblacional por un cuello de botella por deriva génica.

La red de haplotipos también reveló que los linajes genéticos analizados no se distribuyeron uniformemente entre las aves hospedantes. El linaje SGS1 exhibió la mayor heterogeneidad de hospedadores, con la más alta frecuencia de distribución entre especies de distintas familias taxonómicas, lo cual, determinó que resultara el haplotipo prevalente. Fue muestreado en varias especies pertenecientes a 10 de las 15 familias identificadas, resaltando en Passeridae, Fringillidae, Spheniscidae, Strigidae y Muscicapidae, y menos relevante resultó para Corvidae, Emberizidae, Cettiidae y Laridae. El haplotipo GRW11 también tuvo una frecuencia de distribución significativa, pero asociado a especies lejanamente emparentadas, hecho que se manifestó al ser muestreado en tan solo un hospedador para Passeridae, Corvidae, Muscicapidae, Sylviidae, Paridae y Picnonotidae; en tanto, el haplotipo GRW04 se concentró en un menor espectro de familias, pero resultó muestreado en varias especies de Passeridae y Fringillidae; no así para Sylviidae. En contraste, el haplotipo LINOLI01 tuvo la más baja frecuencia de distribución, probada en una especie de las familias Sulidae y Ploceidae respectivamente. *Culicidae*, reafirmó su papel esencial en el ciclo de transmisión de la malaria aviar. *Plasmodium relictum* SGS1 se registró en el mayor número de vectores.

La **figura 4**, exhibe la distribución mundial de *Plasmodium relictum* a través de sus linajes genéticos.

**Figura 4.** Mapa con la distribución mundial de los linajes genéticos de *Plasmodium relictum* SGS1, GRW04, GRW11 y LINOLI01. Los círculos representan a los haplotipos y el tamaño de los mismos es proporcional al número de hospedadores que fueron muestreados con el haplotipo. Cada haplotipo está representado por un color.



Al observar de manera individual la filogeografía de los linajes SGS1, GRW11, GRW04 y LINOLI01 resaltó un patrón de distribución espacial más diferenciado. El haplotipo SGS1 no se presentó en el Nuevo Mundo, sin embargo, se ubicó en África Occidental y en el resto de las regiones europeas y asiáticas, adicionalmente, se muestreó en aves residentes en Japón y Nueva Zelanda. La extensa distribución de *Plasmodium relictum* SGS1 sugiere que presenta una transmisión activa en regiones con climas tropicales y templados, al igual que *Plasmodium relictum* GRW04, que se relacionó con hospedadores que habitan en Norteamérica y Suramérica, además, en aves migratorias de corta distancia en Europa Oriental y Asia Occidental. En contraste, el linaje GRW11 pareció estar limitado a Europa Oriental y Occidental, donde el clima es templado. *Plasmodium relictum* LINOLI01 se adjudicó la mayor restricción geográfica, para un clima tropical; estuvo vinculado con dos aves endémicas de África meridional.

#### 4. Discusión

Con más de cien años de investigación y de esfuerzos para su contención, la malaria aviar continúa extirpando aves de la naturaleza. Los diferentes fenotipos de virulencia que expresan las aves infectadas, parecen ser el resultado de una compleja interacción entre los hospedadores y la estructura filogeográfica de hemoparásitos como *Plasmodium relictum*.

Los haplotipos mitocondriales examinados en este estudio constituyen los representantes característicos de la morfoespecie *Plasmodium relictum* (Valkiūnas et al., 2018), excepto el linaje LINOLI04, que no ha sido de los más estudiados (Ishtiaq et al., 2012). Los haplotipos SGS1 y GRW11 solo difieren genéticamente en un 0.2 % (Valkiūnas et al., 2018), mientras que las diferencias genéticas entre los haplotipos SGS1 y GRW04 varían en un 1.8 % de nucleótidos en el gen *cty-b* (Valkiūnas et al., 2018; Bensch et al. 2009), por lo que pudieran considerarse especies crípticas debido a las divergencias en sus genes nucleares (Hellgren et al., 2015; Garcia-Longoria et al., 2014), de otra parte, la similitud moderada de la secuencia de mtDNA sugiere una división evolutiva reciente entre estos dos linajes (Hellgren et al., 2015). Estas descripciones moleculares coinciden con los hallazgos encontrados a través de la reconstrucción filogenética de *Plasmodium relictum* desarrollada por nosotros.

Wiersch et al. (2005) compararon los valores de distancias genéticas para el gen *cty-b* entre las especies *Plasmodium relictum*, *Plasmodium cathemerium* y *Plasmodium gallinaceum*, los resultados obtenidos corroboraron similitudes de secuencias superiores a un 90 y hasta un 95 %, esto apoya las cercanas relaciones filogenéticas entre estas especies, adicionalmente, respalda al Citocromo *b* como un excelente marcador molecular para la identificación de los hemosporidios aviares (Dimitrov et al., 2015). Estudios fundamentados en los análisis de las tasas de divergencia, han propuesto que *Plasmodium gallinaceum* y *Plasmodium relictum* se separaron evolutivamente desde hace 4 millones de años (Böhme et al., 2018). Inicialmente, algunas investigaciones consideraron erróneamente a *Plasmodium cathemerium* (linaje PADOM02) como un linaje genético de la morfoespecie *Plasmodium relictum*, sin embargo, estudios moleculares demostraron que se trataba de dos morfoespecies distintas, cuyas distancias evolutivas resaltan estrechos vínculos filogenéticos (Aly et al., 2020). Estos argumentos, están en correspondencia con la filogenia robusta que proporcionó el grupo externo en el análisis filogenético que realizamos.

De los haplotipos mitocondriales atribuidos a la morfoespecie *Plasmodium relictum*, el linaje SGS1 es el más común entre los hospedadores (Valkiūnas et al., 2018); ha infectado a 129 especies de aves que comprenden 11 órdenes (Bensch et al. 2009). El linaje GRW11 es relativamente frecuente, confirmándose en aproximadamente 46 especies de aves de 15 familias y 4 órdenes (Thorel et al., 2021); en tanto, el linaje GRW04 ha sido informado en 59 especies de 18 familias (Hellgren et al., 2014). La presencia del linaje LINOLI01 en aves silvestres se ha documentado en muy pocos estudios y su presencia solo se ha descrito en aves paseriformes (Obor et al., nd; Baillie, 2011).

Los resultados que obtuvimos a través del muestreo de las secuencias genéticas están en correspondencia con lo referido por otros autores, en consideración a la baja especificidad de *Plasmodium relictum* para infectar a una gama más amplia de aves de distintas familias y órdenes taxonómicos (Dimitrov et al., 2015), y con ello, reafirmamos el carácter generalista del parásito por medio de sus haplotipos SGS1, GRW11 y GRW04. Es conocido que los parásitos con la capacidad de infectar con éxito una amplia variedad de especies hospedantes también pueden ser los más prevalentes en una sola especie anfitriona (Iezhova et al., 2005). A diferencia de los estudios donde el haplotipo LINOLI01 estuvo involucrado, informamos la presencia de este linaje en dos órdenes: Passeriformes y Suliformes, sin embargo, no aseveramos que *Plasmodium relictum* LINOLI01 sea más especialista que generalista, en relación con su especificidad para infectar a las aves. Por medio de análisis filogenéticos y de reconstrucción ancestral, se ha identificado una tendencia evolutiva de los parásitos que ocasionan malaria aviar a transmutar de generalistas a especialistas y viceversa (García-Longoria et al., 2019).

Este estudio identificó a distintas especies de aves del orden Passeriformes como hospedantes mayoritarias para *Plasmodium relictum*, hecho que coincide con los resultados de algunas investigaciones referentes a las infecciones causadas por hemosporidios aviares (Himmel et al., 2020, 2021; Harl et al., 2020; Theodosopoulos et al., 2020; Schumm et al., 2019). Tradicionalmente, la mayoría de los estudios que abordan esta temática se han enfocado específicamente en anfitriones paseriformes, que abarcan más de la mitad de las especies de aves en la naturaleza y actúan como reservorios del parásito, con lo cual, las aves no paseriformes han quedado subrepresentadas (Santiago-Alarcon et al., 2010; Clark et al., 2014). Así mismo, las especies pertenecientes a este orden muy fácilmente quedan atrapadas en los métodos predominantes de muestreo de aves silvestres, ya sean redes de niebla o trampas, hecho que también ha influido en el mayor estudio de este orden taxonómico (Valkiūnas, 2005). Éstas, son razones que pudieran explicar la mayor prevalencia encontrada para las aves paseriformes en este estudio. No obstante, en los últimos años, es notable el incremento de investigaciones relacionadas con la presencia de malaria aviar en pingüinos (Sphenisciformes) cautivos en zoológicos y acuarios (Hernandez-Colina et al., 2021; Inumaru et al., 2021; González-Olvera., 2022). Es conocido que los pingüinos cuando son trasladados a regiones endémicas de malaria aviar para permanecer cautivos en estas instalaciones, se convierten en aves muy susceptibles debido a la ausencia de presiones selectivas por parte del parásito en sus hábitats no endémicos, por lo que exponen una mortalidad aguda tras ser infectados (Grilo et al., 2016). Hasta el momento, conocemos que *Plasmodium relictum* SGS1 estuvo asociado a un evento de mortalidad de pingüinos en un zoológico (Spottiswoode et al., 2020). Pudimos comprobar en el presente trabajo, el vínculo de este linaje con aves esfenisciformes, pues fue muestreado en dos secuencias genéticas cuyos hospedadores eran pingüinos.

Los mosquitos de la familia Culicidae desempeñan un papel crucial en la propagación exitosa de *Plasmodium relictum*, siempre que estén disponibles en el área geográfica (Thorel et al., 2021). *Culex pipiens* y *Culex*

*quinquefasciatus* se han identificado como especies que intervienen en la transmisión activa de este parásito (Martínez-de la Puente et al., 2021), hecho que corroboramos a través de las secuencias muestreadas. Un hallazgo significativo para nosotros fue el registro del haplotipo GRW04 en ambas especies de mosquitos. Valkiūnas et al. (2015) demostraron con la ayuda de la PCR, que *Plasmodium relictum* GRW04 completó sus etapas esporogónicas en hembras de *Culex pipiens* que fueron infectadas en condiciones de laboratorio a bajas temperaturas; a partir de este descubrimiento, comenzó a considerarse a esta especie como otro vector efectivo para la transmisión de *Plasmodium relictum* GRW04 además de *Culex quinquefasciatus*, lo cual, ha trascendido en la epidemiología de la malaria aviar. Adicionalmente, los resultados que obtuvimos, mostraron que *Plasmodium relictum* SGS1 y GRW11 pueden infectar a mosquitos del género *Culex* y *Aedes*, de acuerdo con lo manifestado por otros autores (Gutiérrez-López et al., 2020; Nourani et al., 2020; Martínez-de la Puente et al., 2021). No encontramos información disponible sobre los posibles vectores efectivos para el linaje LINOLI01.

Las aves migratorias de larga distancia realizan extensos recorridos entre las áreas geográficas de reproducción e invernada, así, quedan expuestas a ecosistemas variados y a los vectores que habitan en ellos, por tanto, la probabilidad de que sean infectadas por hemosporidios aviarios es muy alta, del mismo modo, contribuyen a la diseminación intercontinental de estos parásitos (Nourani et al., 2020). En correspondencia con otros estudios, (Valkiūnas et al., 2018; Hellgren et al., 2014) comprobamos que la mayor frecuencia de distribución geográfica para los haplotipos SGS1, GRW11 y GRW04 tuvo lugar en las regiones euroasiáticas, donde prevaleció el linaje SGS1, que además de transmitirse entre especies migratorias de África Occidental, Japón y Nueva Zelanda, otros autores lo han relacionado con pingüinos cautivos en Norteamérica y en aves silvestres de Suramérica (Spottiswoode et al., 2020; Marzal et al., 2015), lo que demuestra su extensa transmisión en regiones con climas tropicales y templados. Los registros del linaje GRW4 en Europa corresponden solamente a aves adultas migratorias que han regresado de áreas de invernada en África Occidental y Asia (Valkiūnas et al., 2018), sin embargo, pudimos vincularlo con aves paseriformes migrantes de corta distancia de regiones euroasiáticas y con otras aves en Norteamérica, en contraste, en nuestro estudio no existió conexión alguna entre el haplotipo GRW04 y África, que es reconocida como su principal área de transmisión junto a Norteamérica y distintas islas oceánicas, incluida Hawái (Beadel et al., 2006). Referimos la presencia del linaje GRW11 en las regiones de Asia Oriental, Europa Oriental y Occidental, en cambio, recientemente se demostró su asociación con hospedadores de Australasia (Amaya-Mejía et al., 2022). A pesar de la restringida ubicación geográfica que describimos para el linaje LINOLI01, hace algunos años se documentó que *Plasmodium relictum* LINOLI01 infectó a un ave endémica de Nueva Zelanda y a otras en Europa Oriental (Baillie et al., 2012; Obor et al., nd). Los resultados mostrados, confirman que las aves por medio de la migración conectan comunidades constituidas por varias especies, de este modo, han contribuido a diseminar los haplotipos mitocondriales de *Plasmodium relictum* a lo largo de sus rutas migratorias, al mismo tiempo, la inclusión del parásito en nuevos ecosistemas, requiere un mosquito competente que sustente su ciclo de transmisión (Miranda-Páez et al., 2022).

De acuerdo con algunos estudios, *Plasmodium relictum* SGS1 no solo es el más frecuente en términos filogeográficos y rango de hospedadores, también es considerado como el más virulento, pues suele desarrollar una elevada parasitemia durante la fase aguda de la malaria aviar, ya sea en infección única o en coinfección con otro haplotipo de su misma morfoespecie, ocasionando una morbimortalidad significativa, especialmente, en aves ingenuas (Palinauskas et al., 2008; Cellier-Holzen et al., 2010; Ellis et al., 2015).

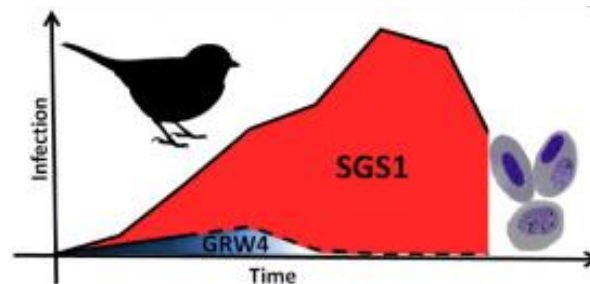
Palinauskas et al. (2008) infectaron experimentalmente a cuatro especies de aves paseriformes con *Plasmodium relictum* SGS1; la parasitemia resultó considerablemente alta en algunas especies (*Loxia curvirostra* y *Spinus spinus*) con valores de hematocrito significativamente menores, además, el hígado y el bazo mostraron una hipertrofia marcada. En estas aves, el estado de infección ocasionado por este linaje expresó un fenotipo de virulencia grave, sin embargo, no se registró mortalidad. En otras aves (*Fringilla coelebs* y *Passer domesticus*), la parasitemia fue baja y no existió repercusión en los órganos internos, con lo cual, el fenotipo de virulencia expresado pudo ser leve o subclínico.

Otro estudio, también desarrollado experimentalmente, evaluó el impacto en el estado de salud de los canarios domésticos (*Serinus canaria domestica*) durante infecciones únicas con los linajes SGS1 y GRW11 de *Plasmodium relictum* y en coinfección (Palinauskas et al., 2022). La dinámica de la parasitemia fue más intensa para algunos canarios infectados con *Plasmodium relictum* SGS1; se registraron dos incrementos bruscos de parasitemia en el transcurso de la infección aguda, finalmente, las aves murieron. En cambio, la parasitemia de los canarios infectados con *Plasmodium relictum* GRW11, no reflejaron diferencias significativas en comparación con las aves del grupo SGS1, tampoco existió mortalidad en el grupo de canarios GRW11. El porcentaje de glóbulos rojos infectados en los canarios coinfectados, no difirió de manera significativa de la parasitemia de las aves en los grupos individuales y tampoco fue afectada por la interacción de estos dos linajes genéticos.

Por otra parte, Azelytė et al. (2022), diseñaron un protocolo para cuantificar la parasitemia en las aves paseriformes *Spinus spinus* tras ser infectadas en el laboratorio con el linaje GRW04 (infección individual) y en coinfección con el linaje SGS1. Los resultados revelaron que durante la coinfección, *Plasmodium relictum* GRW04 desarrolló una parasitemia transitoria leve, que desapareció de la sangre periférica de los hospedadores a medida que se incrementaba la parasitemia desarrollada por *Plasmodium relictum* SGS1, adicionalmente, el estado de infección que indujo el linaje GRW04 no influyó significativamente en la salud de las aves durante la infección individual ni en coinfección, en cambio, el linaje SGS1 mostró un comportamiento más virulento al superar el estado de infección generado por el otro linaje (Fig. 5).



**Figura 5.** Representación gráfica de la coinfección de dos linajes de *Plasmodium relictum*: GRW04 y SGS1 (Tomado de: Aželytė et al., 2022).



Videvall et al. (2020) investigaron la respuesta transcripcional en las aves *Spinus spinus* luego de su infección experimental con los linajes SGS1 y GRW04. Comprobaron que las aves infectadas por *Plasmodium relictum* SGS1 expusieron valores de parasitemia superiores a un 80 %, con cambios relevantes en el transcriptoma aviar que involucró a varios genes durante el desarrollo de la infección, sin embargo, para las aves infectadas por *Plasmodium relictum* GRW04, la parasitemia fue marcadamente baja (0,7 %) y la respuesta transcripcional de los hospedadores mucho menor.

No obstante, *Plasmodium relictum* GRW04 fue el responsable de las fatídicas consecuencias que padecieron las comunidades de aves insulares tras su introducción en Hawái (Valkiūnas et al., 2005). En este contexto, su virulencia estuvo favorecida por la geografía a través del gradiente altitudinal. El aumento de la temperatura ambiental posibilitó la diseminación del mosquito *Culex quinquefasciatus* por todas las tierras bajas, húmedas y cálidas de las islas, en consecuencia, este haplotipo se volvió muy prevalente entre las aves y exacerbó su virulencia (Beadell et al., 2006). La temperatura del ambiente es una variable que controla la distribución altitudinal en un rango taxonómico y ecológico diverso de especies, por tanto, puede influir en la prevalencia de los hemosporidios en sus hospedadores y en la dinámica de la parasitemia (Gramszegi, 2011).

Los linajes más virulentos, desarrollan parasitemias significativamente altas que conducen a una mayor hemólisis eritrocitaria, cuyo resultado es una anemia aguda severa que compromete el transporte de oxígeno a los tejidos y órganos. El desequilibrio de la homeostasis y la hipoxia tisular, desencadenarán una cascada de eventos metabólicos implicados en la liberación de radicales libres; el incremento del estrés oxidativo en el hospedador y las lesiones en sus órganos diana serán irremediables, en consecuencia, el estado de infección será más extremo, con un desenlace fatal para el ave en la mayoría de los casos, especialmente, si no ha coevolucionado con el parásito, a diferencia de lo que sucedería ante una baja parasitemia, donde el estado de infección resultaría menos agresivo con el hospedador (Muriel, 2020).

Algunas investigaciones (Zamora-Vilchis et al., 2012), hallaron una fuerte relación entre los gradientes altitudinales y la prevalencia de hemosporidios en la sangre de las aves infectadas. Las que habitaban en zonas bajas (aproximadamente a 400 m) con temperaturas altas, mostraron una prevalencia de hemoparásitos elevada, en cambio, las bajas temperaturas de las regiones montañosas (1200 m), determinaron un predominio menor de parásitos en la sangre de las aves estudiadas.

La abundancia de vectores competentes está directamente relacionada con la temperatura del ambiente, esto determina en parte la preponderancia del parásito en los hospedadores aviares, en distintas zonas geográficas (Gupta et al., 2020).

Zamora-Vilchis et al. (2012) documentaron que con cada grado Celsius que aumente la temperatura ambiental, se incrementa la prevalencia de los hemosporidios aviares en la sangre hasta en un 10 %.

Otro estudio de la parasitemia en aves infectadas por especies de *Plasmodium*, desarrollado en la isla de Sao Tomé, identificó la mayor parasitemia en las aves que habitaban en zonas con temperatura ambiental más elevada (tierras bajas) respecto a la parasitemia desarrollada en las aves con hábitats en regiones montañosas, en éstas, el porcentaje de glóbulos rojos infectados fue menor del 1 % (Gual Romero, 2021), hecho que propició un fenotipo de virulencia leve en las aves enfermas.

Los resultados exhibidos por las investigaciones anteriores, confirman que el gradiente altitudinal influye en la dinámica de la parasitemia mediante la temperatura ambiental; de esta manera, la geografía contribuye con la expresión de fenotipos diferenciales de virulencia en la malaria aviar.

Los individuos con mejor condición física y mejor estado nutricional, inmunológicamente resultarán más resistentes y competentes para enfrentar con mayor éxito la enfermedad, al igual que aquellos que estuvieron expuestos a las presiones selectivas del parásito en algún momento de su vida (Muriel, 2020).

De acuerdo con los análisis realizados en este estudio, *Plasmodium relictum* muestra una dinámica de parasitemia variable, en correspondencia con el estado de infección de las aves; la misma, resulta una variable condicionada por la estructura filogeográfica del parásito, por los vectores dípteros competentes en el área y por los hospedadores. Finalmente, afirmamos que la estructura filogeográfica de *Plasmodium relictum* está correlacionada con el estado de

infección de las aves y predispone a la expresión de fenotipos diferenciales de virulencia en la malaria aviar. Además, resaltamos que la parasitemia es una variable dependiente de factores medioambientales, hecho que debe considerarse en los estudios de campo con aves silvestres y en las investigaciones experimentales.

## 5. Conclusiones

*Plasmodium relictum* es un parásito generalista que infecta a especies de aves de distintos órdenes taxonómicos, especialmente a las del orden Passeriformes. El linaje SGS1 se ha identificado como el más cosmopolita, prevalente y virulento entre los hospedadores. La alta capacidad de dispersión geográfica del parásito y su adaptación a diferentes condiciones climáticas, está favorecida por su variada estructura genética-poblacional; por su rango más extenso de vectores competentes, entre ellos, especies del género *Culex* y *Aedes* y por las aves migrantes de larga distancia.

La dinámica de la parasitemia ocasionada por *Plasmodium relictum* está en correspondencia con el estado de infección de las aves y con los fenotipos diferenciales de virulencia y es una variable que se infiere en el patrón de la estructura genética-poblacional del parásito y por el gradiente altitudinal.

La estructura filogeográfica de *Plasmodium relictum* demuestra que el estado de infección de las aves ha seleccionado fenotipos diferenciales de virulencia en la malaria aviar.

## 6. Recomendaciones

Se necesita incrementar el muestreo de aves no paseriformes, pues la diversidad de hospedadores aviares dentro de los otros órdenes taxonómicos está subrepresentada. Deben desarrollarse investigaciones que implementen la secuenciación genética a partir de muestras de aves infectadas en la naturaleza, lo cual, permitirá identificar a los haplotipos mitocondriales de *Plasmodium relictum* que circulan entre los hospedadores de las regiones geográficas menos muestreadas, con énfasis en las áreas neotropicales. Adicionalmente, proponemos que, una vez obtenidas las secuencias genéticas de los haplotipos, se incluyan en las bases de datos GenBank y MaLAvi, de esta manera, se enriquecerán los futuros análisis filogenéticos y filogeográficos vinculados con este hemosporidio aviar.

**Contribución de los Autores:** Conceptualización, JCN; metodología, NR; software, NR; validación, JCN; análisis formal y recursos, JCN, NR; curadoría de data, NR; escritura-preparación del borrador o draft original, NR; escritura-revisión y edición, NR, JCN; visualización final, JCN, NR; supervisión, JCN; administración y gestión de proyecto, JCN; adquisición de fondos, JCN. “Todos los autores han leído y están de acuerdo con la versión final del manuscrito.”

**Financiamiento/Fondos:** DII-UISEK-P011617\_2 (JCN)

**Conflictos de Interés:** Los autores declaran no tener conflictos de interés.

## Referencias citadas

- Aly, M. Z. Y., Mohamed, I. I. I., Sebak, S. I., Vanstreels, R. E. T., & El Gendy, A. M. (2020). Morphological and molecular characterization of *Plasmodium cathemerium* (lineage PADOM02) from the sparrow *Passer domesticus* with complete sporogony in *Culex pipiens* complex. *Parasitology*, *147*(9), 985–993. <https://doi.org/10.1017/S0031182020000566>
- Amaya-Mejía, W., Dodge, M., Morris, B., Dumbacher, J. P., & Sehgal, R. N. M. (2022). Prevalence and diversity of avian haemosporidian parasites across islands of Milne Bay Province, Papua New Guinea. *Parasitology Research*, *121*(6), 1621–1630. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07490-y>
- Atkinson, C. T., & LaPointe, D. A. (2009). Introduced avian diseases, climate change, and the future of Hawaiian honeycreepers. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, *23*(1), 53–63. <https://doi.org/10.1647/2008-059.1>
- Atkinson, C. T., Thomas, N. J. (Nancy J., & Hunter, D. B. (2008). *Parasitic diseases of wild birds*. Wiley-Blackwell.
- Aželytė, J., Platonova, E., Bensch, S., Hellgren, O., & Palinauskas, V. (2022). A comparative analysis of the dynamics of *Plasmodium relictum* (GRW4) development in the blood during single and co-infections. *Acta Tropica*, *226*, 106247. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2021.106247>
- Baillie, S. M., & Brunton, D. H. (2011). Diversity, distribution and biogeographical origins of *Plasmodium* parasites from the New Zealand bellbird (*Anthornis melanura*). *Parasitology*, *138*(14), 1843–1851. <https://doi.org/10.1017/S0031182011001491>
- Beadell, J. S., Ishtiaq, F., Covas, R., Melo, M., Warren, B. H., Atkinson, C. T., Bensch, S., Graves, G. R., Jhala, Y. V., Peirce, M. A., Rahmani, A. R., Fonseca, D. M., & Fleischer, R. C. (2006). Global phylogeographic limits of Hawaii's avian malaria. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *273*(1604), 2935–2944. <https://doi.org/10.1098/RSPB.2006.3671>
- Bensch, S., Hellgren, O., & Pérez-Tris, J. (2009). MalAvi: A public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. *Molecular Ecology Resources*, *9*(5), 1353–1358. <https://doi.org/10.1111/J.1755-0998.2009.02692.X>
- Bensch, S., Stjernman, M., Hasselquist, D., Ostman, O., Hansson, B., Westerdahl, H., & Pinheiro, R. T. (2000). Host specificity in avian blood parasites: A study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified

- from birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 267(1452), 1583–1589. <https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1181>
- Böhme, U., Otto, T. D., Cotton, J. A., Steinbiss, S., Sanders, M., Oyola, S. O., Nicot, A., Gandon, S., Patra, K. P., Herd, C., Bushell, E., Modrzynska, K. K., Billker, O., Vinetz, J. M., Rivero, A., Newbold, C. I., & Berriman, M. (2018). Complete avian malaria parasite genomes reveal features associated with lineage-specific evolution in birds and mammals. *Genome Research*, 28(4), 547–560. <https://doi.org/10.1101/gr.218123.116>
- Cellier-Holzem, E., Esparza-Salas, R., Garnier, S., & Sorci, G. (2010). Effect of repeated exposure to *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) on infection dynamics in domestic canaries. *International Journal for Parasitology*, 40(12), 1447–1453. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.04.014>
- Chalkowski, K., Lepczyk, C. A., & Zohdy, S. (2018). *Parasite Ecology of Invasive Species: Conceptual Framework and New Hypotheses*. <http://www.elsevier.com/open-access/userlicense/1.0/>
- Clark, N. J., Clegg, S. M., & Lima, M. R. (2014). A review of global diversity in avian haemosporidians (*Plasmodium* and *Haemoproteus*: *Haemosporida*): New insights from molecular data. *International Journal for Parasitology*, 44(5), 329–338. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.01.004>
- Dimitrov, D., Palinauskas, V., Iezhova, T. A., Bernotiene, R., Ilgunas, M., Bukauskaite, D., Zehtindjiev, P., Ilieva, M., Shapoval, A. P., Bolshakov, C. V., Markovets, M. Y., Bensch, S., & Valkiunas, G. (2015). *Plasmodium* spp.: An experimental study on vertebrate host susceptibility to avian malaria. *Experimental Parasitology*, 148, 1–16. <https://doi.org/10.1016/J.EXPPARA.2014.11.005>
- Ellis, V. A., & Bensch, S. (2018). Host specificity of avian haemosporidian parasites is unrelated among sister lineages but shows phylogenetic signal across larger clades. *International Journal for Parasitology*, 48(12), 897–902. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.05.005>
- Ellis, V. A., Kalbskopf, V., Ciloglu, A., Duc, M., Huang, X., Inci, A., Bensch, S., Hellgren, O., & Palinauskas, V. (2022). Genomic sequence capture of *Plasmodium relictum* in experimentally infected birds. *Parasites and Vectors*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05373-w>
- Fecchio, A., Chagas, C. R. F., Bell, J. A., & Kirchgatter, K. (2020). Evolutionary ecology, taxonomy, and systematics of avian malaria and related parasites. *Acta Tropica*, 204, 105364. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2020.105364>
- felsentein*. (n.d.).
- Ferrell, S. T., Snowden, K., Marlar, A. B., Garner, M., & Lung, N. P. (2007). Fatal hemoprotozoal infections in multiple avian species in a zoological park. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 38(2), 309–316. [https://doi.org/10.1638/1042-7260\(2007\)038\[0309:FHIIMA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1638/1042-7260(2007)038[0309:FHIIMA]2.0.CO;2)
- Felstein J. Confidende limits on phylogenies: an approach using the Bootstrap. Department of Genetics SK-50, University of Washington, Seattle, WA 98195. *Evolution*. 39(4), 1985, pp. 783-791
- Garamszegi, L. Z. (2011). Climate change increases the risk of malaria in birds. *Global Change Biology*, 17(5), 1751–1759. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2010.02346.x>
- Garcia-Longoria, L., Hellgren, O., & Bensch, S. (2014). Molecular identification of the chitinase genes in *Plasmodium relictum*. *Malaria Journal*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-239>
- Garcia-Longoria, L., Marzal, A., De Lope, F., & Garamszegi, L. (2019). Host-parasite interaction explains variation in the prevalence of avian haemosporidians at the community level. *PLoS ONE*, 14(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205624>
- Gil-Vargas, D. L., & Sedano-Cruz, R. E. (2019). Genetic variation of avian malaria in the tropical Andes: A relationship with the spatial distribution of hosts. *Malaria Journal*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2699-9>
- González-Olvera, M., Hernández-Colina, A., Himmel, T., Eckley, L., Lopez, J., Chantrey, J., Baylis, M., & Jackson, A. P. (2022). Molecular and epidemiological surveillance of *Plasmodium* spp. during a mortality event affecting Humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*) at a zoo in the UK. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 19, 26–37. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2022.06.010>
- Grilo, M. L., Vanstreels, R. E. T., Wallace, R., García-Párraga, D., Braga, M., Chitty, J., Catão-Dias, J. L., & Madeira de Carvalho, L. M. (2016). Malaria in penguins – current perceptions. In *Avian Pathology* (Vol. 45, Issue 4, pp. 393–407). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1149145>
- Gupta, P., Vishnudas, C. K., Robin, V. V., & Dharmarajan, G. (2020). Host phylogeny matters: Examining sources of variation in infection risk by blood parasites across a tropical montane bird community in India. *Parasites and Vectors*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04404-8>
- Harl, J., Himmel, T., Valkiūnas, G., Ilgūnas, M., Bakonyi, T., & Weissenböck, H. (2020). Geographic and host distribution of haemosporidian parasite lineages from birds of the family Turdidae. *Malaria Journal*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03408-0>

- Harvey-Samuel, T., Ant, T., Sutton, J., Niebuhr, C. N., Asigau, S., Parker, P., Sinkins, S., & Alphey, L. (2021). *Culex quinquefasciatus*: status as a threat to island avifauna and options for genetic control. *CABI Agriculture and Bioscience*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/s43170-021-00030-1>
- Hellgren, O., Atkinson, C. T., Bensch, S., Albayrak, T., Dimitrov, D., Ewen, J. G., Kim, K. S., Lima, M. R., Martin, L., Palinauskas, V., Ricklefs, R., Sehgal, R. N. M., Valkiunas, G., Tsuda, Y., & Marzal, A. (2015). Global phylogeography of the avian malaria pathogen *Plasmodium relictum* based on MSP1 allelic diversity. *Ecography*, 38(8), 842–850. <https://doi.org/10.1111/ECOG.01158>
- Hernandez-Colina, A., Gonzalez-Olvera, M., Eckley, L., Lopez, J., & Baylis, M. (2021). Avian malaria affecting penguins in zoological gardens, aquariums and wildlife parks in the UK. *Veterinary Record*, 189(9), no. <https://doi.org/10.1002/vetr.511>
- Himmel, T., Harl, J., Matt, J., & Weissenböck, H. (2021). A citizen science-based survey of avian mortality focusing on haemosporidian infections in wild passerine birds. *Malaria Journal*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03949-y>
- Himmel, T., Harl, J., Pfanner, S., Nedorost, N., Nowotny, N., & Weissenböck, H. (2020). Haemosporidiosis in wild Eurasian blackbirds (*Turdus merula*) and song thrushes (*T. philomelos*): An in situ hybridization study with emphasis on exo-erythrocytic parasite burden. *Malaria Journal*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12936-020-3147-6>
- Iezhova, T. A., Valkiunas, G., & Bairlein, F. (2005). Vertebrate host specificity of two avian malaria parasites of the subgenus *Novyella*: *Plasmodium nucleophilum* and *Plasmodium vaughani*. *Journal of Parasitology*, 91(2), 472–474. <https://doi.org/10.1645/GE-3377RN>
- Inumaru, M., Yamada, A., Shimizu, M., Ono, A., Horinouchi, M., Shimamoto, T., Tsuda, Y., Murata, K., & Sato, Y. (2021). Vector incrimination and transmission of avian malaria at an aquarium in Japan: mismatch in parasite composition between mosquitoes and penguins. *Malaria Journal*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03669-3>
- Ishtiaq, F. (2021). Ecology and Evolution of Avian Malaria: Implications of Land Use Changes and Climate Change on Disease Dynamics. In *Journal of the Indian Institute of Science* (Vol. 101, Issue 2, pp. 213–225). Springer. <https://doi.org/10.1007/s41745-021-00235-3>
- Ishtiaq, F., Beadell, J. S., H. Warren, B., & Fleischer, R. C. (2012). Diversity and distribution of avian haematozoan parasites in the western Indian Ocean region: a molecular survey. *Parasitology*, 139(2), 221–231. <https://doi.org/10.1017/S0031182011001831>
- Lapointe, D. A., Atkinson, C. T., & Samuel, M. D. (2012). Ecology and conservation biology of avian malaria. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1249(1), 211–226. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06431.x>
- LaPointe, D. A., Goff, M. L., & Atkinson, C. T. (2005). Comparative susceptibility of introduced forest-dwelling mosquitoes in Hawai'i to avian malaria, *Plasmodium relictum*. *Journal of Parasitology*, 91(4), 843–849. <https://doi.org/10.1645/GE-3431.1>
- Martínez-de la Puente, J., Santiago-Alarcon, D., Palinauskas, V., & Bensch, S. (2021). *Plasmodium relictum*. In *Trends in Parasitology* (Vol. 37, Issue 4, pp. 355–356). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.06.004>
- Marzal, A., Ricklefs, R. E., Valkiunas, G., Albayrak, T., Arriero, E., Bonneaud, C., Czirájk, G. A., Ewen, J., Hellgren, O., Hořáková, D., Iezhova, T. A., Jensen, H., Križanauskienė, A., Lima, M. R., de Lope, F., Magnussen, E., Martin, L. B., Møller, A. P., Palinauskas, V., ... Bensch, S. (2011). Diversity, loss, and gain of malaria parasites in a globally invasive bird. *PLoS ONE*, 6(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021905>
- Meister, S. L., Wyss, F., Wenker, C., Hoby, S., & Basso, W. U. (2023). Avian haemosporidian parasites in captive and free-ranging, wild birds from zoological institutions in Switzerland: Molecular characterization and clinical importance. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 20, 46–55. <https://doi.org/10.1016/J.IJPPAW.2022.12.005>
- Miranda Paez, A., Chalkowski, K., Zohdy, S., & Willoughby, J. R. (2022). Management of avian malaria in populations of high conservation concern. *Parasites and Vectors*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05327-2>
- Muriel, J. (2020). Ecophysiological assessment of blood haemosporidian infections in birds. *Ecosistemas*, 29(2). <https://doi.org/10.7818/ECOS.1979>
- Nei M. and Kumar S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Nourani, L., Zakeri, S., & Dinparast Djajid, N. (2020). Dynamics of prevalence and distribution pattern of avian *Plasmodium* species and its vectors in diverse zoogeographical areas - A review. *Infection, Genetics and Evolution*, 81, 104244. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2020.104244>
- Obor, S., Zoologie., & Krausová, B. S. (n.d.). *Univerzita Karlova v Praze Přírodovědecká fakulta Studijní program: Biologie Ptačí malárie vlaštoky obecné Avian malaria in the Swallow*.

- Pacheco, M. A., Ferreira, F. C., Logan, C. J., McCune, K. B., MacPherson, M. P., Miranda, S. A., Santiago-Alarcon, D., & Escalante, A. A. (2022). Great-tailed Grackles (*Quiscalus mexicanus*) as a tolerant host of avian malaria parasites. *PLoS ONE*, *17*(8 August). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0268161>
- Pacheco, M. A., Matta, N. E., Valkiūnas, G., Parker, P. G., Mello, B., Stanley, C. E., Lentino, M., Garcia-Amado, M. A., Cranfield, M., Pond, S. L. K., & Escalante, A. A. (2018). Mode and rate of evolution of haemosporidian mitochondrial genomes: Timing the radiation of avian parasites. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(2), 383–403. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx285>
- Palinauskas, V., Valkiūnas, G., Bolshakov, C. V., & Bensch, S. (2008). *Plasmodium relictum* (lineage P-SGS1): Effects on experimentally infected passerine birds. *Experimental Parasitology*, *120*(4), 372–380. <https://doi.org/10.1016/J.EXPPARA.2008.09.001>
- Palinauskas, V., Žiegytė, R., Šengaut, J., & Bernotienė, R. (2022). Experimental Study on Primary Bird Co-Infection with Two *Plasmodium relictum* Lineages-pSGS1 and pGRW11. *Animals*: an open access journal from MDPI, *12*(15), 1879. <https://doi.org/10.3390/ani12151879>
- Roldán-Zurabián, F., José Ruiz-López, M., de la Puente, J. M., Figuerola, J., Drummond, H., & Ancona, S. (2022). Apparent absence of avian malaria and malaria-like parasites in northern blue-footed boobies breeding on Isla Isabel. *Scientific Reports*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11075-1>
- Santiago-Alarcon, D., Outlaw, D. C., Ricklefs, R. E., & Parker, P. G. (2010). Phylogenetic relationships of haemosporidian parasites in New World Columbiformes, with emphasis on the endemic Galapagos dove. *International Journal for Parasitology*, *40*(4), 463–470. <https://doi.org/10.1016/J.IJPARA.2009.10.003>
- Schumm, Y. R., Wecker, C., Marek, C., Wassmuth, M., Bentele, A., Willems, H., Reiner, G., & Quillfeldt, P. (2019). Blood parasites in Passeriformes in central Germany: Prevalence and lineage diversity of Haemosporida (*Haemoproteus*, *Plasmodium* and *Leucocytozoon*) in six common songbirds. *PeerJ*, *2019*(1). <https://doi.org/10.7717/peerj.6259>
- Sorci, G., Møller, A. P., & Boulinier, T. (1997). Genetics of host-parasite interactions. *Trends in Ecology and Evolution*, *12*(5), 196–200. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(97\)01056-2](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(97)01056-2)
- Spottiswoode, N., Bartlett, S. L., Conley, K. J., Seimon, T. A., Griffin, D. O., & Sykes, J. M. (2020). ANALYSIS OF PLASMODIUM LINEAGES IDENTIFIED IN CAPTIVE PENGUINS (SPHENISCIFORMES SPP.), EIDERS (SOMATERIA SPP.), AND INCA TERNS (LAROSTERNA INCA) IN A NORTH AMERICAN ZOOLOGICAL COLLECTION. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, *51*(1), 140. <https://doi.org/10.1638/2019-0078>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, *38*(7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Theodosopoulos, A. N., Grabenstein, K. C., Bensch, S., & Taylor, S. A. (2021). A highly invasive malaria parasite has expanded its range to non-migratory birds in North America. *Biology Letters*, *17*(9). <https://doi.org/10.1098/rsbl.2021.0271>
- Thorel, M., Chavatte, J. M., Landau, I., Lemberger, K., & Leclerc, A. (2021). First case of *Plasmodium relictum* lineage pGRW11 infection in a captive-bred common eider (*Somateria Mollissima*) in Europe. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, *23*, 100529. <https://doi.org/10.1016/J.VPRSR.2020.100529>
- Valkiūnas, G. (2005). Avian malaria parasites and other haemosporidia. CRC press.
- Valkiūnas, G., & Iezhova, T. A. (2017). Exo-erythrocytic development of avian malaria and related haemosporidian parasites. In *Malaria Journal* (Vol. 16, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1746-7>
- Valkiūnas, G., Žiegytė, R., Palinauskas, V., Bernotienė, R., Bukauskaitė, D., Ilgūnas, M., Dimitrov, D., & Iezhova, T. A. (2015). Complete sporogony of *Plasmodium relictum* (lineage pGRW4) in mosquitoes *Culex pipiens pipiens*, with implications on avian malaria epidemiology. *Parasitology Research*, *114*(8), 3075–3085. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4510-3>
- Videvall, E. (2019). Genomic Advances in Avian Malaria Research. In *Trends in Parasitology* (Vol. 35, Issue 3, pp. 254–266). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.12.005>
- Videvall, E., Palinauskas, V., Valkiūnas, G., & Hellgren, O. (2020). Host transcriptional responses to high- and low-virulent avian malaria parasites. *American Naturalist*, *195*(6), 1079–1084. <https://doi.org/10.1086/708530>
- Videvall, E., Paxton, K. L., Campana, M. G., Cassin-Sackett, L., Atkinson, C. T., & Fleischer, R. C. (2021). Transcriptome assembly and differential gene expression of the invasive avian malaria parasite *Plasmodium relictum* in Hawai'i. *Ecology and Evolution*, *11*(9), 4935–4944. <https://doi.org/10.1002/ece3.7401>
- Warner, R. E. (1968). The Role of Introduced Diseases in the Extinction of the Endemic Hawaiian Avifauna. *The Condor*, *70*(2), 101–120. <https://doi.org/10.2307/1365954>

- Zamora-Vilchis, I., Williams, S. E., & Johnson, C. N. (2012). Environmental temperature affects prevalence of blood parasites of birds on an elevation gradient: Implications for disease in a warming climate. *PLoS ONE*, 7(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039208>
- Zehtindjiev, P., Ilieva, M., Westerdahl, H., Hansson, B., Valkiunas, G., & Bensch, S. (2008). Dynamics of parasitemia of malaria parasites in a naturally and experimentally infected migratory songbird, the great reed warbler *Acrocephalus arundinaceus*. *Experimental Parasitology*, 119(1), 99–110. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.12.018>
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W. (2000). A Greedy Algorithm for Aligning DNA Sequences. In *JOURNAL OF COMPUTATIONAL BIOLOGY* (Vol. 7, Issue 2). Mary Ann Liebert, Inc. Pp.

**Anexo 1.** Códigos de adhesión al GenBank, haplotipos mitocondriales, hospedadores, órdenes y familias taxonómicas y origen geográfico para los taxones de *Plasmodium relictum* utilizados en el estudio (Taxa=49, secuencias parciales del gen *cty-b*).

Código GenBank	Haplotipos	Hospedadores	Órdenes	Familias	Ubicación geográfica
AF495571.1	SGS1	<i>Passer luteus</i>	Passeriformes	Passeridae	Nigeria
LC230046.1	SGS1	<i>Spheniscus humboldti</i>	Sphenisciformes	Spheniscidae	Japón
OM311293.1	SGS1	<i>Garrulus glandarius</i>	Passeriformes	Corvidae	Lituania
OP208043.1	SGS1	<i>Antípodas megadyptes</i>	Sphenisciformes	Spheniscidae	Nueva Zelanda
DQ451403.1	SGS1	<i>Passer domesticus</i>	Passeriformes	Passeridae	Israel
EF011193.1	SGS1	<i>Emberiza hortulana</i>	Passeriformes	Emberizidae	
KR049253.1	SGS1	<i>Ochlerotatus cantans</i>	Díptera	Culicidae	Rusia
KR049254.1	SGS1	<i>Ochlerotatus cantans</i>	Díptera	Culicidae	
JQ778276.1	SGS1	<i>Culex pipiens</i>	Díptera	Culicidae	Suiza
		<i>Passer domesticus</i>	Passeriformes	Passeridae	
KC787080.1	SGS1	<i>Spinus spinus</i>	Passeriformes	Fringillidae	Rusia
KF723315.1	SGS1	<i>Culex pipiens</i>	Díptera	Culicidae	Suiza
KM361491.2	SGS1	<i>Carduelis spinus</i>	Passeriformes	Fringillidae	Rusia
KU752590.1	SGS1	<i>Carduelis chloris</i>	Passeriformes	Fringillidae	Turquía
KX831064.1	SGS1	<i>Parus montanus</i>	Passeriformes	Passeridae	
MF101826.1	SGS1	<i>Passer montanus</i>	Passeriformes	Passeridae	
MF101828.1	SGS1	<i>Passer domesticus</i>	Passeriformes	Passeridae	
MF347697.1	SGS1	<i>Culex pipiens</i>	Díptera	Culicidae	
MF928792.1	SGS1	<i>Larus michahellis</i>	Charadriiformes	Laridae	Turquía
MF928797.1	SGS1	<i>Strix aluco</i>	Strigiformes	Strigidae	
MK652231.1	SGS1	<i>Serinus canaria</i>	Passeriformes	Fringillidae	Lituania
MK652232.1	SGS1	<i>Parus major</i>	Passeriformes	Paridae	Austria
MK652233.1	SGS1	<i>Athene noctua</i>	Strigiformes	Strigidae	
MW523356.1	SGS1	<i>Passer hispaniolensis</i>	Passeriformes	Passeridae	Italia
MW523357.1	SGS1	<i>Cettia cetti</i>	Passeriformes	Cettiidae	
MW523359.1	SGS1	<i>Curruca melanocephala</i>	Passeriformes	Sylviidae	
MW523361.1	SGS1	<i>Erithacus rubecula</i>	Passeriformes	Muscicapidae	
MT925890.1	SGS1	<i>Cercotrichas galactotes</i>	Passeriformes	Muscicapidae	
MZ465355.1	SGS1	<i>Parus major</i>	Passeriformes	Paridae	Austria
MT925891.1	SGS1	<i>Passer domesticus</i>	Passeriformes	Passeridae	Irán
MZ465363.1	GRW11	<i>Fringilla coelebs</i>	Passeriformes	Fringillidae	Austria
OM311283.1	GRW11	<i>Periparus ater</i>	Passeriformes	Paridae	Lituania
DQ451407.1	GRW11	<i>Corvus corone</i>	Passeriformes	Corvidae	Israel
KR049255.1	GRW11	<i>Ochlerotatus cantans</i>	Díptera	Culicidae	Rusia
KF723317.1	GRW11	<i>Culex pipiens</i>	Díptera	Culicidae	Suiza
KM361493.2	GRW11	<i>Loxia curvirostra</i>	Passeriformes	Fringillidae	Rusia
MF101825.1	GRW11	<i>Passer montanus</i>	Passeriformes	Passeridae	Turquía
MF101832.1	GRW11	<i>Saxicola rubetra</i>	Passeriformes	Muscicapidae	
MT925880.1	GRW04	<i>Passer domesticus</i>	Passeriformes	Passeridae	Irán
KR139675.1	GRW04	<i>Sylvia borin</i>	Passeriformes	Sylviidae	Rusia
KR139676.1	GRW04	<i>Carduelis spinus</i>	Passeriformes	Fringillidae	
KR139677.1	GRW04	<i>Culex pipiens</i>	Díptera	Culicidae	
KR139678.1	GRW04	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Díptera	Culicidae	
KT363870.1	GRW04	<i>Passer domesticus</i>	Passeriformes	Passeridae	
DQ659553.1	GRW04	<i>Hemignathus virens</i>	Passeriformes	Fringillidae	EE: UU
MT925877.1	GRW04	<i>Sylvia mystacea</i>	Passeriformes	Sylviidae	Irán
MT925879.1	GRW04	<i>Pycnonotus leucotis</i>	Passeriformes	Pycnonotidae	
MT925878.1	GRW04	<i>Passer domesticus</i>	Passeriformes	Passeridae	
DQ659556.1	LINOLI01	<i>Sula capensis</i>	Suliformes	Sulidae	
DQ659555.1	LINOLI01	<i>Ploceus velatus</i>	Passeriformes	Ploceidae	Botsuana