

# La parasitología ecológica en la era de la genética molecular

J. Pérez-Tris<sup>1</sup>

(1) Departamento de Zoología y Antropología Física, Facultad de C. Biológicas. Universidad Complutense, 28040 Madrid, España.

➤ Recibido el 12 de enero de 2009, aceptado el 2 de abril de 2009.

**Pérez-Tris, J. (2009) La parasitología ecológica en la era de la genética molecular. *Ecosistemas* 18(1):52-59.**

El estudio de la ecología de las relaciones entre parásitos y hospedadores se ha beneficiado recientemente de la aplicación de técnicas moleculares de diagnóstico e identificación de los parásitos. Dichas técnicas, basadas en la amplificación y secuenciación de un fragmento del ADN de los parásitos, no sólo facilitan enormemente la detección de infecciones, sino que han abierto un nuevo campo de investigación acerca de la diversidad –a menudo críptica– de estos parásitos, sus patrones de divergencia evolutiva, o sus singularidades ecológicas. Este tipo de aproximaciones han dado pujanza a la parasitología ecológica, que gracias a las técnicas moleculares ha experimentado un crecimiento exponencial durante la última década.

Palabras clave: interacciones parásito hospedador, PCR, parasitología molecular, diagnóstico parasitológico, diversidad críptica.

**Pérez-Tris, J. (2009) Ecological parasitology in the molecular genetics era. *Ecosistemas* 18(1):52-59.**

The use of molecular techniques for diagnosing and identifying parasites has recently been incorporated into research on the ecology of host-parasite interactions. Molecular techniques based on the amplification by means of PCR of a fragment of parasite DNA have greatly helped to increase the rate of detection of parasite infections. In addition, these techniques have opened a new research field about the diversity of these parasites –which is often cryptic to the eye–, the patterns of evolutionary divergence of parasite lineages, or the ecological singularities exhibited by different parasites. These kinds of approaches have boosted up research on ecological parasitology, as shown by the exponential growth of the field during the last decade.

Key words: host-parasite interactions, PCR, molecular parasitology, parasitological diagnosis, cryptic diversity.

El parasitismo ha sido siempre un importante tema de investigación básica, clínica y aplicada, por lo que no sorprende que la parasitología incorporara los desarrollos de la genética molecular rápidamente y con entusiasmo en el mismo momento en que el uso generalizado de la PCR o la secuenciación de ADN lo hicieron posible. Durante las últimas décadas, el estudio a nivel molecular de los parásitos que afectan a los humanos o a sus cultivos y producciones animales ha sido uno de los frentes más activos en parasitología clínica y aplicada. De hecho, hoy en día se ha secuenciado ya el genoma completo de algunos parásitos de especial importancia socioeconómica, como el que causa la forma más virulenta de malaria humana (*Plasmodium falciparum*). Sin embargo, estos desarrollos metodológicos han tenido más dificultades para implantarse en el estudio de los parásitos que afectan a las poblaciones naturales. De hecho, la utilización de técnicas moleculares de estudio de parásitos es muy reciente en ecología, y su uso sigue estando restringido a unos pocos taxones parásitos.

Probablemente, el principal motivo por el que las técnicas moleculares no se han popularizado entre los parasitólogos es la dificultad de aislar marcadores moleculares a partir de organismos que, en muchas ocasiones, son en sí mismos difíciles de separar de sus hospedadores. Este problema es especialmente acentuado en el caso de los parásitos intracelulares, cuyo ADN es difícil de separar del ADN del hospedador al purificar el material genético a partir de muestras de tejido infectado. En las páginas que siguen haremos un recorrido por los más importantes avances que ha experimentado la parasitología ecológica gracias a la utilización de técnicas moleculares, utilizando como hilo conductor el ejemplo particular de protozoos parásitos sanguíneos causantes de la malaria en las aves (del género *Plasmodium*, al igual que sus equivalentes en humanos) y otros géneros estrechamente emparentados con ellos (*Haemoproteus* y *Leucocytozoon*). Estos microorganismos, pertenecientes al orden de los hemosporidios (Apicomplexa, Haemosporida), se cuentan entre los parásitos más estudiados –si es que no son de hecho los más estudiados– desde el punto de vista ecológico y evolutivo, una perspectiva que, en

contraposición a la visión clínica o veterinaria del parasitismo, pretendo seguir en este texto. De todas formas, el evidente sesgo taxonómico de mi planteamiento hará que lo que sigue no sea ni exhaustivo ni totalmente objetivo, aunque espero que sí sea representativo de la revolución molecular que ha experimentado el campo de la parasitología ecológica. De hecho, todo lo que aquí se describe, tanto en su vertiente conceptual como en la puramente metodológica, es directamente aplicable a cualquier otro sistema de interacciones entre parásitos y hospedadores.

## ¿Por qué es importante el parasitismo?

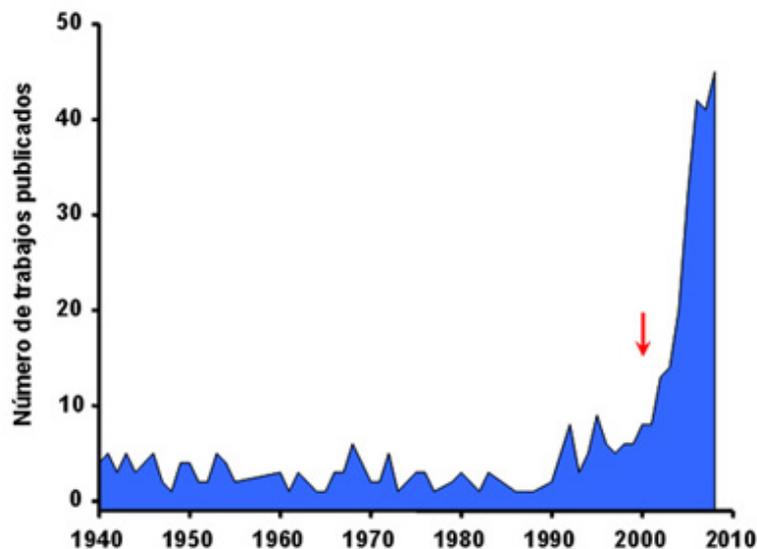
El parasitismo es uno de los estilos de vida más ampliamente extendidos en la naturaleza: prácticamente cualquier organismo vivo puede ser hospedador de alguna especie de parásito; de hecho, la mayor parte de las especies conocidas albergan numerosas especies de parásitos. Los parásitos se aprovechan de sus hospedadores para conseguir recursos que necesitan para vivir, causándoles daños más o menos severos como consecuencia de dicha explotación. Como la acción de los parásitos supone una pérdida de eficacia biológica de sus hospedadores, la selección natural favorece en éstos la evolución de mecanismos de resistencia, los cuales a su vez promueven la selección recíproca de mecanismos de explotación más eficientes en los parásitos.

La lectura detenida del párrafo anterior permite identificar una serie de características de las relaciones entre parásitos y hospedadores que justifican su inclusión entre los grandes asuntos de la biología. En primer lugar, el parasitismo implica el establecimiento de relaciones muy estrechas entre organismos muy distintos, como mínimo el parásito y su hospedador definitivo (en el que el parásito se reproduce), pero con frecuencia también otros hospedadores intermediarios o secundarios, reservorios o vectores. Los procesos de selección natural antagónica que afectan a estas complejas relaciones han permitido consolidar algunas de las ideas que dan cuerpo a la teoría evolutiva, como la “hipótesis de la reina de corazones”, que postula la existencia de carreras de armamentos coevolutivas entre parásitos y hospedadores (como consecuencia de la selección que cada uno de ellos ejerce sobre su contrario), en las que ni los parásitos ni los hospedadores consiguen nunca proclamarse ganadores definitivos. Es importante tener en cuenta que los parásitos causan enfermedades, configurando así uno de los más importantes desafíos a los que se enfrentan los organismos vivos en su afán por sobrevivir y reproducirse. No es por ello sorprendente que los parásitos hayan sido el objeto de enormes esfuerzos de investigación clínica y veterinaria, así como el blanco de las investigaciones dedicadas a la evolución de las enfermedades. Por último, determinar la diversidad de especies de parásitos que existen no sólo contribuye al mejor conocimiento de toda la biodiversidad, sino que supone un importante punto de partida para estudiar algunas de las formas de vida más fascinantes de cuantas se dan en la naturaleza. La importancia del parasitismo en términos de biodiversidad se suele considerar siempre en relación con el posible impacto negativo del transporte de patógenos, reservorios y vectores (Daszak et al. 2000). Por ejemplo, la introducción de reservorios y vectores de *Plasmodium relictum* en Hawai causó la extinción de numerosas especies de aves nativas, el acantonamiento de muchas otras en hábitats sin vectores, y una fuerte selección de individuos resistentes en las poblaciones locales (Woodworth et al. 2005). Sin embargo, una circunstancia que rara vez se tiene en cuenta, quizás por la mala prensa de los parásitos o por lo difícil que resulta estudiarlos, es que cada vez que se extingue una especie, la pérdida de biodiversidad que conlleva su desaparición se multiplica por el número de sus especies parásitas específicas (Koh et al. 2004), una pérdida que puede ser especialmente dolorosa por el potencial que tienen los parásitos para la investigación de enfermedades (el estudio detallado de los mecanismos que han desarrollado a lo largo de su evolución para protegerse de la resistencia de sus hospedadores podría ayudarnos a comprender mejor el funcionamiento del sistema inmune, por ejemplo).

## A hombros de gigantes: un poco de historia

Aunque los parásitos se conocen desde antiguo, su importancia como agente evolutivo no fue reconocida hasta hace relativamente poco. Curiosamente, la primera formalización de hipótesis acerca del papel de los parásitos como agentes de selección natural no se debe a ningún biólogo clínico ni a ningún naturalista, sino a un genetista. En 1949, J.B.S. Haldane propuso que, de acuerdo con los desarrollos de la teoría evolutiva que acababan de cristalizar en lo que hoy conocemos como la síntesis moderna, un organismo podría adquirir mediante selección natural la resistencia frente a organismos patógenos más fácilmente que la resistencia frente a sus depredadores, un agente evolutivo este último que, sin embargo, había recibido mucha más atención en los círculos científicos de la época (Lederberg 1999). La comunidad científica no asumió el desafío enseguida, y tardaron en producirse nuevos desarrollos conceptuales dirigidos a una mejor comprensión de la selección natural impuesta por el parasitismo. De hecho, la parasitología fue una ciencia eminentemente descriptiva hasta la década de los 80. Probablemente, uno de los más importantes revulsivos del estudio de la ecología y evolución del parasitismo se debió a William Hamilton y Marlene Zuk (1982), quienes propusieron que muchos de los caracteres ornamentales por los que las aves eligen a sus parejas han evolucionado como indicadores de la resistencia a los parásitos de sus poseedores. Desde ese momento, el estudio de la ecología de las relaciones entre parásitos y hospedadores creció enormemente, extendiéndose a casi cualquier aspecto de la ecología evolutiva –muy especialmente la de las aves (Clayton y Moore 1997)–, y abonando el campo para la incorporación de las técnicas moleculares cuando éstas se hicieron accesibles a los biólogos de campo.

A finales del siglo XX, se publicaron algunos protocolos para la amplificación mediante PCR de fragmentos de ADN mitocondrial (genes de ARN ribosómico; Feldman et al. 1995) de algunos parásitos comunes en poblaciones naturales, especialmente de parásitos de la malaria aviaria (del género *Plasmodium*). Sin embargo, dichos protocolos no servían para investigar la mayoría de los parásitos existentes en la naturaleza, por lo que su uso no llegó nunca a extenderse demasiado. Todo esto cambió cinco años más tarde, cuando el equipo de Staffan Bensch, de la Universidad sueca de Lund, propuso un nuevo protocolo basado en la amplificación de un fragmento del gen citocromo b, localizado en la mitocondria del parásito, a partir de muestras de sangre de aves obtenidas en la naturaleza (Bensch et al. 2000). Este método servía para la práctica totalidad de especies de parásitos de la malaria aviaria, además de otras especies afines, muy extendidas y estudiadas en poblaciones naturales (las del género *Haemoproteus* y, más recientemente, las de *Leucocytozoon*). De pronto, se disponía de un método de diagnóstico e identificación de parásitos en poblaciones naturales de aves rápido, fiable y fácil de utilizar incluso por los no especialistas, que además tenía una capacidad de detección de parásitos varios órdenes de magnitud mayor que la de la microscopía (Hellgren et al. 2004). Obviamente, el desarrollo de esta técnica supuso una revolución no sólo metodológica, sino también conceptual, que pasaremos a describir con mayor detalle en las páginas siguientes (Fig. 1).



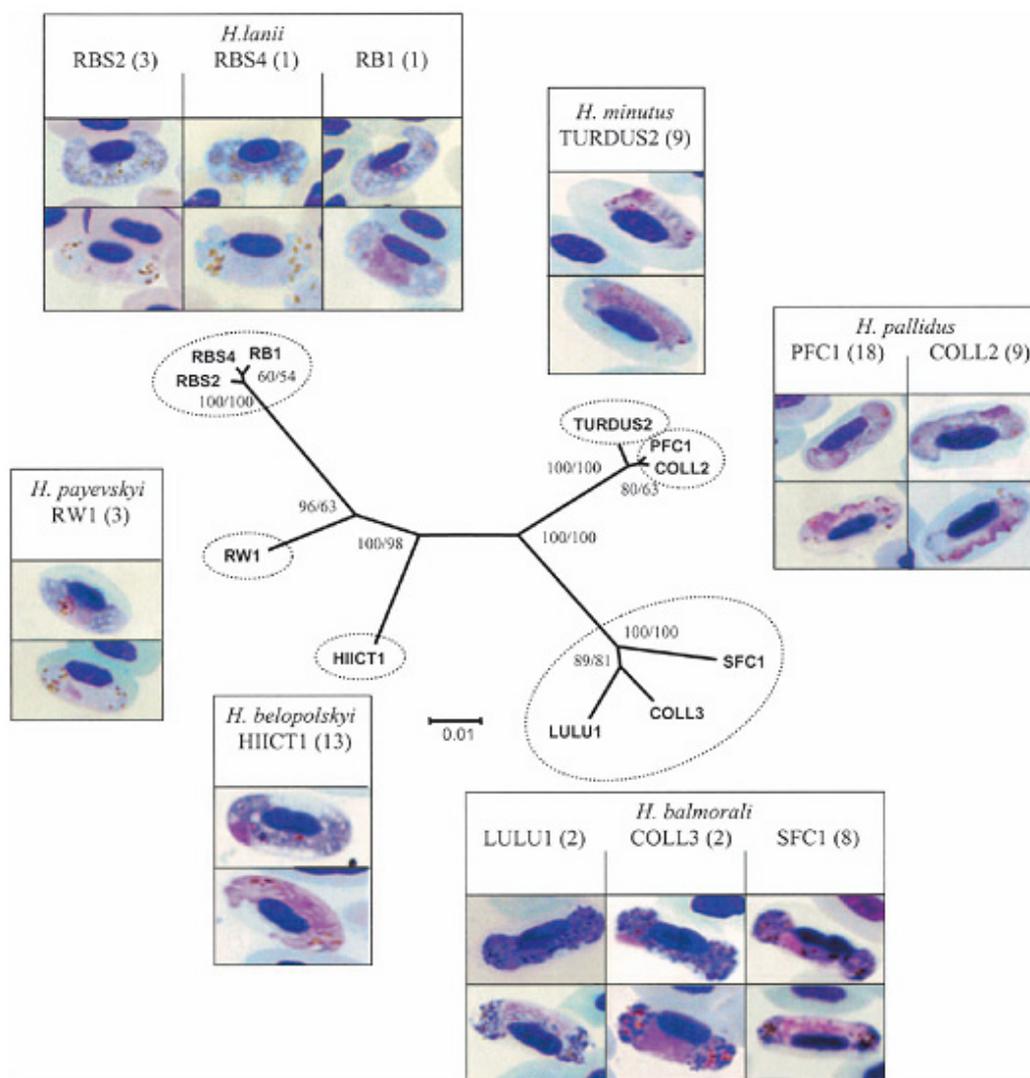
**Figura 1.** El estudio de la malaria aviaria experimentó una revolución con la publicación del primer protocolo universal para la secuenciación de un fragmento del gen citocromo *b* de parásitos sanguíneos de aves (Bensch et al. 2000). El gráfico muestra el número de publicaciones incluidas en la base de datos bibliográfica ISI-Web of Science (Thomson, enero de 2009) con la palabra clave “avian malaria”. La flecha indica el año de publicación del trabajo de Bensch et al. (2000).

## Del “todo está en todas partes” a la diversidad críptica

Una visión tradicional entre los ecólogos microbianos es que los microorganismos tienden a formar linajes poco diversos y generalmente cosmopolitas, como consecuencia de su aparente ubicuidad y facilidad de dispersión (O'Malley 2007). De acuerdo con este estado de cosas, la idea de que “todo está en todas partes” se aplicaba también a los parásitos sanguíneos de las aves cuando éstos se estudiaban sólo al microscopio. Al fin y al cabo, la sangre de las aves es un medio muy homogéneo, y los parásitos parecen ser fácilmente transportables, localmente por sus insectos vectores, y entre regiones geográficas remotas gracias a las grandes migraciones de las que son capaces sus hospedadores. Así, hasta hace relativamente poco se habían descrito unos pocos cientos de especies de parásitos sanguíneos de aves identificables al microscopio (Valkiūnas 2005), la mayoría de ellas presentes en una amplia variedad de especies hospedadoras con orígenes filogenéticos y geográficos bastante diversos. Sin embargo, esta idea se ha ido difuminando, hasta ser completamente rebatida, desde que es posible la identificación de variantes genéticas de parásitos mediante técnicas moleculares.

En primer lugar, llama la atención la existencia de una enorme diversidad genética dentro de cada una de las especies de parásitos reconocidas por la taxonomía tradicional (las denominadas especies morfológicas), diversidad que no estamos sino empezando a comprender (Martinsen et al. 2006). Resulta gratificante comprobar que las técnicas moleculares apoyan la taxonomía tradicional: las especies morfológicas forman grupos de linajes recíprocamente monofiléticos (grupos cuyos miembros descienden todos de un ancestro común; Fig. 2), pero también que la diversidad de parásitos es mucho más compleja de lo que se creía, existiendo numerosas variantes genéticas (en ocasiones decenas) dentro de cada especie morfológica (Hellgren et al. 2007; Pérez-Tris et al. 2007). Algunas de estas variantes sin duda representan la variación

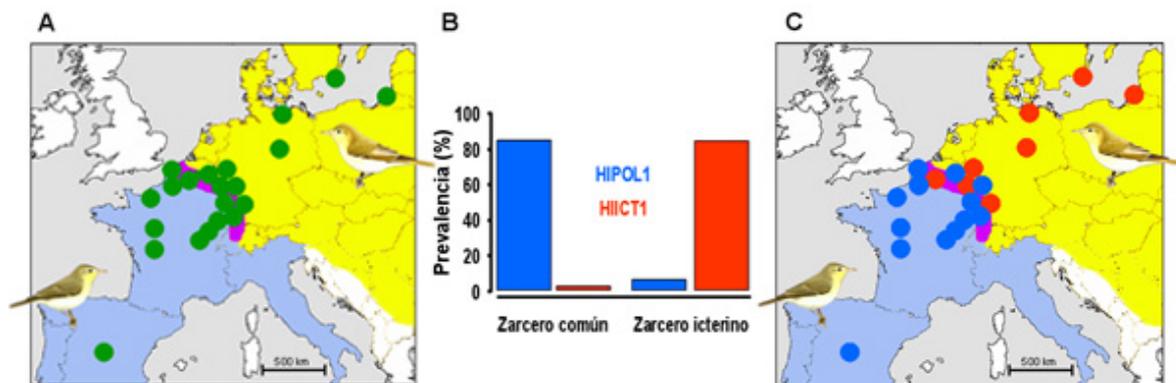
genética en el citocromo *b* que es esperable dentro de las distintas especies. Sin embargo, una propiedad interesante de estas variantes genéticas es que, con frecuencia, su distribución está muy estructurada entre especies hospedadoras, con parásitos específicos de distintas especies de aves aun cuando éstas se presentan en los mismos hábitats (Waldenström et al. 2002; Fallon et al. 2005; Ricklefs et al. 2005) y cuentan con claras oportunidades de colonizar no ya individuos de la misma especie, sino el mismo hospedador individual (Pérez-Tris y Bensch 2005a). Esta especificidad enseguida sugirió la posibilidad de que las variantes genéticas de los parásitos fuesen entidades biológicamente relevantes, quizás especies diferentes. De hecho, la secuenciación de genes nucleares y mitocondriales de los mismos parásitos ha permitido comprobar que, en la mayoría de los casos, las variantes genéticas podrían clasificarse sin problemas como buenas especies biológicas. Esta diversidad críptica de parásitos (críptica porque no podemos percibirla mediante la observación de los parásitos al microscopio) nos obliga a adoptar un nuevo paradigma a la hora de interpretar la evolución de las interacciones entre parásitos y hospedadores. De la visión clásica de que unos pocos parásitos se reparten la explotación de toda la diversidad de aves (el "todo está en todas partes") pasamos a la posibilidad de que existan tantas especies de parásitos como especies de aves diferentes pueblan el planeta, o incluso más (Bensch et al. 2004).



**Figura 2.** Relaciones filogenéticas de 11 variantes de citocromo *b* aisladas de infecciones correspondientes a 6 especies morfológicas diferentes de *Haemoproteus*. Cada especie morfológica tiene sus variantes genéticas agrupadas en un círculo. Se representan imágenes microscópicas de macrogametocitos (células prerreproductivas femeninas) y microgametocitos (masculinos, abajo) de los parásitos de cada especie, con el número de observaciones para cada variante genética entre paréntesis. Los números en las ramas del árbol filogenético representan el apoyo estadístico (medido como porcentaje) de dos métodos diferentes de reconstrucción filogenética (Bayesiano y de máxima verosimilitud, respectivamente). [Modificado de Hellgren et al. 2007a].

## Parásitos con diferentes papeles ecológicos

Aparte de sus interesantes patrones de variación genética, otra característica interesante de los parásitos identificados mediante técnicas moleculares es que las diferentes variantes frecuentemente demuestran claras diferencias ecológicas: diferente prevalencia y distribución geográfica (Fallon et al. 2003), distinta fenología de transmisión (Pérez-Tris y Bensch 2005b), o diferente patrón de asociación con el sistema inmunitario de su hospedador (Bonneaud et al. 2006), entre otras características. Un buen ejemplo de las implicaciones de la singularidad ecológica de las diferentes variantes genéticas de parásitos lo encontramos en los zarceros común (*Hippolais polyglotta*) e icterino (*H. icterina*), dos especies hermanas de aves que ocupan Europa occidental y oriental, respectivamente, con una estrecha zona de contacto en el centro del continente, donde ambas especies coinciden e incluso en ocasiones hibridan (**Figura 3**). La existencia de esta zona de contacto se interpreta como el resultado del encuentro de ambas especies tras su expansión postglacial en Europa desde refugios glaciares separados (donde cada especie habría persistido durante los periodos más fríos del Pleistoceno), probablemente localizados en las penínsulas Ibérica y Balcánica. En este contexto, una cuestión interesante es qué ocurre con las poblaciones de parásitos cuando sus especies hospedadoras se encuentran en una zona de contacto. Una posibilidad es que los parásitos encuentren una oportunidad para expandirse de una especie a la otra, pero también puede ocurrir que lo que encuentren sea una barrera contra la dispersión, por ejemplo si cada especie hospedadora tiene parásitos muy específicos, incapaces de completar su ciclo en la otra especie. El análisis microscópico de los parásitos de los zarceros demuestra que ambas especies están frecuentemente infectadas por un parásito fácilmente identificable por su morfología, *Haemoproteus belopolskyi*, lo que apoya la idea de que este parásito se dispersa libremente entre especies a ambos lados de la zona de contacto. Sin embargo, cuando se analiza el citocromo *b* de estos parásitos, encontramos que cada especie de zarcero tiene una variante genética típica, cuya prevalencia supera el 80% de individuos infectados en su especie de ave característica, pero no llega al 5% en la otra especie. Más aún, las escasas ocasiones en que una variante del parásito infecta a la especie de zarcero “equivocada” tienen lugar en la zona de contacto, lo cual sugiere que las dos variantes genéticas del parásito pueden transmitirse de una especie de zarcero a la otra allí donde ambas coinciden, pero dicho intercambio no prospera más allá de esa zona, dejando a cada variante de parásito restringida a una única especie hospedadora en la práctica totalidad de su área de distribución (Reullier et al. 2006). En otras palabras, la zona de contacto entre ambos zarceros, lejos de ser una vía de dispersión de parásitos entre dos especies hospedadoras (la conclusión derivada del análisis microscópico), es más bien el límite de la distribución geográfica de cada parásito. Lo más sorprendente de este hecho es que ambas variantes genéticas de *H. belopolskyi* se diferencian tan solo en una base de la secuencia del citocromo *b* utilizada para su identificación (una divergencia de tan solo el 0,2%). Esto nos lleva a admitir el inquietante hecho de que la diferencia mínima detectable entre dos variantes genéticas de parásitos puede ser suficiente para que éstas constituyan entidades biológicas diferenciadas.



**Figura 3.** El parásito *Haemoproteus belopolskyi*, que puede identificarse al microscopio por su morfología (véase Fig. 2), infecta al zarcero común (cuya distribución se representa en los mapas en color azul) y al zarcero icterino (en amarillo) en todas las localidades de Europa donde las infecciones de parásitos de estas aves han sido estudiadas (A). La franja de color púrpura en la que se concentra gran parte de las localidades muestreadas representa la zona de contacto entre ambas especies de zarceros. El análisis del citocromo *b* de estas infecciones muestra un reparto muy desigual (B) de dos variantes genéticas de dicho parásito entre ambas especies hospedadoras, cuya distribución geográfica (C) dibuja un escenario completamente diferente del que sugería el análisis microscópico. Para más detalles, véase Reullier et al. (2006).

Las técnicas moleculares han permitido rebatir una de las ideas tradicionales acerca de la interacción entre las aves y sus parásitos: el papel de las especies de aves migratorias como puente para la dispersión de parásitos entre las avifaunas residentes en distintos continentes unidos por las rutas migratorias (Hellgren et al. 2007b). El análisis de la transmisión de más de 200 linajes de parásitos de aves en Europa y África ha permitido comprobar que, aunque las aves migratorias se infectan con parásitos europeos y africanos (ya que se exponen a ambos tipos) y transportan dichos parásitos en la sangre

durante sus migraciones intercontinentales, cada especie de parásito se transmite en un solo continente, y rara vez consigue colonizar las especies residentes en el otro continente. Así, la transmisión tanto en Europa como en África sólo se ha podido constatar en unos pocos de los parásitos investigados (menos del 1%), un patrón que podría explicarse por la ausencia de vectores capaces de transmitir el mismo parásito en ambos continentes. En cualquier caso, es interesante indicar que dentro de cada especie morfológica existen especies crípticas de transmisión europea y africana. Además, los marcadores moleculares han permitido comprobar que el cambio de región geográfica de transmisión ha ocurrido en varias ocasiones independientes en diferentes linajes parásitos, que posteriormente han experimentado una diversificación importante en su nueva área de transmisión (Hellgren et al. 2007b).

Por último, la identificación de parásitos mediante técnicas moleculares es también importante porque permite investigar las posibles diferencias en la virulencia de diferentes especies crípticas de parásitos. Y no sólo eso, también permite analizar las consecuencias de la infección simultánea por varias de estas especies. De hecho, las infecciones múltiples pueden ser especialmente virulentas como consecuencia de la competencia entre los parásitos presentes en la sangre (Read y Taylor 2001), una circunstancia que parece aplicarse a los parásitos sanguíneos en poblaciones naturales de avión común *Delichon urbica* (Marzal et al. 2008).

## ¿Por qué hay tantos parásitos?

Quizás uno de los más importantes avances científicos que ha permitido el estudio genético de los parásitos es la reconstrucción de su filogenia, y con ella la interpretación de sus patrones de diversificación. A pesar de lo mucho que se ha investigado este grupo de parásitos, las relaciones filogenéticas entre y dentro de los géneros *Plasmodium*, *Haemoproteus* y *Leucocytozoon* siguen sujetas a debate (Martinsen et al. 2008). Resolver las relaciones evolutivas entre estos parásitos es importante no sólo para entender la evolución de unos agentes patógenos con tanta importancia socioeconómica y ecológica. También lo es porque, utilizando filogenias bien apoyadas, es más fácil comprender los procesos de diversificación de los parásitos y los patrones de coevolución con sus hospedadores (Pérez-Tris et al. 2005). Con la ayuda de las técnicas moleculares, se ha podido comprobar que los principales mecanismos de diversificación de linajes de los parásitos sanguíneos de las aves son la coespeciación (la divergencia de especies de parásitos paralela a la de sus hospedadores) y el cambio de hospedador (un evento frecuentemente seguido de otro de especialización; Ricklefs et al. 2004). Recientemente se ha podido comprobar que, además de estos procesos, algunos linajes parásitos han divergido sustancialmente dentro de una única especie hospedadora, generando comunidades de parásitos muy ricas y exclusivas de dicha especie (un ejemplo de este fenómeno se da en la curruca capirotada, *Sylvia atricapilla*; Pérez-Tris et al. 2007). La complicación de las interacciones entre parásitos y hospedadores como consecuencia de dichos eventos de diversificación abre las puertas a nuevas vías de investigación muy prometedoras.

## El futuro de la parasitología molecular

Todo lo que se ha expuesto hasta aquí es el resultado de investigaciones realizadas a base de secuenciar uno o unos pocos genes de los parásitos, principalmente genes mitocondriales. Aunque dichas técnicas han supuesto un claro punto de inflexión en el conocimiento de estos parásitos y de las relaciones que mantienen con sus especies hospedadoras, ya empieza a notarse que los científicos las han llevado hasta el límite de sus posibilidades. Por ejemplo, si consideramos que las diferentes variantes de parásitos identificadas mediante la secuenciación de genes mitocondriales son auténticas especies, resulta algo incomodo no disponer de información acerca de la variabilidad genética existente dentro de cada una de esas especies, y cómo se distribuye dicha variación a diferentes escalas geográficas. Para responder a este tipo de cuestiones, resulta fundamental el desarrollo de otro tipo de marcadores, como microsátélites o polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). Sin embargo, poner a punto estas técnicas es especialmente difícil en el caso de parásitos intracelulares, cuyo ADN se encuentra en baja proporción en comparación con el de su hospedador. Sin lugar a dudas, la secuenciación del genoma completo de algunos parásitos de la malaria humana supondrá una ayuda en este sentido (De Roode y Read 2003), aunque dichos desarrollos están sirviendo para comprobar que, desafortunadamente, los marcadores de los parásitos humanos no son de aplicación inmediata a las especies de parásitos que infectan a las aves.

Pero no nos desanimemos: el desarrollo de nuevas tecnologías, como la selección mediante microscopía de precisión de células individuales, o la amplificación de ADN a partir de una única célula, dibujan un panorama optimista en cuanto a las posibilidades que existen de desarrollar marcadores moleculares de los parásitos sanguíneos de las aves. Este tipo de marcadores permitirá, en un futuro no muy lejano, investigar con detalle la filogeografía de estos parásitos, conseguir una mayor resolución en su análisis sistemático, o identificar la variación existente en loci implicados en su interacción con sus hospedadores, como los que codifican los antígenos activadores de la respuesta inmune, o los que ayudan al parásito a combatir la resistencia del hospedador. Obviamente, estos desarrollos se beneficiarán de su combinación con aproximaciones microscópicas, que no por llevar más tiempo usándose están anticuadas; de hecho, resultan imprescindibles para una correcta interpretación de los datos genéticos, aumentando considerablemente la profundidad de análisis cuando se combinan con éstos (Valkiūnas et al. 2008). Además, aunque las técnicas moleculares suelen incrementar la capacidad de detección de infecciones de parásitos, la microscopía sigue siendo imprescindible para detectar aquellos parásitos cuyo ADN es más difícil de amplificar (Valkiūnas et al. 2006). Sin duda, los sólidos puentes que han conseguido establecerse entre la

parasitología tradicional y las nuevas aproximaciones moleculares nos están permitiendo disfrutar de uno de los momentos más excitantes en la historia de la parasitología ecológica.

## Agradecimientos

Gracias a todos los que han contribuido a generar los conocimientos que se resumen en este trabajo, y a Pedro Jordano por invitarme a divulgarlos aquí.

## Referencias

- Bensch, S., Stjernman, M., Hasselquist, D., Östman, Ö., Hansson, B., Westerdahl, H., Torres-Pinheiro, R. 2000. Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 267:1583-1589.
- Bensch, S., Pérez-Tris, J., Waldenström, J., Hellgren, O. 2004. Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences in avian malaria parasites - multiple cases of cryptic speciation? *Evolution* 58:1617-1621.
- Bonneaud, C., Pérez-Tris, J., Federici, P., Chastel, O., Sorci, G. 2006. Mhc alleles associated with local resistance to malaria in a passerine. *Evolution* 60: 383-389.
- Clayton, D.H., Moore, J. 1997. *Host-parasite evolution - General principles and avian models*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Daszak, P., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D. 2000. Emerging infectious diseases of wildlife - threats to biodiversity and human health. *Science* 287:443-449.
- De Roode, J.C., Read, A.F. 2003. Evolution and ecology, after the malaria genomes. *Trends in Ecology and Evolution* 18:60-61.
- Hellgren, O., Waldenström, J., Bensch, S. 2004. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. *Journal of Parasitology* 90:797-802.
- Hellgren, O., Križanauskienė, A., Valkiūnas, G., Bensch, S. 2007a. Diversity and phylogeny of mitochondrial cytochrome b lineages from six morphospecies of avian *Haemoproteus* (Haemosporida, Haemoproteidae). *Journal of Parasitology* 93:889-896.
- Hellgren, O., Waldenström, J., Pérez-Tris, J., Szöllősi, E., Hasselquist, D., Križanauskienė, A., Ottosson, U., Bensch, S. 2007b. Detecting shifts of transmission areas in avian blood parasites - a phylogenetic approach. *Molecular Ecology* 16:1281-1290.
- Koh, L.P., Dunn, R.R., Sodhi, N.S., Colwell, R.K., Proctor, H.C., Smith, V.S. 2004. Species coextinctions and the biodiversity crisis. *Science* 305:1632-1634.
- Fallon, S.M., Bermingham, E., Ricklefs, R.E. 2003. Island and taxon effects in parasitism revisited: avian malaria in the Lesser Antilles. *Evolution* 57:606-615.
- Fallon, S.M., Bermingham, E., Ricklefs, R.E. 2005. Host specialization and geographic localization of avian malaria parasites: a regional analysis in the Lesser Antilles. *American Naturalist* 165:466-480.
- Feldman, R.A., Freed, L.A., Cann, R.L. 1995. A PCR test for avian malaria in Hawaiian birds. *Molecular Ecology* 4:663-673.
- Hamilton, W.D., Zuk, M. 1982. Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites?. *Science* 218:384-387.
- Lederberg, J. 1999. J.B.S. Haldane (1949) on infectious disease and evolution. *Genetics* 153:1-3.

- Martinsen, E.S., Paperna, I., Schall, J.J. 2006. Morphological versus molecular identification of avian Haemosporidia: an exploration of three species concepts. *Parasitology* 133:279-288.
- Martinsen, E.S., Perkins, S.L., Schall, J.J. 2008. A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): Evolution of life-history traits and host switches. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47:261-273.
- Marzal, A., Bensch, S., Reviriego, M., Balbontín, J., De Lope, F. 2008. Effects of malaria double infection in birds: one plus one is not two. *Journal of Evolutionary Biology* 21:979-987.
- O'Malley, M. 2007. The nineteenth century roots of 'everything is everywhere'. *Nature Reviews Microbiology* 5:647-651.
- Pérez-Tris, J., Bensch, S. 2005a. Diagnosing genetically diverse avian malarial infections using mixed-sequence analysis and TA-cloning. *Parasitology* 131:15-23.
- Pérez-Tris, J., Bensch, S. 2005b. Dispersal increases local transmission of avian malarial parasites. *Ecology Letters* 8:838-845.
- Pérez-Tris, J., Hasselquist, D., Hellgren, O., Križanauskienė, A., Waldenström, J., Bensch, S. 2005. What are malaria parasites?. *Trends in Parasitology* 21:209-211.
- Pérez-Tris, J., Hellgren, O., Križanauskienė, A., Waldenström, J., Secondi, J., Bonneaud, C., Fjeldså, J., Hasselquist, D., Bensch, S. 2007. Within-host speciation of malaria parasites. *PLoS ONE* 2:e235.
- Read, A.F. y Taylor, L.H. 2001. The ecology of genetically diverse infections. *Science* 292:1099-1102.
- Reullier, J., Pérez-Tris, J., Bensch, S., Secondi, J. 2006. Diversity, distribution and exchange of blood parasites meeting at an avian moving contact zone. *Molecular Ecology* 15:753-763.
- Ricklefs, R.E., Fallon, S.M., Bermingham, E. 2004. Evolutionary relationships, cospeciation, and host switching in avian malaria parasites. *Systematic Biology* 53:111-119.
- Ricklefs, R.E., Swanson, B.L., Fallon, S.M., Martínez-Abraín, A., Scheuerlein, A., Gray, J., Latta, S.C. 2005. Community relationships of avian malaria parasites in southern Missouri. *Ecological Monographs* 75:543-559.
- Valkiūnas, G. 2005. *Avian malaria parasites and other haemosporidia*. CRC Press, Boca Raton. USA.
- Valkiūnas, G., Atkinson, C.T., Bensch, S., Sehgal, R.N.M., Ricklefs, R.E. 2008. Parasite misidentifications in GenBank: how to minimise their number?. *Trends in Parasitology* 24:247-248.
- Valkiūnas, G., Bensch, S., Iezhova, T.A., Križanauskienė, A., Hellgren, O., Bolshakov, C.V. 2006. Nested cytochrome b polymerase chain reaction diagnostics underestimate mixed infections of avian blood haemosporidian parasites: microscopy is still essential. *Journal of Parasitology* 92:418-422.
- Waldenström, J., Bensch, S., Kiboi, S., Hasselquist, D., Ottosson, U. 2002. Cross-species infection of blood parasites between resident and migratory songbirds in Africa. *Molecular Ecology* 11:1545-1554.
- Woodworth, B.L., Atkinson, C.T., LaPointe, D.A., Hart, P.J., Spiegel, C.S., Tweed, E.J., Henneman, C., LeBrun, J., Denette, T., DeMots, R., Kozar, K.L., Triglia, D., Lease, D., Gregor, A., Smith, T., Duffy, D. 2005. Host population persistence in the face of introduced vector-borne diseases: Hawaii amakihi and avian malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:1531-1536.