



Importancia de la genómica en aves para entender su interacción con patógenos

L. García-Longoria^{1,2,*}, M.J. Ruiz-López³

(1) Department of Biology, Lund University, Lund, Suecia.

(2) Departamento de Anatomía, Biología Celular y Zoología, Universidad de Extremadura, E-506071 Badajoz, España.

(3) Departamento de Humedales, Estación Biológica de Doñana, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 41092 Sevilla, España.

* Autor de correspondencia: L. García-Longoria [luzlongoria@unex.es]

> Recibido el 03 de abril de 2020 - Aceptado el 15 de mayo de 2020

García-Longoria, L., Ruiz-López, M.J. 2020. Importancia de la genómica en aves para entender su interacción con patógenos. *Ecosistemas* 29(2): 1969. <https://doi.org/10.7818/ECOS.1969>

Una de las consecuencias de la acción humana y el cambio global es el aumento de enfermedades infecciosas no solo en humanos sino también en fauna silvestre. Los efectos negativos de los patógenos pueden ser devastadores llegando a diezmar poblaciones naturales e incluso causar la extinción de especies. Por ello, es imperativo un conocimiento más profundo de los mecanismos y estrategias que estos agentes llevan a cabo durante su ciclo de vida, así como las respuestas inmunológicas y bioquímicas que sus hospedadores naturales muestran durante la interacción hospedador-patógeno. Gracias al desarrollo de metodologías moleculares como la genómica y a través del análisis de transcriptomas hoy en día sabemos un poco más acerca de las cascadas bioquímicas y respuestas inmunológicas que se dan en la interacción hospedador-patógeno. El presente artículo se centra en mostrar los avances en el estudio genómico y transcriptómico de infecciones en aves provocadas por parásitos del género *Plasmodium* y del Virus del Nilo Occidental. Así mismo, revisamos los problemas a los que los científicos deben hacer frente para un mejor entendimiento de la dinámica hospedador-patógeno

Palabras clave: aves; genómica; malaria; patógenos; Virus del Nilo Occidental

García-Longoria, L., Ruiz-López, M.J. 2020. Relevance of genomics for a better understanding of the host-parasite interaction in birds. *Ecosistemas* 29(2):1969. <https://doi.org/10.7818/ECOS.1969>

Anthropogenic pressure and global change are favouring the increase of infectious diseases not only in humans but also in wildlife. The negative effects of pathogens can be devastating, affecting natural populations and even causing the extinction of species. Therefore, it is fundamental to understand the mechanisms and strategies that these agents develop during their life cycle, as well as the immunological and biochemical responses that natural hosts show during host-pathogen interaction. Development of new molecular tools such as genomics or the analysis of transcriptomes have provided the scientific community significant information about host-pathogen interactions, including the biochemical cascades and immunological responses that occur. This article focuses on showing the advances in this field in birds infected with avian *Plasmodium* and West Nile Virus. In addition, we also review the problems that scientists must face in order to better understand the host-pathogen dynamics.

Key words: birds; genomic; malaria; pathogens; West Nile Virus

La importancia de la interacción hospedador-patógeno

Los patógenos son responsables de un gran número de enfermedades entre las poblaciones animales, incluyendo los humanos. Actualmente el área de distribución de muchos agentes patógenos está cambiando a un ritmo sin precedentes, como resultado de la actividad humana y el cambio global que conlleva por ejemplo alteraciones en los hábitats, la dispersión accidental o la introducción intencionada de especies invasoras (Muhlfeld et al. 2014). Además, su dispersión se ha visto favorecida por el crecimiento tanto de la economía y de la demografía que ha conducido a millones de personas a vivir en áreas urbanas masificadas facilitando así la propagación de infecciones (Neiderud 2015). Por otra parte, la deforestación ha generado cambios en la ecología, epidemiología y distribución de las enfermedades causadas por patógenos transmitidos por vectores (p.e. fiebre del Nilo Occiden-

tal, malaria, leishmania, Chagas) favoreciendo así la expansión de la enfermedad (Sehgal 2010). En este sentido, estudios recientes han expuesto que la tasa de picadura del mosquito *Anopheles darlingi* (vector principal de malaria humana en el Amazonas) en las zonas tropicales deforestadas fue más de 278 veces mayor que las detectadas en áreas que no lo estaban (Vittor et al. 2009). De hecho, se mostró que la deforestación puede incrementar en un 50% la prevalencia (presencia de parásito) en humanos (Olson et al. 2010). Así pues, es más importante que nunca conocer los mecanismos que determinan las interacciones hospedador-patógeno, para entender cómo los patógenos evaden las defensas del hospedador y como los organismos hospedadores se defienden. Dos de las herramientas más interesantes de las que hoy en día disponemos son la genómica (definido como el estudio de los genomas y sus aplicaciones) y la transcriptómica (entendido como el estudio de las moléculas de ARN mensajero presentes en una célula o grupo de células en un momento determinado).

Los patógenos representan una de las mayores fuerzas selectivas de la naturaleza (Fumagalli et al. 2011; Alves et al. 2019; Shultz y Sackton 2019). Los efectos negativos de los patógenos sobre sus hospedadores pueden ser leves, o pueden causar enfermedades graves, provocando altas tasas de mortalidad (Roelke-Parker et al. 1996; Palinauskas et al. 2008; Turner et al. 2011). En este sentido, las infecciones pueden tener efectos sobre el crecimiento (Kelehear et al. 2011), supervivencia (Martínez-de la Puente et al. 2010), fecundidad (Abbate et al. 2015) y reproducción (Merino et al. 2000; Marzal et al. 2005) de los animales afectando así a su historia vital a través, en algunas ocasiones, incluso de las extinciones en masa de especies animales (Warner 1986; LaPointe et al. 2010). Debido a los efectos negativos provocados por patógenos, los animales han desarrollado un amplio abanico de mecanismos de defensa para reducir la probabilidad de infección y/o sus efectos nocivos (Poulin 2011). Estos mecanismos son muy numerosos (Demas y Nelson 2012) ya que las células del sistema inmune deben reconocer elementos extraños y transmitir esa información para que se active la subsiguiente cascada inmune y así hacer frente al patógeno. Las respuestas que el sistema inmune lleva a cabo frente a organismos patógenos pueden ser considerablemente rápidas o, en algunos casos, lentas. De igual forma, estas respuestas inmunológicas pueden ser muy generales y efectivas frente a un gran rango de patógenos o pueden ser muy específicas y atacar solo a un determinado tipo de organismo (Schmid-Hempel 2011). Las diferencias en la velocidad de la respuesta inmunológica, es decir, la rapidez o la eficacia, dependen en gran medida del propio sistema inmune del hospedador, del tipo de patógeno y de la interacción entre ambos. Además, esta eficacia o rapidez en la respuesta inmunológica del hospedador depende de varios factores como la condición física, alimentación, nivel de estrés e incluso de la variabilidad genómica del animal. Esta última puede determinar, en gran medida, el camino que el organismo infectado llevará en la lucha frente a ese patógeno determinado (Schmid-Hempel 2011). Ante tal variabilidad de factores que pueden afectar a la eficacia de la respuesta inmunológica, cabe preguntarse qué

mecanismos tienen lugar en el hospedador para que cada uno de los individuos infectados lleven a cabo una respuesta inmunológica diferente. Dos herramientas son fundamentales para la comprensión de cómo diferentes individuos pueden responder de forma desigual ante un mismo patógeno. Por un lado, la carga genómica (ADN) del individuo, es decir, los genes que lo conforman y le hacen ser y comportarse tal y como es. Por otro lado, analizando el transcriptoma (moléculas de ARN mensajero presentes en una célula o grupo de células en un momento determinado), es decir, cómo cada individuo reacciona ante un patógeno con las herramientas (ADN) que posee. Analizando, por tanto, el transcriptoma del hospedador y del patógeno a lo largo de una infección podríamos profundizar en el entendimiento de los mecanismos de defensa y ataque utilizados durante la invasión celular y determinar qué genes se expresan y qué mecanismos moleculares se están poniendo en marcha en cada momento.

Los mecanismos llevados a cabo tanto por el hospedador como por el patógeno, y la eficacia de los mismos, conformarán la interacción hospedador-patógeno y, por tanto, definirán el camino que el organismo infectado (hospedador) tomará. En este sentido, podemos decir que la interacción depende de las actuaciones que lleven a cabo cada una de las partes y de sus características genómicas y transcriptómicas. Estas interacciones tienen como resultado diferentes curvas de recuperación. Por una parte, el hospedador puede o no tolerar la infección patogénica, es decir, luchar o no frente a la misma. El resultado de esta lucha puede provocar la recuperación del hospedador (Fig. 1; curvas a y c) o la muerte del mismo (Fig. 1; curva d). Por otra parte, el hospedador puede mostrar cierta resistencia frente a la infección, es decir, evitar la dispersión del patógeno y su establecimiento en el organismo hospedado (Fig. 1; curva b). De esta forma, los hospedadores pueden ser tolerantes o resistentes a un determinado organismo patógeno. Este hecho pone de manifiesto la diversidad de respuestas que el hospedador puede llevar a cabo frente a un organismo patógeno y nos hace cuestionar los mecanismos subyacentes que provocan tales diferencias.

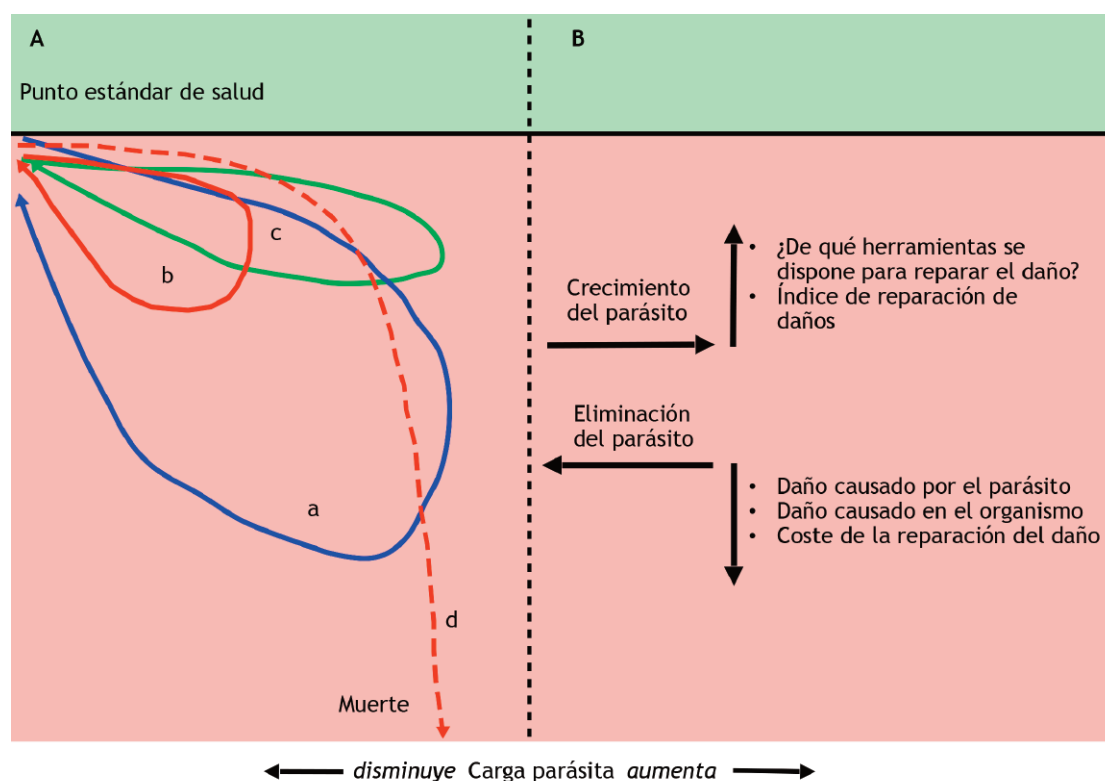


Figura 1. A) Curvas de recuperación-infección de cuatro individuos diferentes (a-d) frente a la misma infección parasita. **B)** Factores que afectan a las curvas de recuperación (figura adaptada de Schneider (2011)).

Figure 1. A) Theoretical health recovery curves for four different individuals (a-d). **B)** Factors affecting the direction of the movement of an infected individual along its recovery curve (figure adapted from Schneider (2011)).

Análisis genómicos y transcriptómicos para entender la interacción hospedador-patógeno

Para entender por qué a algunos hospedadores les afectan más los patógenos, mientras que otros son capaces de resistir infecciones es fundamental entender la base genómica y molecular de la respuesta inmune. En fauna silvestre, debido a la dificultad de trabajar con especies no modelo, y la existencia de recursos limitados, los estudios genéticos de susceptibilidad a enfermedades se han centrado tradicionalmente en analizar la variación en genes candidatos que juegan un papel crítico en el proceso de infección, como el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC del inglés *Major Histocompatibility Complex*, Acevedo-Whitehouse y Cunningham 2006) y receptores tipo Toll (TLRs del inglés *Toll-like receptor*, Zhang et al. 2006). Estos estudios han sido fundamentales para comprender una parte de la interacción hospedador-patógeno y sus implicaciones ecológicas y evolutivas. Sin embargo, para entender completamente el fenotipo de la interacción es muy importante que tengamos una visión más detallada de los mecanismos moleculares que determinan la resistencia/susceptibilidad a patógenos. Igualmente, conocer con más detalle los mecanismos moleculares subyacentes en los procesos de infección nos permitirá entender las diferencias en virulencia entre distintos patógenos, o el papel que juegan los vectores en la transmisión. El desarrollo de nuevas técnicas genómicas y transcriptómicas ofrece una oportunidad sin precedentes para elucidar esos mecanismos moleculares (Fig. 2). Estas nuevas técnicas nos permiten identificar, detectar y clasificar patógenos de forma más adecuada reconstruyendo sus genomas y transcriptomas. La ventaja que tienen estas aproximaciones -ómicas es que aportan información a nivel de todo el genoma y permiten obtener conclusiones que trascienden los resultados basados en un número limitado de genes candidatos. Puesto que las inter-

acciones hospedador-patógeno incluyen interacciones entre muchos loci, las técnicas genómicas y transcriptómicas nos permiten estudiar en detalle las interacciones entre diferentes genes que determinan la respuesta inmune de los hospedadores. Además, podemos entender mejor las características moleculares que determinan el papel que juegan los organismos vectores a la hora de transmitir los patógenos, y entender como los patógenos se adaptan a las condiciones de hospedadores y vectores para poder infectarlos de forma exitosa.

Aunque el uso de técnicas genómicas y transcriptómicas es cada vez más habitual en fauna silvestre, su utilización se ha visto generalmente limitada por las dificultades que supone trabajar con especies no modelo, en algunos casos incluso especies amenazadas, que derivan en la falta de genomas de referencia. Por tanto, uno de los primeros pasos en muchas ocasiones debe ser bien construir genomas *de novo*, o utilizar librerías reducidas, o captura de secuencias específicas a lo largo del genoma. Este problema afecta tanto a hospedadores, como vectores y patógenos. Pero en el caso de patógenos no modelo es si cabe más difícil secuenciar el genoma debido a la escasez de material de patógeno. En el caso por ejemplo de especies de malaria aviar (*Plasmodium gallinaceum* y *Plasmodium relictum*) para secuenciar exitosamente el genoma se utilizaron diferentes técnicas para aumentar la cantidad de ADN del parásito (Bohme et al. 2018). En el caso del estudio de transcriptomas la situación es similar cuando se estudian especies no modelo. Sin el genoma de la especie modelo el estudio de la expresión de ARN se complica enormemente necesitando técnicas conocidas como análisis de transcriptomas *de novo* donde se ensamblan fragmentos de información molecular para generar un modelo molecular o transcriptoma que posteriormente será usado como guía para el estudio de la especie no modelo.

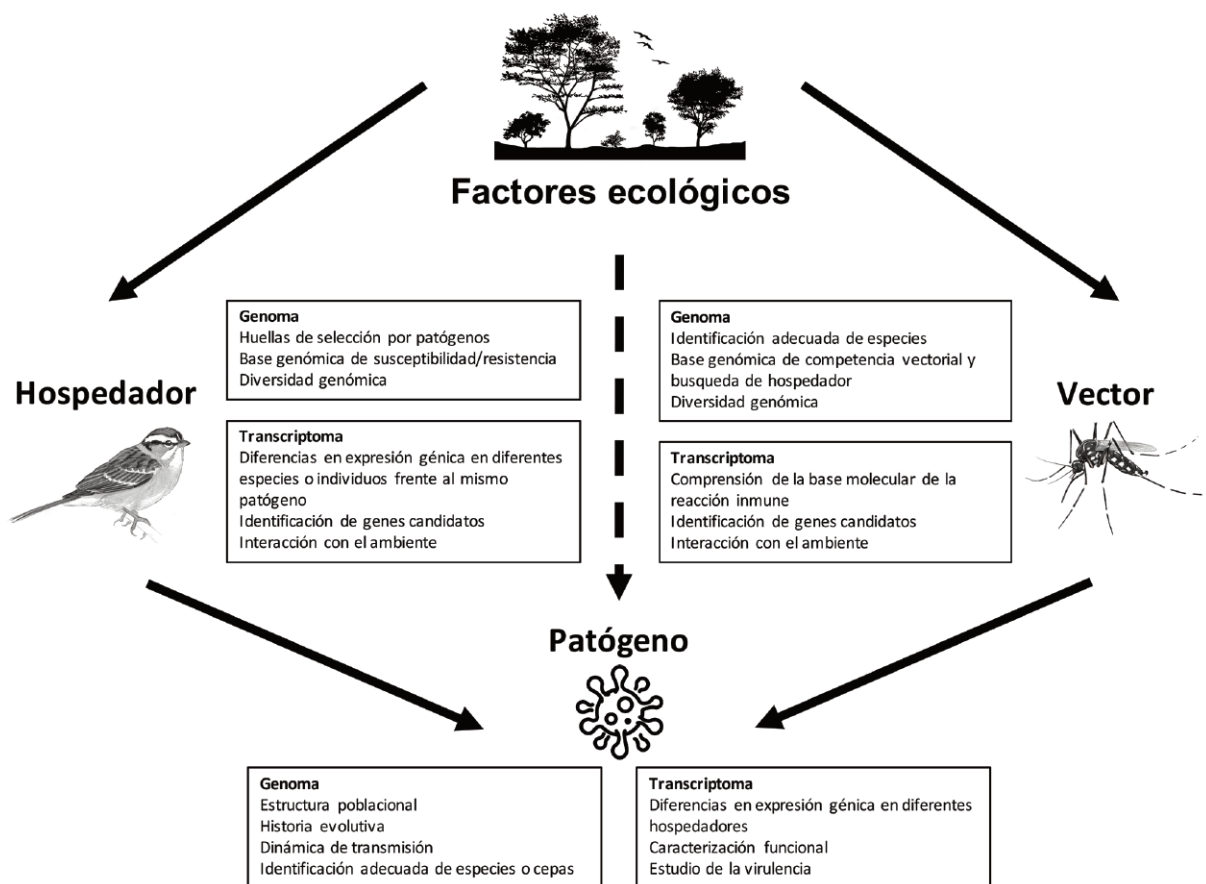


Figura 2. Esquema acerca de cómo las nuevas técnicas moleculares tanto de genómica como de transcriptómica pueden contribuir a profundizar en el conocimiento en la interacción hospedador-parásito, así como en su principal vector de transmisión.

Figure 2. Diagram about how the new molecular techniques of both genomics and transcriptomics can contribute to deepen the understanding of the host-parasite interaction as well as its main transmission vector.

Uno de los objetivos principales de los estudios genómicos que abordan el análisis de las interacciones hospedador-patógeno es entender la arquitectura genómica de la virulencia de los patógenos y la resistencia de los hospedadores (Greenwood et al. 2016). Por ejemplo, los estudios de asociación de genoma completo (GWAs del inglés *Genome Wide Association Studies*), permiten identificar la base genómica de la susceptibilidad y resistencia a enfermedades. Así por ejemplo el uso de GWAs ha permitido identificar qué genes contribuyen a aumentar las probabilidades de supervivencia de demonios de Tasmania infectados con tumores faciales de origen vírico (Wright et al. 2017; Margres et al. 2018), o a la probabilidad de que topillos rojos de distintas poblaciones estén infectados con la bacteria *Borrelia*, causante de la enfermedad de Lyme en humanos (Cornetti y Tschirren 2020). Este tipo de estudios también permiten identificar las huellas genómicas que deja la coevolución hospedador-patógeno. En un estudio reciente se analizó con GWAs la base genómica de la resistencia a mixomatosis en conejos (*Oryctolagus cuniculus*) usando muestras anteriores y posteriores a la pandemia de mixomatosis que diezmo sus poblaciones (Alves et al. 2019). Los resultados mostraron que había una selección paralela en genes del sistema inmune en la que se favorecían los mismos alelos en poblaciones de conejos de Australia, Francia y Reino Unido. La capacidad para reconstruir genomas completos, o gran parte del genoma, permite analizar en más detalle, no solo cuál es la diversidad genómica de la población de hospedadores, sino también de vectores y patógenos. Por ejemplo, la secuenciación del genoma de *Plasmodium falciparum* (Gardner et al. 2002), causante de más de 400 000 muertes al año (según datos de la Organización Mundial de la Salud) ha permitido el posterior análisis de la virulencia a niveles moleculares de este protozoo (Marti et al. 2004) o incluso determinar genes diana esenciales durante su dispersión en tejidos humanos (Zhang et al. 2018). Los análisis de transcriptomas también son importantes para entender la interacción patógeno-hospedador. El papel que juega un gen en el fenotipo de infección no viene solamente determinado por la variación genómica, también depende de otros factores, como la variación regulatoria y la interacción con el ambiente. El transcriptoma refleja tanto la contribución de la variación regulatoria como las características genómicas de los individuos y las presiones ambientales. El análisis de transcriptomas (expresión génica a nivel de todo el genoma) nos permite por tanto entender mejor la base genómica de la respuesta inmune y como interacciona con el ambiente. El uso de transcriptomas se ha usado principalmente para entender los mecanismos genéticos que determinan la susceptibilidad a contraer enfermedades infecciosas de los hospedadores. Por ejemplo, el análisis de transcriptomas ha permitido saber que la respuesta inmune de especies de murciélagos tolerantes y susceptibles al hongo que produce el síndrome de la nariz blanca es diferente (Davy et al. 2017). Además, el análisis de transcriptomas también ha permitido entender la respuesta de los vectores a la infección por los patógenos. Por ejemplo, el análisis de transcriptomas de mosquitos infectados con distintos flavivirus como el virus del dengue o el virus *West Nile* (o del Nilo Occidental; WNV) reveló que como consecuencia de la infección se expresan genes asociados a la respuesta inmune innata, metabólicos y de estrés (Xi et al. 2008) y que el RNA interferente (iRNA) juega un papel fundamental en la respuesta inmune (McFarlane et al. 2014). Otra ventaja de estas nuevas tecnologías es que para muchas infecciones podemos analizar simultáneamente el transcriptoma del hospedador y del patógeno, permitiendo conocer con detalle la interacción hospedador-patógeno (Westermann et al. 2012; Westerman et al. 2017).

En este artículo revisaremos como las técnicas de genómica y transcriptómica en aves han permitido avanzar el conocimiento de las interacciones hospedador-patógeno.

Desafíos de la genómica en aves paseriformes

Las aves han sido el centro de estudios pioneros de la biología evolutiva durante generaciones, en gran parte porque son abundantes y diversas (Kraus 2019). La genómica no se ha hecho es-

perar en las aves y tanto la cantidad como la calidad de proyectos internacionales centrados en secuenciar los genomas de las más de 10 000 especies vivas descritas hasta ahora (B10K project; The OpenWings Project) brinda innumerables oportunidades para estudios comparativos en contextos fenotípicos, adaptativos, ecológicos, conductuales y demográficos bien documentados, al tiempo que aclara las diferentes características de los procesos evolutivos en todo el genoma y entre especies de aves (Jarvis et al. 2014; Zhang et al. 2014). Así pues, hoy en día se dispone del 45% de los genomas pertenecientes a aves paseriformes y se estima que en los próximos años se dispondrá del genoma de un 60% de las especies de paseriformes (Fig. 3). La importancia de identificar y conocer el genoma de las aves radica no solo en determinar las relaciones filogenéticas entre todas ellas (Jost 2010; Stiller y Zhang 2019) si no en medir el impacto del cambio climático en la biodiversidad y aportar información muy valiosa sobre la conservación de especies y ecosistemas en peligro de extinción. Además, la disposición de genomas públicos y accesibles en bases de datos facilita enormemente el estudio y análisis de la expresión del ARN mensajero.

En aves silvestres los estudios de asociación a nivel genómico analizando la resistencia a enfermedades son todavía escasos. Esto se debe principalmente al tamaño de muestra que se necesita analizar y a la cantidad de información genómica que se necesita. Pero con el aumento de genomas disponibles es cada vez más fácil realizar estos estudios. Utilizando GWAs se han identificado,

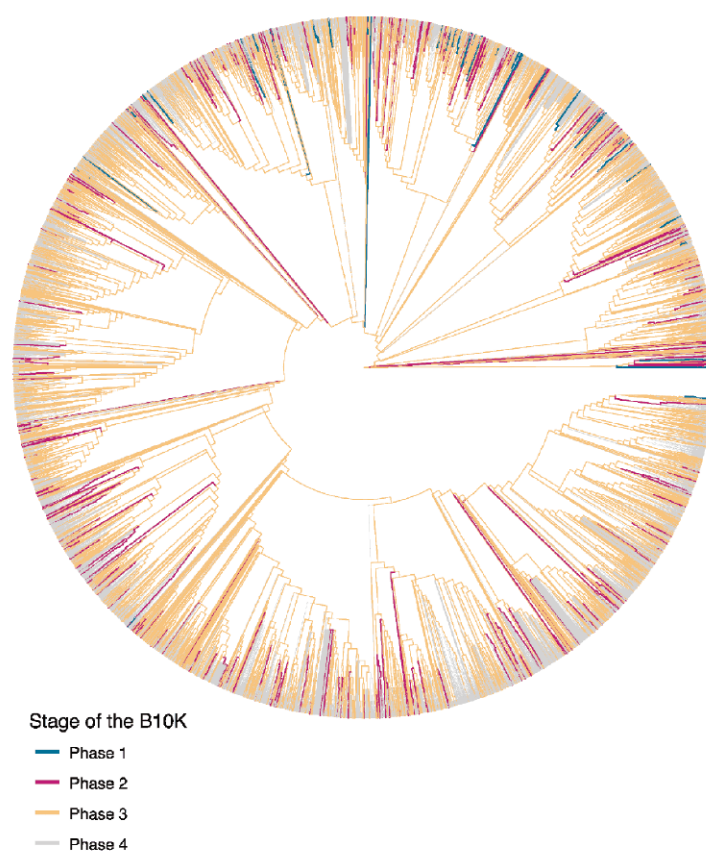


Figura 3. Genomas disponibles o en preparación de las 10 135 especies de aves hoy en día. Se muestran diferentes fases: fase 1, secuenciado al menos 48 especies de un mismo orden (ramas coloreadas de azul), fase 2 incluye 363 aves de la mayoría de las familias (rojo), fase 3 preparándose para ser secuenciada (amarillo) y genomas que están secuenciados pero incompletos (gris). Figura tomada de Stiller and Zhang (2019).

Figure 3. Genomes available or in preparation of the 10 135 species of birds nowadays. Different phases are shown: phase 1, sequenced at least 48 species of the same order (branches colored blue), phase 2 includes 363 birds from most families (red), phase 3 preparing to be sequenced (yellow) and genomes that are sequenced but incomplete (gray). Figure taken from Stiller and Zhang (2019).

por ejemplo, varios genes del sistema inmune y genes que regulan procesos fisiológicos que están asociados a la carga parasitaria de nemátodos gastrointestinales en grullas (Wenzel et al. 2015). Así mismo, este tipo de análisis también ha permitido identificar SNPs asociados a la susceptibilidad/resistencia de infección por malaria en bisbitas camineros de las islas canarias, aunque los SNPs identificados no eran consistentes entre islas (Armstrong et al. 2018).

Estudios transcriptómicos en aves durante la infección por patógenos

La malaria aviar

Los parásitos haemosporidios, dentro de los cuales se engloba el parásito de la malaria aviar, representan un sistema de hospedador-parásito bien estudiado. Estos parásitos son transmitidos por vectores dípteros y pueden causar una alta tasa tanto de morbilidad como de mortalidad en las poblaciones naturales, teniendo así un gran impacto en la historia vital de sus hospedadores (Valkiūnas 2005). Su ciclo de vida es complejo ya que necesita del hospedador invertebrado (vector) para llevar a cabo la fase sexual del ciclo y al hospedador vertebrado (ave) para llevar a cabo la fase asexual. Sin embargo, la razón por la que estos protozoos son tan prolíficos en la naturaleza se debe principalmente a su gran plasticidad la cual se ve reflejada en el número de especies o linajes detectados dentro de los haemosporidios. Así, hasta la fecha, se han detectado más de 4000 linajes de malaria aviar que pueden infectar más de 1500 especies de aves (Bensch et al. 2009). La plasticidad que cada una de estas especies posee les permite utilizar y disponer de los recursos de sus hospedadores a su disposición (Reece et al. 2010; Pollit et al. 2011) siendo capaces de responder a cambios fisiológicos e inmunológicos por parte del hospedador (Cornet et al. 2014). Por ello, el análisis y estudio de las expresiones genómicas de estos organismos es de vital importancia para comprender cómo se adaptan a nuevos individuos y/o diferentes especies de aves, así como para determinar los mecanismos moleculares que, tanto el hospedador como el parásito, utilizan durante su interacción.

Respuesta molecular del parásito de la malaria durante la infección

Desde un punto de vista molecular, el estudio de transcriptomas del parásito conlleva un trabajo extremadamente fino donde la distinción entre el material genómico del parásito y del hospedador se complica debido a varios factores. Primero, la cantidad de material genómico del parásito a analizar es mínimo comparado con el gran material genómico que se dispone del hospedador en una sola muestra debido al núcleo presente en los glóbulos rojos de las aves que incrementa la concentración de dicho material. Segundo, la parasitemia (proporción de glóbulos rojos infectados por malaria aviar) es normalmente baja en infecciones crónicas, variando normalmente entre 0.0001 y 0.1% de los glóbulos rojos infectados (Zehntindjiev et al. 2008; Asghar et al. 2011; Ishtiaq et al. 2017) por lo que el total disponible, en condiciones naturales, es bajo. Tercero, la cantidad de sangre que normalmente se toma del ave es muy pequeña, por lo que la totalidad de material secuenciado es considerablemente menor que en estudios realizados en otros órdenes de animales. Por último, las secuencias genómicas de los parásitos haemosporidios tienen, en general, un alto contenido AT que además en las especies de malaria aviar es más alto que en las especies de malaria de mamíferos (Videvall 2018). Esta característica composición complica en gran medida la secuenciación de especies de malaria aviar debido a la alta homogeneidad entre los nucleótidos (Aird et al. 2011; Kozarewa et al. 2009; Ross et al. 2013), así como el ensamblaje del genoma (Gadner et al. 2002).

Por su parte, los problemas encontrados para secuenciar ADN de malaria aviar han sido mostrados recientemente por Lutz et al. (2016) quienes intentaron secuenciar el genoma de uno de los parásitos de malaria aviar más comunes: *P. relictum* (linaje genético SGS1). A pesar de usar una gran variedad de técnicas obtuvieron tan solo un 0.07% del material genómico del parásito en cuestión,

mientras que el 99.93% restante pertenecía a material genómico del ave y otras contaminaciones. Sin embargo, los investigadores han demostrado que no es imposible trabajar con secuencias de malaria aviar. Así pues, se han logrado llevar a cabo estudios genómicos centrados tanto en la secuenciación de ADN (Bensch et al. 2016; Böhme et al. 2018) como de ARN de varias especies de malaria aviar (Videvall et al. 2017; Weinberg et al. 2018). Mediante el conocimiento de la biología del parásito en combinación con las innovaciones en secuenciación y los protocolos bioinformáticos se han hecho grandes avances en este campo. Por ejemplo, gracias a la realización de infecciones experimentales se ha podido incrementar la disposición de material genómico del parásito y ayudar a una mejor secuenciación transcriptómica (Videvall et al. 2017; Weinberg et al. 2018) así como un enriquecimiento mediante oquistes para una visión más clara cuando se secuencian el ADN (Böhme et al. 2018). Además, uno de los protocolos que se llevan a cabo para solucionar los problemas concernientes al alto contenido AT en las especies de *Plasmodium* en mamíferos son los llamados PCR-free RNA-seq (Doizhenko et al. 2017). Gracias a avances como estos el estudio y análisis de genomas y transcriptomas se enriquece día a día y abren nuevos caminos de investigación.

Los parásitos tienen como único objetivo su dispersión dentro del organismo infectado ya que es esencial para la supervivencia del mismo (Homolka et al. 2010). En el caso de la malaria, el parásito activa sus mecanismos de producción de enzimas para, entre otras cosas, penetrar dentro de determinados tejidos del hospedador como glóbulos rojos o hepatocitos, así como para replicarse de forma asexual dentro de su hospedador vertebrado. Para todo ello, el parásito activa una serie de cascadas bioquímicas específicas que han sido, en varias ocasiones, detectadas en estudios experimentales. En este sentido, Videvall et al. (2017) analizaron el transcriptoma del parásito (*Plasmodium ashfordi*) durante la infección a una única especie de ave (*Spinus spinus*), por medio del ensamblaje *de novo* con el objetivo de determinar cómo se comporta el parásito en diferentes individuos hospedadores aviarios. Videvall et al. (2017) demostraron que el parásito puede modificar su expresión dependiendo del individuo al que infecte. Según Videvall et al. (2017) el parásito de la malaria activa diferentes mecanismos de evasión inmune, es decir, estrategias para eludir el sistema inmune del individuo hospedador al que infecta, las cuales son diferentes dependiendo del individuo al que infecte, mostrando una alta capacidad de adaptación y plasticidad. Más recientemente García-Longoria et al. (2020) analizaron el transcriptoma del parásito de malaria aviar *Plasmodium homocircumflexum* en dos especies de aves: el estornino común (*Sturnus vulgaris*) y el piquituerto (*Loxia curvirostra*). Estos autores demostraron que el mismo parásito (*P. homocircumflexum*) activa diferentes niveles de expresión dependiendo de la especie aviar infectada mostrando, en este caso, niveles más altos de expresión (alto número de genes activados en el parásito) en los piquituertos que en los estorninos comunes (bajo número de genes activados en el parásito). Además, determinaron que *P. homocircumflexum* sigue diferentes caminos moleculares y bioquímicos para asegurar su supervivencia dependiendo de la especie de ave infectada, dejando patente una vez más la plasticidad de algunos patógenos intracelulares para adaptar su expresión según las circunstancias.

Respuesta molecular del ave durante a la infección por malaria aviar

La posibilidad de monitorizar a lo largo del tiempo el transcriptoma de individuos infectados experimentalmente con malaria aviar ha proporcionado una valiosa información acerca de cómo el hospedador y el parásito de la malaria interactúan (Videvall et al. 2015; 2020). Así pues, se ha podido determinar que, por ejemplo, en el jilguero lúgano (*Spinus spinus*) aquellos individuos infectados mostraron una expresión diferente a los no infectados donde el parásito de la malaria aviar parece provocar la activación de genes relacionados con procesos inmunológicos, respuesta frente al estrés, cambios en el metabolismo o muerte celular (Videvall et al. 2015). Más recientemente, Videvall et al. (2020) ha

mostrado que la misma especie de ave (*Spinus spinus*) infectada por dos linajes (SGS1 y GRW4) comunes de *Plasmodium relictum* provocaron no solo diferentes niveles de parasitemia (proporción de glóbulos rojos infectados) si no que ambos linajes de malaria aviar generaban diferentes respuestas en el hospedador mediante altos (SGS1) y bajos niveles de virulencia (GRW4) (Videvall et al. 2020). Sin embargo, más allá de estudios similares a los citados, hasta la fecha, no hay mucha información sobre cómo diferentes individuos o especies de aves activan o desactivan mecanismos moleculares frente a parásitos sanguíneos como el parásito de la malaria aviar. Nos encontramos pues, en un momento decisivo donde estudios centrados en profundizar en dichos mecanismos son esenciales para un mejor entendimiento de cómo reaccionan estos organismos (hospedadores) a los cientos de especies de parásitos de malaria aviar que hoy en día circulan en la naturaleza (Bensch et al. 2009).

El virus del Nilo Occidental

El virus del Nilo occidental (WNV) es un arbovirus (virus transmitido por artrópodos) de la familia Flaviviridae. Este virus tiene distribución mundial, habiéndose extendido por prácticamente todo el mundo desde su descubrimiento en 1937. El WNV es el flavivirus transmitido por mosquitos más ampliamente distribuido del mundo (Weissenböck et al. 2010) y el agente viral de encefalitis en humanos más importante (Chancey et al. 2015). El principal hospedador del WNV son las aves. El virus se mantiene en la naturaleza en un ciclo enzootico en el que mosquitos ornitófilos actúan como vectores que transmiten el virus entre aves (Pérez-Ramírez et al. 2014). Ocasionalmente el virus se transmite a través de los mosquitos vectores a otros animales como, por ejemplo, humanos y caballos donde en algunos casos puede causar encefalitis y llegar a ser mortal. Uno de los mayores retos para estudiar el WNV es que este virus tiene una ecología y epidemiología muy complejas. Puede afectar a numerosas especies de vertebrados y usar múltiples especies de mosquito como vectores y se estima que puede infectar a más de 300 especies de aves sólo en Norte América (Kilpatrick et al. 2006). Sin embargo, hay un amplio rango de variación en la susceptibilidad a WNV tanto dentro de una especie como entre especies. Por ejemplo, especies como los cuervos, o las urracas de pico amarillo son muy susceptibles y sus poblaciones han disminuido como consecuencia de la mortalidad causada por el WNV (Kilpatrick y Wheeler 2019). Sin embargo, otras especies como las tortolas y otras columbiformes a penas se ven afectadas (Pérez-Ramírez et al. 2014). Esto hace que el papel que juega cada especie en la transmisión del virus, la amplificación, y los brotes epidémicos varíe substancialmente (Kilpatrick et al. 2006). Para entender mejor el ciclo epidemiológico y ecológico es por tanto fundamental entender los mecanismos y factores que determinan la variación en la susceptibilidad a contraer WNV entre especies e individuos de la misma especie.

Estudios genómicos del virus del Nilo Occidental

El WNV es un virus RNA con una capacidad de adaptación extraordinaria y es muy variable geográfica y genómicamente. Se estima que la diferencia entre sus genomas de diferentes cepas puede ser de más del 25% (Chancey et al. 2015). Como resultado muchas cepas de WNV han evolucionado de forma independiente en diferentes partes del mundo y se han adaptado a los ciclos de transmisión locales mientras circulan y se extienden en diferentes regiones (Pérez Ramírez et al. 2014). Estos cambios micro-evolutivos pueden generar nuevos genotipos que estén potencialmente asociados a cambios fenotípicos en el virus que afectan la virulencia, transmisibilidad y patogenicidad tanto en el vector como el hospedador (Brault et al. 2011). Por ejemplo, las cepas norte americanas son más patógenas y tienen mayor mortalidad que las europeas. Las técnicas genómicas pueden ayudar a entender estas diferencias en virulencia. Además, el análisis de genomas víricos completos nos ha permitido entender la evolución de las distintas cepas (Hadfield et al. 2019).

Respuesta molecular del ave durante a la infección

Puesto que el WNV afecta a humanos, hay varios estudios que han analizado en mamíferos los patrones de expresión génica tras la infección (Kumar et al. 2016; Uddin et al. 2015). Sin embargo, a pesar de que las aves son el reservorio del virus y las que determinan el ciclo epidemiológico, el número de estudios de la respuesta de las aves al virus usando técnicas genómicas es todavía limitado. En general, el estudio del efecto del virus sobre las aves se ha centrado en conocer los niveles de viremia en las distintas especies para determinar competencia y en establecer si se producían anticuerpos o no (Pérez-Ramírez et al. 2014). Sin embargo, no entendemos muy bien lo que sucede a nivel molecular. En un estudio realizado en pinzones cebrá (*Taeniopygia guttata*), se encontró que la respuesta inmune se parecía en algunos aspectos a la respuesta de mamíferos activándose rutas tanto del sistema inmune adaptativo como innato (NewHouse et al. 2017). Por ejemplo, se encontró que igual que en mamíferos se expresaban varios genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo II (MHCII). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en mamíferos no había diferencias de expresión en el MHC I. También se encontraron diferencias en la expresión de varias interleukinas e interferones, que dan una idea de las diferencias que existen en la respuesta inmune entre aves y mamíferos y de la necesidad de caracterizar mejor esas diferencias analizando más especies. Por otra parte, un estudio reciente en gorriones comunes (*Passer domesticus*) analizó el efecto de la contaminación lumínica sobre la susceptibilidad a WNV (Kernbach et al. 2019). Los resultados mostraron que los individuos expuestos a luz artificial por la noche eran infecciosos durante más tiempo, pero no aumentaba la mortalidad, prolongando por tanto el tiempo durante el cual podían transmitir la enfermedad. El análisis de transcriptomas permitió conocer los mecanismos moleculares y la influencia del medio ambiente sobre la expresión génica. Los animales expuestos a luz artificial fueron menos capaces de tolerar la infección por WNV ya que se modificó la expresión de genes clave para montar una respuesta inmune adecuada, provocando una respuesta inmune desregulada. Este estudio es un claro ejemplo de cómo el análisis de transcriptomas nos permite estudiar la relación de las condiciones ambientales sobre la interacción patógeno-hospedador. Aunque estos estudios han avanzado nuestro conocimiento sobre la respuesta de las aves al WNV, faltan estudios que comparen los transcriptomas en diferentes especies de aves que tengan diferente susceptibilidad al virus. Realizar estudios comparativos es importante porque diferentes especies de aves muestran gran variedad en su susceptibilidad al WNV y esto afecta directamente a su capacidad para transmitirlo (Kilpatrick et al. 2006). Además, también se necesitan desarrollar experimentos en los que se analicen los transcriptomas de individuos infectados por diferentes cepas y donde se compare cómo los hospedadores reaccionan. Esto ayudaría a entender e identificar los genes y rutas moleculares que explican las diferencias en la respuesta inmune a diferentes cepas. Conocer las diferencias en la respuesta inmune entre especies y frente a diferentes cepas es fundamental para comprender mejor la ecología y epidemiología del WNV.

Futuros desafíos

Para una mejora en el entendimiento de la interacción del hospedador con el patógeno es imperativo que se continúe secuenciando genomas y transcriptomas en un amplio rango de organismos, tanto de aves como de virus y protozoos. Además, el uso de nuevas técnicas -ómicas nos permitirá explorar nuevas cuestiones relativas a la interacción hospedador-patógeno. Por ejemplo, el uso de técnicas transcriptómicas a nivel celular (single-cell RNA-seq) puede aportar información de la variación transcriptómica y fenotípica a nivel de parásito único, lo que permitirá entender mejor la dinámica poblacional de patógenos unicelulares como la malaria aviar, y entender mejor su virulencia. Estas herramientas han sido ya usadas con éxito en el estudio de algunas especies de *Plasmodium* (Howick et al. 2019; Walzer et al. 2019), y podrían en un futuro implementarse para el estudio de la malaria aviar. Otro ejemplo interesante es el estudio de la

epigenómica (regulación de la expresión del ADN sin modificar la secuencia de este) que hasta ahora se ha utilizado en especies de malaria en humanos (Gómez-Díaz et al. 2017) pero no en malaria aviar. La aplicación de esta herramienta permitiría un mejor entendimiento de la plasticidad fenotípica adaptativa que las cientos de especies de malaria aviar pueden llevar a cabo durante su ciclo vital. Por último, el desarrollo de técnicas metagenómicas que permiten caracterizar el microbioma nos permitirán no sólo identificar nuevos virus, bacterias y hongos que podrían ser potencialmente patógenos, sino entender como el microbioma de vectores y hospedadores vertebrados afecta a su susceptibilidad frente a diferentes patógenos. Por ejemplo, el estudio del microbioma en mosquitos ha revelado que el microbioma del intestino de mosquitos modula la capacidad de varias especies de mosquito para transmitir arbovirus como el WNV (Hedge et al. 2015). En conjunto, estas nuevas tecnologías acompañadas de nuevos protocolos bioinformáticos permitirán no solo entender mejor la biología de los organismos sino una identificación más adecuada y contribuirán a mejorar nuestro entendimiento de las relaciones hospedador-patógeno.

Agradecimientos

Este artículo ha sido financiado por la Junta de Extremadura (PO17024 para LGL beca postdoctoral) y el programa H2020-MSCA-IF (H2020-MSCA-IF-2017-795537-TransWNV para MJRL).

Referencias

- Abbate, J.L., Kada, S., Lion, S. 2015. Beyond mortality: sterility as a neglected component of parasite virulence. *PLoS Pathogens* 3(11):12.
- Acevedo-Whitehouse, K., Cunningham, A.A. 2006. Is MHC enough for understanding wildlife immunogenetics?. *Trends in Ecology and Evolution* 21(8):433-438.
- Aird, D., Chen, W.S., Ross, M., Connolly, K., Meldrim, J., Russ, C., et al. 2010. Analyzing and minimizing bias in Illumina sequencing libraries. *Genome Biology* 11(S1):P3.
- Alves, J.M., Carneiro, M., Cheng, J.Y., de Matos, A.L., Rahman, M.M., Loog, L., Campos, P.F., Wales, N., Eriksson, A., Manica, A., Strive, T. 2019. Parallel adaptation of rabbit populations to myxoma virus. *Science* 363(6433):1319-26.
- Armstrong, C., Richardson, D.S., Hipperson, H., Horsburgh, G.J., Küpper, C., Percival-Alwyn, L., Clark, M., Burke, T., Spurgin, L.G. 2018. Genomic associations with bill length and disease reveal drift and selection across island bird populations. *Evolution Letters* 2(1):22-36.
- Asghar, M., Hasselquist, D., Bensch, S. 2011. Are chronic avian haemosporean infections costly in wild birds? *Journal of Avian Biology* 42:530-537.
- B10K Project: *The Bird 10 000 Genomes (B10K) Project* [online]. Disponible en: <https://b10k.genomics.cn/> (consultado el 21 de marzo de 2020).
- Bensch, S., Hellgren, O., Pérez-Tris, J. 2009. MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporeans in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. *Molecular Ecology Resources* 9:1353-1358.
- Bensch, S., Canbäck, B., DeBarry, J.D., Johansson, T., Hellgren, O., Kissinger, J.C., Palinauskas, V., et al. 2016. The genome of *Haemoproteus tartakovskyi* and its relationship to human malaria parasites. *Genome Biology and Evolution* 8:1361-73.
- Böhme, U., Otto, T.D., Cotton, J.A., Steinbiss, S., Sanders, M., Oyola, S.O., Nicot, A., et al. 2018. Complete avian malaria parasite genomes reveal features associated with lineage-specific evolution in birds and mammals. *Genome Resources* 28:1-14.
- Brault, A.C., Langevin, S.A., Ramey, W.N., Fang, Y., Beasley, D.W., Barker, C.M., Sanders, T.A., et al. 2011. Reduced avian virulence and viremia of West Nile virus isolates from Mexico and Texas. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 85(4):758-67.
- Chancey, C., Grinev, A., Volkova, E., Rios, M. 2015. The global ecology and epidemiology of West Nile virus. *BioMed Research International* 2015:376230.
- Comet, S., Nicot, A., Rivero, A., Gandon, S. 2014. Evolution of plastic transmission strategies in avian malaria. *PLoS Pathogens* 10(9):e1004308.
- Cornetti, L., Tschirren, B. 2020. Combining genome-wide association study and FST-based approaches to identify targets of *Borrelia*-mediated selection in natural rodent hosts. *Molecular Ecology* 29(7):1386-1397.
- Davy, C.M., Donaldson, M.E., Willis, C.K., Saville, B.J., McGuire, L.P., Mayberry, H., Wilcox, A., et al. 2017. The other white-nose syndrome transcriptome: Tolerant and susceptible hosts respond differently to the pathogen *Pseudogymnoascus destructans*. *Ecology and Evolution* 7(18):7161-7710.
- Demas, G.E., Nelson, R.J. 2012. *Ecoimmunology*. Oxford University Press, Oxford, Reino Unido.
- Dolzhenko, E., van Vugt, J.J.F.A., Shaw, R.J., Bekritsky, M.A., van Blitterswijk, M., Narzisi, G., et al. 2017. Detection of long repeat expansions from PCR-free whole-genome sequence data. *Genome Resources* 27:1895-1903.
- Fumagalli, M., Sironi, M., Pozzoli, U., Ferrer-Admetlla, A., Pattini, L., Nielsen, R. 2011. Signatures of environmental genetic adaptation pinpoint pathogens as the main selective pressure through human evolution. *PLoS genetics* 7(11):e1002355.
- García-Longoria, L., Palinauskas, V., Ilgūnas, M., Valkiūnas, G., Hellgren, O. 2020. Differential gene expression of *Plasmodium homocircumflexum* (lineage pCOLL4) across two experimentally infected passerine bird species. *Genomics* 112(4):2857-2865.
- Gardner, M.J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R.W., Carlton, J.M., et al. 2002. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 419: 498-511.
- Gómez-Díaz, E., Yerbanga, R.S., Lefèvre, T., Cohuet, A., Rowley, J., Ouedraogo, J.B., et al. 2017. Epigenetic regulation of *Plasmodium falciparum* clonally variant gene expression during development in *Anopheles gambiae*. *Scientific Reports* 7:40655.
- Greenwood, J.M., Ezquerra, A.L., Behrens, S., Branca, A., Mallet, L. 2016. Current analysis of host-parasite interactions with a focus on next generation sequencing data. *Zoology* 119(4): 298-306.
- Hadfield, J., Brito, A.F., Swetnam, D.M., Vogels, C.B., Tokarz, R.E., Andersen, K.G., Smith, R.C., et al. 2019. Twenty years of West Nile virus spread and evolution in the Americas visualized by Nextstrain. *PLoS Pathogens* 15(10):e1008042.
- Hegde, S., Rasgon, J.L., Hughes, G.L. 2015. The microbiome modulates arbovirus transmission in mosquitoes. *Current Opinion in Virology* 15:97-102.
- Homolka, S., Niemann, S., Russell, D.G., Rohde, K.H. 2010. Functional genetic diversity among *Mycobacterium tuberculosis* complex clinical isolates: Delineation of conserved core and lineage-specific transcriptomes during intracellular survival. *PLoS Pathogens* 6(1):17.
- Howick, V.M., Russell, A.J., Andrews, T., Heaton, H., Reid, A.J., Natarajan, K., Butungi, H., et al. 2019. The malaria cell atlas: Single parasite transcriptomes across the complete *Plasmodium* life cycle. *Science* 365(6455):eaaw2619.
- Ishtiaq, F., Rao, M., Huang, X., Bensch, S. 2017. Estimating prevalence of avian haemosporeans in natural populations: A comparative study on screening protocols. *Parasites and Vectors* 10:127.
- Jarvis, E.D., Mirarab, S., Aberer, A.J., Houde, P., Li, C., Ho S.Y., W., Faircloth, B.C., et al. 2014. Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds. *Science* 346:1320-1331.
- Jost, L. 2010. The relation between evenness and diversity. *Diversity* 2:207-232.
- Kelehear, C., Spratt, D.M., Dubey, S., Brown, G.P., Shine, R. 2011. Using combined morphological, allometric and molecular approaches to identify species of the genus *Raillietiella* (Pentastomida). *PLoS One* 6(9):e24936.
- Kernbach, M.E., Newhouse, D.J., Miller, J.M., Hall, R.J., Gibbons, J., Oberstaller, J., Seletzchnik, D., et al. 2019. Light pollution increases West Nile virus competence of a ubiquitous passerine reservoir species. *Proceedings Royal Society* 24:286(1907):20191051.
- Kilpatrick, A.M., Wheeler, S.S. 2019. Impact of West Nile virus on bird populations: limited lasting effects, evidence for recovery, and gaps in our understanding of impacts on ecosystems. *Journal of medical entomology* 56(6):1491-7.
- Kilpatrick, A.M., Daszak, P., Jones, M.J., Marra, P.P., Kramer, L.D. 2006. Host heterogeneity dominates West Nile virus transmission. *Proceedings Biological Sciences* 273 (1599): 2327-2333.
- Kozarewa, I., Ning, Z., Quail, M., Sanders, M. 2009. Amplification-free Illumina sequencing-library preparation facilitates improved mapping and assembly of (G+C)-biased genomes. *Nature Methods* 6:291-295.
- Kraus, R.H.S. 2019. An Introduction to "Avian Genomics in Ecology and Evolution: From the Lab into the Wild." En: Kraus, R.H.S (ed.), *Avian Genomics in Ecology and Evolution*, pp 1-6. Springer Nature Switzerland AG. Basilea, Suiza.

- Kumar, M., Belcaid, M., Nerurkar, V.R. 2016. Identification of host genes leading to West Nile virus encephalitis in mice brain using RNA-seq analysis. *Scientific reports* 23;6:26350.
- LaPointe, D.A., Goff, M.L., Atkinson, C.T. 2010. Thermal Constraints to the Sporogonic Development and Altitudinal Distribution of Avian Malaria *Plasmodium relictum* in Hawai'i. *Journal of Parasitology* 96:318-324.
- Lutz, H.L., Marra, N.J., Grewe, F., Carlson, J.S., Palinauskas, V., Valkiūnas, G., Stanhope, M.J., et al. 2016. Laser capture microdissection microscopy and genome sequencing of the avian malaria parasite, *Plasmodium relictum*. *Parasitology Research* 115:4503-4510
- Margres, M.J., Jones, M.E., Epstein, B., Kerlin, D.H., Comte, S., Fox, S., Fraik, A.K., et al. 2018. Large-effect loci affect survival in Tasmanian devils (*Sarcophilus harrisii*) infected with a transmissible cancer. *Molecular ecology* 21:4189-99.
- Marti, M., Good, R.T., Rug, M., Knuepfer, E., Cowman, A.F. 2004. Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science* 306:1930-1933.
- Martínez-de la Puente, J., Merino, S., Tomás, G., Moreno, J., Morales, J., Lobato, E., García-Fraile, S., Belda, E.J., et al. 2010. The blood parasite *Haemoproteus* reduces survival in a wild bird: a medication experiment. *Biology Letters* 6:663-665.
- Marzal, A., de Lope, F., Navarro, C., Møller, A.P. 2005. Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. *Oecologia* 142:541-5.
- McFarlane, M., Arias-Goeta, C., Martin, E., O'Hara, Z., Lulla, A., Mousson, L., Rainey, S.M., et al. 2014. Characterization of *Aedes aegypti* innate-immune pathways that limit Chikungunya virus replication. *PLoS neglected tropical diseases* 8(7):e0002994.
- Merino, S., Moreno, J., Jose, J., Arriero, E. 2000. Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). *Royal Society* 9:2507-2510.
- Muhlfeld, C.C., Kovach, R.P., Jones, L.A., Al-Chokhachy, R., Boyer, M.C., Leary, R.F., Lowe, W.H., et al. 2014. Invasive hybridization in a threatened species is accelerated by climate change. *Nature Climate Change* 4:620-624.
- Neiderud, C.J. 2015. How urbanization affects the epidemiology of emerging infectious diseases. *Infection Ecology and Epidemiology* 5:27060.
- Newhouse, D.J., Hofmeister, E.K., Balakrishnan, C.N. 2017. Transcriptional response to West Nile virus infection in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *Royal Society open science* 4(6):170296.
- Olson, S.H., Gangnon, R., Silveira, G.A., Patz, J.A. 2010. Deforestation and malaria in Mancio Lima county, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 16:1108-1115.
- Palinauskas, V., Valkiūnas, G., Bolshakov, C.V., Bensch, S. 2008. *Plasmodium relictum* (lineage P-SGS1): effects on experimentally infected passerine birds. *Experimental Parasitology* 120:372-380.
- Pérez-Ramírez, E., Llorente, F., Jiménez-Clavero, M.A. 2014. Experimental infections of wild birds with West Nile virus. *Viruses* 6.2:752-781.
- Pollitt, L.C., Mideo, N., Drew, D.R., Schneider, P., Colegrave, N., Reece, S.E. 2011. Competition and the evolution of reproductive restraint in malaria parasites. *American Naturalist* 177(3):358-67.
- Poulin, R. 2011. *Evolutionary Ecology of Parasites*. Princeton University Press, Princeton, NJ, Estados Unidos.
- Reece, S.E., Ali, E., Schneider, P., Babike, H.A. 2010. Stress, drugs and the evolution of reproductive restraint in malaria parasites. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 277(1697):3123-9.
- Roelke-Parker, M.E., Munson, L., Packer, C., Kock, R., Cleaveland, S., Carpenter, M., et al. 1996. A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). *Nature* 379:441-445.
- Ross, M.G., Russ, C., Costello, M., Holliger, A., Jennon, N.J., Hegarty, R., et al. 2013. Characterizing and measuring bias in sequence data. *Genome Biology* 14(5): R51.
- Schmid-Hempel, P. 2011. *Evolutionary parasitology: The integrated study of infections, immunology, ecology and genetics*. Oxford Scholarship Online - Oxford University Press, Oxford, Reino Unido.
- Schneider, D.S. 2011. Tracing personalized health curves during infections. *PLoS Biology* 9(9):e1001158.
- Sehgal, R.N.M. 2010. Deforestation and avian infectious diseases. *Journal of Experimental Biology* 213:955-960.
- Shultz, A.J., Sackton, T.B. 2019. Immune genes are hotspots of shared positive selection across birds and mammals. *Elife* 8:e41815.
- Stiller, J., Zhang, G. 2019. Comparative phylogenomics, a stepping stone for bird biodiversity studies. *Diversity* 11:115-119.
- The OpenWings Project. [online] Disponible en: <https://www.openwings.org/> (consultado el 21 de marzo de 2020).
- Turner, G., Reeder, D., Coleman, J. 2011. A Five-year Assessment of Mortality and Geographic Spread of White-Nose Syndrome in North American Bats, with a Look at the Future. Update of White-Nose Syndrome in Bats. *Bat Research News* 52:13-27.
- Uddin, M.J., Suen, W.W., Prow, N.A., Hall, R.A., Bielefeldt-Ohmann, H. 2015. West Nile virus challenge alters the transcription profiles of innate immune genes in rabbit peripheral blood mononuclear cells. *Frontiers in veterinary science* 14(2):76.
- Valkiūnas, G. 2005. *Avian malaria parasites and other Haemosporidia*. CRC Press, Boca Raton, FL, Estados Unidos.
- Videvall, E. 2018. Plasmodium parasites of birds have the most AT-rich genes of eukaryotes. *Microbial Genomics* 4(2):e000150.
- Videvall, E., Cornwallis, C.K., Palinauskas, V., Valkiūnas, G., Hellgren, O. 2015. The avian transcriptome response to malaria infection. *Molecular Biology and Evolution* 32:1255-1267.
- Videvall, E., Cornwallis, C.K., Ahrén, D., Palinauskas, V., Valkiūnas, G., Hellgren, O. 2017. The transcriptome of the avian malaria parasite *Plasmodium ashfordi* displays host-specific gene expression. *Molecular Ecology* 6(11):2939-2958.
- Videvall, E., Palinauskas, V., Valkiūnas, G., Hellgren, O. 2020. Host transcriptional responses to high-and low-virulent avian malaria parasites. *American Naturalist* 0 0:0, 000-000, doi: 10.1086/708530.
- Vittor, A.Y., Gilman, R.H., Gilman, R.H., Tielsch, J., Glass, G., Shields, T., Lozano, W.S., Pinedo-Cancino, V., et al. 2009. The effect of deforestation on the human-biting rate of *Anopheles darlingi*, the primary vector of *Falciparum* malaria in the Peruvian Amazon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 81:5-12.
- Walzer, K.A., Fradin, H., Emerson, L.Y., Corcoran, D.L., Chi, J.T. 2019. Latent transcriptional variations of individual *Plasmodium falciparum* uncovered by single-cell RNA-seq and fluorescence imaging. *PLoS Genetics* 15(12):e1008506.
- Warner, R.E. 1968. The role of introduced diseases in the extinction of the endemic Hawaiian avifauna. *The Condor* 70: 101-120
- Weinberg, J., Toscani, J., Ilgūnas, M., Bukauskaitė, D., Iezhova, T., Valkiūnas, G., Sehgal, R.N.M. 2018. Genomics De novo transcriptome assembly and preliminary analyses of two avian malaria parasites, *Plasmodium delichoni* and *Plasmodium homocircumflexum*. *Genomics* 1-9.
- Weissenböck, H., Hubálek, Z., Bakony, T., Nowotny, N. 2010. Zoonotic mosquito-borne flaviviruses: worldwide presence of agents with proven pathogenicity and potential candidates of future emerging diseases. *Veterinary microbiology* 140(3-4):271-80.
- Wenzel, M.A., James, M.C., Douglas, A., Piertney, S.B. 2015. Genome-wide association and genome partitioning reveal novel genomic regions underlying variation in gastrointestinal nematode burden in a wild bird. *Molecular Ecology* 24(16):4175-92.
- Westermann, A.J., Gorski, S.A., Vogel, J. 2012. Dual RNA-seq of pathogen and host. *Nature Reviews Microbiology* 10(9):618-30.
- Westermann, A.J., Barquist, L., Vogel, J. 2017. Resolving host-pathogen interactions by dual RNA-seq. *PLoS pathogens* 13(2):e006033.
- Wright, B., Willet, C.E., Hamede, R., Jones, M., Belov, K., Wade, C.M. 2017. Variants in the host genome may inhibit tumour growth in devil facial tumours: evidence from genome-wide association. *Scientific reports* 7(1):1-6.
- Xi, Z., Ramirez, J.L., Dimopoulos, G. 2008. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS pathogens* 4(7):e1000098.
- Zhang, Z., Bashiruddin, J.B., Doel, C., Horsington, J., Durand, S., Alexandersen, S. 2006. Cytokine and Toll-like receptor mRNAs in the nasal-associated lymphoid tissues of cattle during foot-and-mouth disease virus infection. *Journal of Comparative Pathology* 134(1):56-62.
- Zhang, G., Li, C., Li, Q., Li, B., Larkin, D.M., Lee, C., et al. 2014. Comparative genomics reveals insights into avian genome evolution and adaptation. *Science* 346:1311-1320.
- Zhang, M., Wang, C., Otto, T.D., Oberstaller, J., Liao, X., Adapa, S.R., Udenze, K., et al. 2018. Uncovering the essential genes of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by saturation mutagenesis. *Science* 306:7847.
- Zehntindjiev, P., Ilieva, M., Westerdahl, H., Hansson, B., Valkiūnas, 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* 119:99-110.