



Evaluación ecofisiológica de las infecciones por hemosporidios sanguíneos en aves

J. Muriel^{1,*}

(1) Instituto Pirenaico de Ecología (IPE-CSIC), Avda. Nuestra Señora de la Victoria 16, 22700; Jaca, España.

* Autor de correspondencia: J. Muriel [Jaime.muriel.redondo@gmail.com]

> Recibido el 22 de abril de 2020 - Aceptado el 14 de julio de 2020

Muriel, J. 2020. Evaluación ecofisiológica de las infecciones por hemosporidios sanguíneos en aves. *Ecosistemas* 29(2):1979. <https://doi.org/10.7818/ECOS.1979>

El parasitismo es una de las principales fuerzas selectivas en la evolución de las especies, ya que tendría consecuencias directas sobre la supervivencia y reproducción del hospedador. Sin embargo, el resultado global de las interacciones entre parásitos y hospedadores puede medirse a través de la resistencia o tolerancia expresada por los hospedadores, y la virulencia ejercida por los parásitos. En el caso de la malaria aviar, estas interacciones antagónicas serán las que impulsen la coevolución entre aves y hemosporidios. Los hospedadores optan por estrategias de resistencia cuando tratan de limitar la intensidad de infección, mientras que las estrategias de tolerancia las toman cuando necesitan minimizar los daños producidos por una parasitemia determinada. Para comprender las dinámicas ecológicas y evolutivas de estas interacciones, primero habría que entender a nivel individual los efectos de estos parásitos sobre aquellos rasgos fisiológicos o inmunológicos que estén incidiendo directamente sobre la eficacia biológica de sus hospedadores. A lo largo de esta revisión se pretende abordar muchas de las variables utilizadas en el campo de la ecofisiología para comprender como reacciona el organismo de las aves ante infecciones por hemosporidios, adoptando estrategias de resistencia (ej. incremento de respuestas inmunológicas) o tolerancia (ej. incremento de policromatofilia, corticosterona plasmática, haptoglobina) frente a los parásitos en base a la propia biología del hospedador o a las estrategias del parásito. La información recogida en esta revisión consolida el conocimiento sobre las fuentes fisiológicas de variación en estrategias de resistencia y tolerancia frente a hemosporidios, y como esta variación puede afectar a la eficacia biológica de las aves.

Palabras clave: malaria aviar; compromisos de estrategias vitales; interacción parásito-hospedador; indicadores fisiológicos; tolerancia; resistencia

Muriel, J. 2020. Ecophysiological assessment of blood haemosporidian infections in birds. *Ecosistemas* 29(2): 1979. <https://doi.org/10.7818/ECOS.1979>

Parasitism is one of the main selective forces underlying the evolution of species, as this will have direct consequences on the host reproduction or survival. However, the overall result of parasite-host interactions could be assessed through resistance or tolerance expressed by hosts and virulence exerted by parasites. In the case of avian malaria, these antagonistic interactions will drive the coevolution between birds and haemosporidian parasites. Hosts choose resistance strategies when trying to limit the infection intensity, whereas tolerance strategies will be selected when they need to reduce the damage caused by a specific parasitemia. In order to understand the ecological and evolutionary dynamics of these interactions, it would be necessary to recognize the effects of these parasites on those physiological or immunological traits that directly affect the host fitness at an individual level. Throughout this review, the aim is to address many of the variables used within the field of ecophysiology to understand how the avian organism reacts to haemosporidian infections, adopting resistance strategies (e.g. increases in immune responses) or tolerance (e.g. high levels of polychromatophilia, plasma corticosterone, haptoglobin) against parasites based on the host's own biology or parasite strategies. The information collected in this review consolidates knowledge about the physiological sources of variation in resistance and tolerance strategies against haemosporidian parasites, and how this variation can affect avian fitness.

Key words: avian malaria; life-history trade-offs; parasite-host interaction; physiological indicator; tolerance; resistance

Introducción

Los parásitos son una poderosa fuerza selectiva que opera dentro de las poblaciones naturales, siendo modelos valiosos a la hora abordar importantes cuestiones ecológicas y evolutivas (Price et al. 1986; Sheldon y Verhulst 1996). Investigar las interacciones entre los hospedadores y sus parásitos, así como los factores que rigen la susceptibilidad del hospedador, es clave para comprender tanto la coevolución entre ambos como la propia epidemiología de la enfermedad. Los hemosporidios sanguíneos conforman un grupo ubicuo y muy diverso de protozoos parásitos (filo.

Apicomplexa) transmitidos por diferentes grupos de dípteros hematófagos (Valkiūnas 2005; Santiago-Alarcon et al. 2012). Si bien es cierto que el género *Plasmodium* se lleva casi todo el protagonismo por ser el agente de la malaria humana, la diversidad sistemática y ecológica de los parásitos de la malaria es mucho mayor. Hasta la fecha, y considerando únicamente a las aves, se han descrito molecularmente más de 2000 linajes de hemosporidios (Ellis et al. 2019), aunque esta cifra está lejos de alcanzar una cota. Muchos estudios han documentado la prevalencia de los distintos géneros de hemosporidios en el espacio y el tiempo, tanto dentro como entre poblaciones de hospedadores (ej. van Riper et al.

1986; Ricklefs et al. 2005; Peev et al. 2016; Muriel et al. 2018). Sin embargo, no son tantos los trabajos que han evaluado las consecuencias fisiológicas a nivel individual en un contexto ecológico (ej. Apanius et al. 2000; Hegemann et al. 2018).

Hasta hace poco menos de treinta años, los parásitos hemospordios se consideraban poco o nada patogénicos en aves (Weatherhead y Bennett 1992; Dufva y Allander 1995). Sin embargo, se ha visto que estos parásitos pueden tener efectos perjudiciales tanto en aves domésticas (Atkinson y van Riper 1991), como en poblaciones de aves silvestres (Atkinson et al. 2000; Martínez-De La Puente et al. 2010). Esta controversia entre la patogenicidad o no de los hemospordios radica principalmente en poblaciones silvestres que no han sido sometidas a un monitoreo continuo, ya que, más allá del estado nutricional del hospedador o los recursos disponibles, detectar los costes sobre determinados rasgos podría variar en el curso de la infección. Por ejemplo, durante la fase aguda, aun siendo la más corta, es cuando se produce la mayor mortalidad de aves infectadas, ya sea por efecto directo del parásito (Atkinson y van Riper 1991; Valkiūnas 2005) o por una mayor susceptibilidad a la depredación (Navarro et al. 2004; Møller y Nielsen 2007). De este modo, los individuos que mueren durante la fase aguda de la infección suelen pasar desapercibidos al no poder considerarse en los estudios, y en el caso de sobrevivir, podrían desarrollar infecciones crónicas en las que los parásitos persisten a baja densidad gracias al control del sistema inmunológico (Ellis et al. 2014). Por tanto, el hecho de que algunos estudios no encuentren efectos negativos de los parásitos en aves silvestres, podría ser debido precisamente a que son aves con infecciones crónicas que han llegado a un equilibrio con el sistema inmune del hospedador sin que se aprecien patologías (Valkiūnas 2005).

El estado de salud general y el buen funcionamiento de los mecanismos fisiológicos de un organismo son factores determinantes para hacer frente a infecciones por hemospordios y, por lo tanto, tendrán un papel fundamental en los distintos compromisos entre estrategias vitales (Schmid-Hempel 2011). De este modo, el hecho que un ave sea infectada y desarrolle la enfermedad podría tener consecuencias negativas sobre su condición física (Valkiūnas et al. 2006), afectando en última instancia a su eficacia biológica, ya sea reduciendo su supervivencia (Dawson y Bortolotti 2000; Martínez-De La Puente et al. 2010) o su éxito reproductor (Merino et al. 2000; Marzal et al. 2005; Tomás et al. 2007). En aquellos casos en los que la interacción con el parásito tiene una historia evolutiva más corta se podría llegar incluso a la extinción local del hospedador (van Riper et al. 1986; Atkinson et al. 2000).

Desde que Hamilton y Zuk (1982) publicaran su artículo sobre el papel de los parásitos en la selección sexual, han sido muchos los estudios que han tratado de explicar las relaciones ecológicas y evolutivas entre los parásitos y sus hospedadores (revisado en Sheldon y Verhulst 1996; Norris y Evans 2000). La teoría de las estrategias vitales establece que un individuo no puede invertir cantidades iguales de recursos entre todas sus funciones, y la asignación de estos recursos limitados entre las diferentes necesidades podría desencadenar numerosos compromisos entre funciones (Stearns 1992; Sheldon y Verhulst 1996). Desenmarañar el entramado que tejen las relaciones parásito-hospedador es algo muy complejo, especialmente en poblaciones silvestres, pero gracias al desarrollo de estudios experimentales (Marzal et al. 2005; Palinauskas et al. 2008), y a los recientes avances en la bioinformática y transcriptómica (Videvall et al. 2020), hemos empezado a comprender por qué no todas funcionan de la misma manera. El hecho de que el efecto patogénico de un linaje pueda diferir entre hospedadores (Palinauskas et al. 2008), nos lleva a pensar que esta relación podría depender tanto de los compromisos entre la resistencia y la tolerancia a distintos parásitos (Jarvi et al. 2001; Råberg et al. 2007; Sorci 2013; Videvall et al. 2020) como del comportamiento del propio parásito a la hora de ajustar su expresión y función genética a distintas especies de hospedador (García-Longoria et al. 2020).

De forma general, los hospedadores podrían resistir la presencia de parásitos cuando el sistema inmune contiene su multiplica-

ción o, en el mejor de los casos, eliminar la infección. Pero al mismo tiempo, los hospedadores podrían tolerar la infección para minimizar los costes derivados de la activación de una respuesta inmune que podrían reducir su eficacia biológica (Råberg et al. 2007; Sorci 2013). En aves, como en otros vertebrados, se ha visto que los compromisos entre la resistencia y tolerancia frente a hemospordios podrían estar supeditados a factores dependientes del hospedador, tales como su calidad (Goater y Holmes 1997; Cornet et al. 2014), sexo (Calero-Riestra y García 2016; Romano et al. 2019), edad (Romano et al. 2019), densidad poblacional (Tella 2002), o esfuerzo reproductor (Knowles et al. 2009); como de las propias condiciones ambientales (Vale et al. 2008). La virulencia de una infección, desde el punto de vista de su severidad, no solo depende del genotipo del parásito, sino que además podría estar determinada por la respuesta del hospedador, que variaría a lo largo de un gradiente que va desde estrategias de resistencia hasta de tolerancia. Más allá de la propia susceptibilidad y reparación tisular, los mecanismos de tolerancia podrían ser muy diversos y surgen cuando un hospedador minimiza el daño inducido de forma directa por el parásito o de forma indirecta por una reacción inmune desmesurada (revisado en Sorci 2013). En este sentido, esta revisión recoge un conjunto de variables fisiológicas vinculadas a estrategias de resistencia y/o tolerancia frente a infecciones por hemospordios que van a jugar un papel clave en la eficacia biológica de las aves, y que nos podrían ayudar a evaluar los costes de estos parásitos a nivel individual. Las variables que han sido consideradas irían desde rasgos fácilmente medibles, como son (1) la condición física y (2) diversos parámetros hematológicos, hasta rasgos que requieren técnicas de laboratorio más complejas, como son los relacionados con la evaluación de (3) la respuesta inmunitaria, (4) el estrés fisiológico mediado por glucocorticoides y (5) el estrés oxidativo.

Condición física

En función de la calidad individual de los hospedadores y la virulencia de los parásitos, las infecciones por hemospordios podrían variar desde asintomáticas hasta producir patologías de diversa importancia, tales como debilidad, inflamaciones, hiperplasias, parálisis e incluso la muerte (Ots y Hõrak 1998; Cordero y Rojo 2002), especialmente cuando la disponibilidad de alimento es escasa o se presentan condiciones ambientales adversas (Desser y Bennett 1993; Cornet et al. 2014). De este modo, aquellos individuos que presenten una mejor condición física o un mejor estado nutricional dispondrían de una mayor cantidad de recursos para hacer frente exitosamente a las infecciones. Algunos autores han descrito un efecto negativo de la infección por malaria en la condición física (ej. Norte et al. 2009; Cloutier et al. 2011), mientras que otros no han encontrado relación alguna (Krams et al. 2013; Dimitrov et al. 2019); aunque la ausencia de efectos podría explicarse por la falta de estudios longitudinales o la muerte selectiva de individuos que no superan la fase aguda de la infección. De un modo general, la pérdida de masa corporal derivada de la falta de ingesta o del consumo de recursos energéticos para compensar los daños ocasionados por los parásitos (como puede ser la activación de una respuesta inmune, reparación de un daño, etc.), podrían conllevar una reducción de la condición física del hospedador (Dawson y Bortolotti 2000; Valkiūnas et al. 2006).

VARIABLES HEMATOLÓGICAS

Eritrocitos

Entre otras razones fisiológicas, el deterioro de la condición física del hospedador podría ser consecuencia de una **anemia hemolítica** propiciada por hemospordios (De Rooode et al. 2005; White 2018). En el caso de individuos de buena calidad, la destrucción de eritrocitos podría ir acompañada de un incremento de la eritropoyesis, que puede detectarse al microscopio a través de una mayor proporción de eritrocitos inmaduros (Campbell y Ellis 2007).

El número de eritrocitos inmaduros o **eritrocitos policromatófilos** es un buen indicador de la respuesta regenerativa de glóbulos rojos, y algunos estudios han usado estos valores para estudiar la respuesta fisiológica del hospedador para compensar costes derivados de las infecciones por hemosporidios (Soares et al. 2016). En la malaria aviaria, la anemia aguda se suele hacer más evidente durante la fase patente de la enfermedad, cuando la intensidad de infección podría exceder incluso los varios cientos de parásitos por cada 10 000 eritrocitos (van Riper et al. 1986). Un modo muy sencillo y económico para medir los niveles de eritrocitos en sangre es calculando el **hematocrito** (porcentaje que ocupa la fracción celular al separarse por centrifugación del plasma, Fig. 1). Varios estudios han relacionado la presencia de hemosporidios con niveles bajos de hematocrito (Booth y Elliott 2002; Delhaye et al. 2018), pudiendo ser consecuencia de una anemia hemolítica severa (Desser y Bennett 1993; Palinauskas et al. 2011).

Hemoglobina

El transporte de oxígeno a los tejidos mediante esta hemoproteína proporciona energía para potenciar las funciones del organismo, con lo cual, la relación entre la hemoglobina y la condición física es directa. De hecho, se ha visto que la concentración de hemoglobina no sólo está relacionada con la condición física de las aves, sino que además está relacionada con su supervivencia (Bañbura et al. 2007). La reducción de eritrocitos a consecuencia de la infección por hemosporidios hace que la concentración de hemoglobina también decaiga, lo cual podría tener consecuencias nefastas para la condición física y la supervivencia de los hospedadores. Otro motivo por el que los niveles de hemoglobina en sangre pueden disminuir es por su digestión por parte del parásito durante su fase intraeritrocítica, ya que la usa como fuente de aminoácidos (Chen et al. 2001). Como producto de la proteólisis se libera ferroprotoporfirina, que el propio parásito captura y transforma en un polímero no tóxico llamado hemozoina, para así evitar dañarse así mismo por la producción de radicales de oxígeno (Schwarzer et al. 2003; Goldberg 2005). De este modo, un aumento en la intensidad de infección, y por tanto del metabolismo global de hemoglobina, podría desencadenar un incremento del daño oxidativo en el hospedador (van de Crommenacker et al. 2012), incrementando la severidad de la infección.

Sistema inmunológico

Las aves podrían evitar la entrada de parásitos en su organismo mediante mecanismos comportamentales o empleando barreras físico-químicas (Hart 2011; Magallanes et al. 2016). En el caso que los parásitos sobrepasen las barreras constitutivas, el organismo activaría sus defensas inmunitarias para contraatacar y evitar la invasión. Sin embargo, tal y como se ha comentado, activar una respuesta inmune es costoso, y podría acarrear daños al hospedador (Eraud et al. 2005). En base a esta inmunopatología se podría determinar si un hospedador adopta una estrategia de tolerancia o resistencia en respuesta a la infección parasitaria (Fig. 2; Pursall y Rolff 2012). De este modo, quizás un poco simplista, una estrategia de resistencia estará optando por limitar la intensidad de infección, mientras que una estrategia de tolerancia tendería a minimizar los costes inmunológicos producidos por una parasitemia determinada. En el caso de infecciones crónicas de malaria, el hospedador podría mantener bajas intensidades de infección a través de mecanismos involucrados tanto en la respuesta inmune innata como adquirida (Ots y Hörak 1998; Ellis et al. 2014). El sistema inmune de las aves, al igual que en otras especies de vertebrados, se compone de distintos tipos de leucocitos y proteínas, que están directamente involucradas en respuestas específicas e inespecíficas (Roitt et al. 1998; Kaiser 2010). Los leucocitos constituyen la base del sistema inmune, y su principal función es proteger contra patógenos (Campbell y Ellis 2007). Por un lado, los leucocitos asociados al sistema **inmune innato** juegan un papel clave en el mecanismo de protección inicial inespecífico durante las primeras etapas de la infección

(Schat et al. 2014). Por lo tanto, los monocitos y los granulocitos (heterófilos, basófilos y eosinófilos) podrían ofrecer una medida importante de la función inmune inespecífica y del estado de salud del hospedador (Davis et al. 2008; Masello et al. 2009). Por otro lado, el sistema **inmunitario adquirido** es altamente específico y actúa más eficazmente contra los parásitos (Masello et al. 2009;



Figura 1. Sangre de aves en tubos capilares heparinizados tras su centrifugación, donde se observa la fracción celular (rojo oscuro) y la plasmática (amarilla). La parte blanca es una especie de plastilina que sella el tubo y evita la salida de la sangre durante la centrifugación. Fotografía: Jaime Muriel.

Figure 1. Bird blood in heparinized capillary tubes after centrifugation, where the cellular fraction (dark red) and the plasma fraction (yellow) can be observed. The white part is a kind of plasticine that seals the tube and prevents blood leakage during centrifugation. Picture credit: Jaime Muriel.

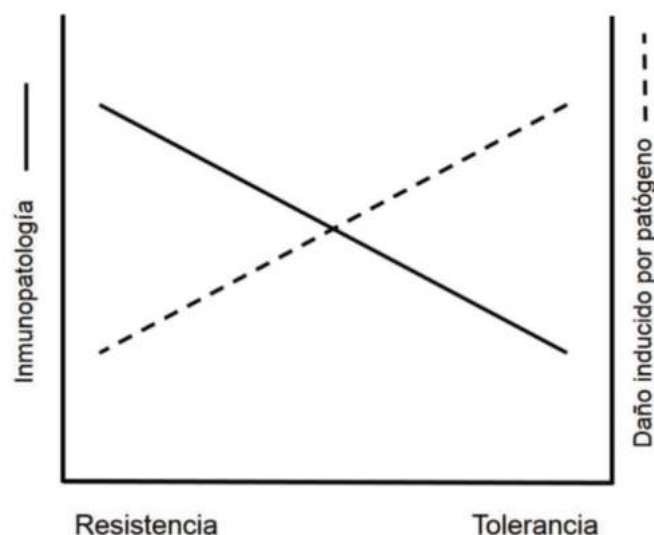


Figura 2. Interacciones propuestas entre la inmunopatología y las estrategias de tolerancia-resistencia del sistema inmune. A medida que disminuye el riesgo de sufrir un daño inmunopatológico, el hospedador cambiaría su respuesta inmune a lo largo de un gradiente, pasando de estrategias de resistencia a otras más de tolerancia. Sin embargo, respecto al daño inducido por patógenos, el hospedador invertiría más en estrategias de resistencia (adaptado de Pursall y Rolff 2012).

Figure 2. Proposed interactions between immunopathology and the tolerance-resistance strategies of the immune system. As risk from immunopathological damage decreases, the host shifts its immune response along the "gradient" from a resistance to a tolerance approach. However, in the risk from pathogen-induced damage, the host would invest more in resistance strategies (adapted from Pursall and Rolff 2012).

Kaiser 2010). Este sistema inmunitario adaptativo implicaría un mayor coste metabólico debido a los procesos de memoria inmunológica que permiten una defensa rápida y específica contra exposiciones posteriores al mismo patógeno (Schat et al. 2014). Tanto la inmunidad innata como la adquirida incluyen un componente celular (ej. leucocitos) y un componente humoral (ej. proteínas circulantes o anticuerpos) (Kaiser 2010). Cuando se evalúa la respuesta inmunitaria frente a los parásitos, hay que tener en cuenta diversos factores del hospedador que podrían estar condicionando la interpretación de nuestros resultados, tales como la edad, el sexo o las condiciones ambientales (Klein 2004; Martin et al. 2008; Alkie et al. 2019).

Sistema inmunitario innato

En el momento que un vector infectado esquiva los comportamientos de evasión del hospedador, y atraviesa las barreras físico-químicas de la inmunidad innata, podría inocular los esporozoítos a través de su saliva en el torrente sanguíneo del ave en cuestión (Valkiūnas 2005). En ese instante, es cuando el organismo reaccionaría a las proteínas de la saliva del mosquito, activando al sistema inmunitario innato, liberando histamina y provocando una inflamación. Cuando ocurre una invasión microbiana se suele formar un conjunto de reacciones de inflamación, donde el flujo sanguíneo aumenta, observándose una acumulación de células fagocitarias, como los heterófilos y los macrófagos (respuesta celular), destinadas a destruir el patógeno (Riera Romo et al. 2016). En infecciones agudas suele darse una respuesta inflamatoria sistémica que suele requerir muchos recursos y energía (Janeway et al. 1999), llegando a tener fatales consecuencias cuando son muy intensas o están mal dirigidas. Además, existe un tercer tipo celular implicado en este mecanismo de defensa inespecífico, las células *Natural Killer* (células NK). El plasma de las aves además consta de componentes humorales innatos que suelen consistir en 1) anticuerpos naturales, que se encuentran en individuos no inmunizados y reducen la susceptibilidad a las infecciones mediante la detección de patógenos; 2) sistema del complemento, que además de lisar células extrañas, contribuye a la inducción de inflamación; y 3) péptidos antimicrobianos circulantes y proteínas de fase aguda, que contribuyen a la lisis de células extrañas (revisado en Gao y Deviche 2019).

Muchos estudios han utilizado los **perfiles leucocitarios** circulantes para evaluar la función inmune (ej. Ots et al. 1998; Ricklefs y Sheldon 2007) y el estrés fisiológico en aves silvestres (Davis et al. 2008), ya que la proporción de cada tipo celular podría variar en función del estado de salud del individuo. De un modo general, las infecciones por hemosporidios podrían causar un incremento en el número de glóbulos blancos en aves (Figuerola et al. 1999; Ricklefs y Sheldon 2007), aunque esto podría variar entre poblaciones de una misma especie (Norte et al. 2009). Por ejemplo, ante situaciones de estrés como las producidas por infecciones parasitarias suele aumentar la relación heterófilos / linfocitos (Gross y Siegel 1983; Ots y Horak 1996), debido al incremento de heterófilos en procesos inflamatorios (Ots et al. 1998; Fig. 3A). La heterofilia derivada de las infecciones por hemosporidios (Norte et al. 2009; Ellis et al. 2014), junto al aumento otras células fagocitarias, como los monocitos / macrófagos, podrían incrementar la producción de reactivos de oxígeno durante el proceso de inflamación (More Bayona et al. 2017), lo que podría conllevar una reducción de la protección antioxidante y un aumento del daño oxidativo a largo plazo. Así mismo, esto se podría ver agravado por el incremento de los niveles de óxido nítrico por parte de los macrófagos como mecanismo de citotoxicidad contra estos protozoos parásitos (Macchi et al. 2010). Los macrófagos además pueden estar involucrados en la secreción de prostaglandinas y citoquinas que regulan la actividad de los linfocitos y otros macrófagos, así como en la participación de la respuesta inmune adquirida procesando el antígeno y presentando fragmentos antigénicos a los linfocitos T en el contexto de los antígenos de superficie celular del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC; revisado en Qureshi 1998). Por su parte, los eritrocitos parasitados por hemosporidios podrían liberar grandes cantidades de ácidos grasos hidroxilados que inhibirían las funcio-

nes de los monocitos (Schwarzer et al. 2003). Sin embargo, Ots y Hōrak (1998), en base a los heterófilos y a la concentración de albúmina en plasma, no observaron una respuesta inflamatoria en individuos infectados por hemosporidios, aunque sí que observaron una respuesta por parte de componentes de la inmunidad adquirida. Las células NK tienen un papel crucial en el control de parásitos intracelulares como *Plasmodium* (revisado en Burrack et al. 2019). El momento clave para la actuación de las células NK es durante la fase temprana de la infección por *Plasmodium*, justo antes de la activación de las células T específicas de antígenos, ya que mediante la cooperación con células mieloides podrían producir citoquinas inflamatorias, además de poder inhibir el crecimiento de parásitos a través de mecanismos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (revisado en Burrack et al. 2019). Por su parte, los eosinófilos estarían más involucrados en la defensa contra parásitos multicelulares, y los basófilos sí que juegan un papel más importante en respuesta a la inflamación, constituyendo un buen indicador fisiológico de condición y salud individual (Vinkler et al. 2010).

Respecto a las barreras bioquímicas que se consideran parte de la inmunidad innata, nos encontramos con la **haptoglobina**, que es una proteína plasmática de fase aguda cuya concentración aumenta durante una respuesta inflamatoria (Matson et al. 2006). Cuando existe hemólisis intravascular, esta proteína se une a la hemoglobina libre formando el complejo de hemoglobina-haptoglobina que es absorbido por la proteína CD163, que se expresa en fagocitos, y conduce a la secreción de citoquinas (Quaye 2008). Tanto la haptoglobina como la **PIT54**, una proteína de fase aguda proinflamatoria similar a la haptoglobina que se encuentra en las aves, se podrían unir a la hemoglobina extracelular con el fin de eliminarla y limitar la producción de metabolitos reactivos de oxígeno (Schoenle et al. 2017). Un estudio experimental en el que se inoculó *Plasmodium relictum* (linaje SGS1) a ejemplares de canario (*Serinus canaria*) encontró altos niveles de haptoglobina durante el desarrollo de la infección, alcanzando un pico al quinto día de la inoculación (Cellier-Holzem et al. 2010; pero ver Ellis et al. 2015). En esta línea, pero en condiciones naturales, Ellis y colaboradores (2014) documentaron en el verderón ojirrojo (*Vireo olivaceus*) y la reinita grande (*Icteria virens*) que la concentración de haptoglobina se explicaba por el estatus de infección y la edad de los hospedadores, encontrando niveles más altos en aquellos individuos que estaban infectados por hemosporidios. Estudios experimentales más recientes en los que se ha reducido la intensidad de infección mediante la medicación con primaquina, mostraron que los niveles de PIT54 y haptoglobina no descendieron con el tratamiento, y por tanto no estuvieron relacionados con una reducción de la respuesta inflamatoria (Schoenle et al. 2017; Arriero et al. 2018; respectivamente). Estos resultados podrían sugerir que esta proteína plasmática tiene un papel más importante en la tolerancia que en la resistencia a la infección por malaria.

Por otra parte, pero dentro de estos componentes bioquímicos, el **óxido nítrico** es una molécula de señalización multifuncional, que actúa como vasodilatador, neurotransmisor y modulador de procesos inflamatorios (Sun et al. 2003). También participa en la eliminación de parásitos, como los de la malaria, y células infectadas por virus mediante la formación de peroxinitrito, uno de los precursores más importantes del daño por radicales libres (Seguin et al. 1994; Sun et al. 2003). El óxido nítrico podría ser beneficioso durante la fase aguda de la infección, pero una sobreproducción podría ser letal. Medir el nivel de óxido nítrico podría ser una herramienta eficiente y robusta para monitorear la condición de los individuos y evaluar la magnitud de la respuesta inmune innata, la patogenicidad de las infecciones y el esfuerzo físico (Sild y Hōrak 2009). En esta línea, un estudio experimental en el que inocularon *P. relictum* en canarios a los que se les había inhibido la síntesis de óxido nítrico, mostró que las aves tratadas con el inhibidor sufrieron una mayor parasitemia, aunque sin llegar a producir anemia (Bichet et al. 2012). Otro estudio muy similar en el que inocularon *P. gallinaceum* en pollos a los que también se les había inhibido la síntesis de óxido nítrico, mostró que esta inhibición indujo una

mayor parasitemia y una reducción del número de leucocitos, aunque en este caso el inhibidor incrementó la supervivencia de los pollos (Macchi et al. 2013). Por el contrario, un estudio en el que disminuyeron la intensidad de *Plasmodium* mediante la medicación con primaquina no encontraron un efecto en los niveles de óxido nítrico (Schoenle et al. 2017).

Sistema inmunitario adquirido

La inmunidad adquirida es una respuesta adaptada que puede reconocer, destruir a los patógenos y aprender de este proceso de forma que, en el caso de que el organismo sufriera una invasión por los mismos patógenos, la respuesta sería más rápida y efectiva. Por una parte, la inmunidad adquirida humoral hace frente a patógenos extracelulares mediante el uso de anticuerpos mientras que la mediada por células se centra más en la eliminación de patógenos intracelulares. La inmunidad adquirida es un sistema muy complejo y sofisticado que constituye el último nivel de defensa del organismo (Janeway et al. 1999; Roitt et al. 1998). Del mismo modo que se comentaba para la inmunidad innata, la infección por hemosporidios podría conllevar una leucocitosis en aves (Figuerola et al. 1999; Ricklefs y Sheldon 2007), pero no sólo por un incremento de los heterófilos, sino también por el aumento de los linfocitos (Norris y Evans 2000; Ellis et al. 2014; Campbell y Ellis 2007). Los linfocitos son las células que permiten al organismo recordar los antígenos y diferenciar lo propio de lo extraño para proteger frente a bacterias, virus y protozoos (Fig. 3B). Existen dos tipos de linfocitos, los **linfocitos T** (madurados en el timo) están implicados en la inmunidad mediada por células, mientras que los **linfocitos B** (madurados en la bolsa de Fabricio) están implicados en la producción de anticuerpos específicos (inmunidad humoral). Cuando los linfocitos B, así como macrófagos, fagocitan a un patógeno, adhieren parte de las proteínas del patógeno a proteínas sintetizadas por el MHC, cuyos productos son expresados en la superficie de la membrana celular donde podría ser reconocido por los linfocitos T (Janeway et al. 1999). Mediante el reconocimiento de estos antígenos es como los linfocitos T pueden responder de forma específica contra los hemosporidios, pudiendo iniciar una cascada de eventos que conducirían a la producción de más linfocitos, citoquinas y anticuerpos, con el fin de contenerlos o incluso de eliminar específicamente a distintos linajes de *Plasmodium* (revisado en Jarvi et al. 2001; Sorci 2013). Por ejemplo, un trabajo realizado en una población silvestre de carboneros

(*Parus major*), ha demostrado que distintos supertipos del MHC podrían conferir protección cualitativa (prevalencia) y cuantitativa (parasitemia) contra dos especies de *Plasmodium* (*P. relictum* y *P. circumflexum*) (Sepil et al. 2013). El sistema inmune adquirido, ya sea por su componente humoral como celular, podría reducir la intensidad de infección de hemosporidios (Rank y Weidanz 1976). Ya a mitad del Siglo XX se desarrollaron estudios en los que vieron que las aves se podrían inmunizar de forma pasiva frente a *Plasmodium lophurae* inoculándoles suero de otras aves que habían estado infectadas con este linaje previamente (Coffin 1951). El nivel de anticuerpos específicos en plasma contra los parásitos de la malaria se puede evaluar mediante inmunoensayos ELISA (Graczyk et al. 1994), lo cual nos puede dar una idea de las dimensiones de la respuesta inmune adquirida frente a una especie particular de parásito, o si en algún momento ha estado expuesto a él (Atkinson et al. 2013; Palmer et al. 2013). Muchos estudios en ecofisiología suelen inocular antígenos (ej. fitohemaglutinina, PHA) para inducir y evaluar respuestas inflamatorias mediadas por células T (Smits et al. 1999; Lee et al. 2006). De hecho, Navarro y colaboradores (2003) observaron que aquellos individuos de gorrion común que presentaban infecciones por *Haemoproteus* tenían menores respuestas inflamatorias en respuesta a la estimulación con PHA que aquellos individuos que no estaban infectados. Otros estudios han llegado a sugerir que aquellas especies que muestran fuertes respuestas frente a la inoculación de PHA podrían tener una mayor resistencia natural a la infección por hemosporidios, aunque estos resultados podrían estar condicionados por la presencia/ausencia de vectores (Esparza et al. 2004). Sin embargo, habría que tener en cuenta que las respuestas inducidas por este mitógeno son bastante complejas ya que integran componentes de la inmunidad innata y de la específica (Martin et al. 2006; Salaberria et al. 2013).

Las respuestas inmunes más eficientes pueden ser causadas por genotipos inmunes específicos del parásito (Westerdahl et al. 2012) o porque los hospedadores han estado expuestos previamente a ese parásito y su defensa se ha ajustado a él. Este último escenario es el que se da en aquellos individuos que sobreviven y optan por tolerar una infección crónica donde los parásitos persisten a baja densidad. Un estudio llevado a cabo en el amakihi de Hawái ha mostrado que aquellos individuos que son capaces de recuperarse de infecciones agudas de *P. relictum* son capaces de desarrollar inmunidad, haciéndolos funcionalmente resistentes en

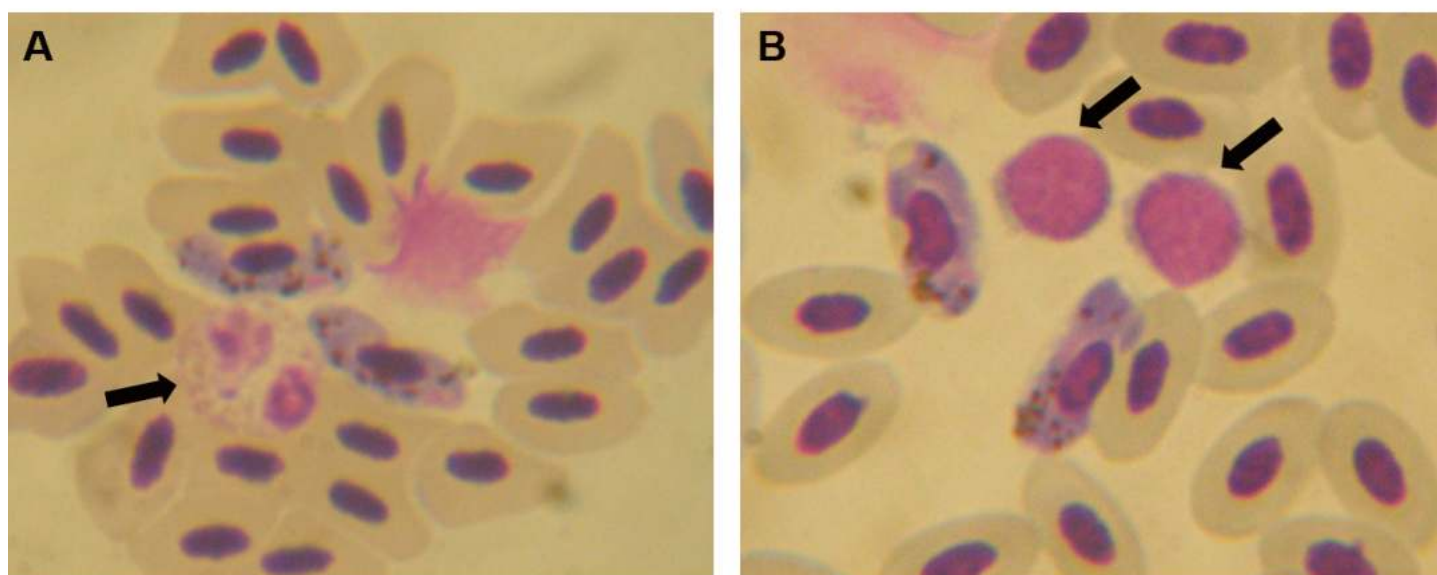


Figura 3. A) Dos macrogametocitos de *Haemoproteus* sp. junto a un heterófilo (flecha), y **B)** dos macrogametocitos de *Haemoproteus* sp. junto a dos linfocitos (flechas), observados en un frotis sanguíneo de curruca capirotada con tinción de Giemsa y examinado bajo el objetivo de inmersión. Fotografía: Jaime Muriel.

Figure 3. A) Two macrogametocytes of *Haemoproteus* sp. next to a heterophile (arrow), and **B)** two macrogametocyte of *Haemoproteus* sp. next to two lymphocytes (arrows), observed in a blackcap's Giemsa-stained blood smear using oil immersion objective lens. Picture credit: Jaime Muriel.

áreas donde la transmisión de malaria se ha vuelto endémica (Atkinson et al. 2001). Del mismo modo, Palmer y colaboradores (2013) han visto mediante análisis de anticuerpos, que el pingüino de las Galápagos muestra una seroprevalencia extremadamente alta a *Plasmodium* sp. (97.2%) mientras que la prevalencia por PCR fue baja (9.2%). Estos resultados estarían sugiriendo una alta exposición al parásito, pero un bajo coste en términos de supervivencia (quizás por no ser un hospedador competente para el parásito), lo cual implica que estarían desarrollando un nivel efectivo de inmunidad adquirida (Atkinson y van Riper 1991). Norte y colaboradores (2009) han sugerido que tanto *Plasmodium* como *Leucocytozoon* podrían provocar una respuesta inmune más específica con estimulación antigénica de linfocitos, que la que podrían provocar parásitos del género *Haemoproteus*. Ante infecciones por hemospordios, Ots y Hórak (1998) no encontraron una activación clara de respuestas innatas, sin embargo, sí que observaron que los individuos infectados presentaban mayores niveles de linfocitos y gammaglobulinas en plasma, lo que indica que tanto los mecanismos adquiridos de respuesta inmune humoral como la mediada por células estaban involucrados en la defensa del hospedador. Estudios experimentales en los que se llevó a cabo la reducción de hemospordios en herrerillos mediante a medicación con primaquina mostraron que las hembras control tuvieron una peor condición física y un nivel de proteínas del estrés HSP60 mayor (Tomás et al. 2005), así como un nivel de inmunoglobulinas más alto (Tomás et al. 2007), que aquellas hembras a las que se les había reducido la carga parasitaria mediante medicación.

Mientras que los linfocitos T citotóxicos combaten células infectadas por estadios intracelulares del parásito, los anticuerpos proporcionan una barrera contra estadios extracelulares (Janeway et al. 1999), de forma que la inmunidad mediada por células T podría ser más efectiva contra los gametocitos o trofozoitos de los hemospordios. En este sentido, Gonzalez y colaboradores (1999) encontraron en una población de gorrión común que la probabilidad de recuperación de la infección por *Haemoproteus* estaba positivamente correlacionada con la proliferación de linfocitos T (reacción dérmica a la PHA), pero no con las concentraciones de inmunoglobulinas. Rank y Weidanz (1976) observaron en aves de corral que cuando los hospedadores tenían bajos niveles de células T o B, las infecciones con *P. gallinaceum* podían ser letales. Sin embargo, cuando estas infecciones se reproducían en individuos con deficiencia en células B, estos desarrollaban una infección crónica de baja patogenicidad, lo que implicaría que mientras las infecciones agudas estaban controladas por mecanismos de inmunidad dependientes de anticuerpos, la resistencia a una reinfección en individuos con bajos niveles de células B estaría mediada por mecanismos de inmunidad celular (CMI). El uso de aves con un déficit de linfocitos B proporciona más evidencia del papel de los anticuerpos en la inmunidad adquirida contra la malaria, mostrando que la colaboración entre linfocitos T y B es fundamental para tener una protección máxima frente a hemospordios (Congdon et al. 1969; Longenecker et al. 1969). En esta línea, con el objetivo de estudiar el efecto de la infección por malaria sobre la respuesta inmune humoral, Delhaye y colaboradores (2018) inocularon *P. relictum* a canarios y cuantificaron la producción de anticuerpos cuando tuvo lugar el primer contacto con el antígeno y en una segunda reinfección. Sin embargo, no observaron diferencias significativas en la producción de anticuerpos entre individuos infectados y no infectados entre los diferentes contactos con el parásito, aunque la intensidad de infección aumentó después del contacto primario con el antígeno.

Estrés fisiológico

Ante una situación de estrés, como puede ser la ocasionada por una infección parasitaria, el organismo intentará autorregularse para volver a una condición de equilibrio (homeostasis). Con el objetivo de combatir y eliminar la infección, el organismo desencadena una respuesta inmunitaria, que en función del tiempo de exposición al factor de estrés podría tener distintas consecuencias.

Por ejemplo, si la exposición al factor es corta, el sistema inmune podría salir reforzado, mientras que una exposición prolongada podría reducir la inmunocompetencia (Dhabhar y McEwen 2001). De este modo, ante infecciones crónicas, los organismos harían uso de los glucocorticoides, especialmente de la corticosterona a través del eje hipotálamo-hipófiso-córticosuprarrenal (eje HPA), para regular la respuesta inmunitaria (Bourgeon et al. 2010) con el fin de disminuir la resistencia a la enfermedad (Brown y Zwilling 1994). Muchos estudios han destacado el efecto inmunosupresor de la corticosterona en aves silvestres (ej. Gao y Deviche 2019) pero, más allá de causar un daño mayor y bajo estas circunstancias, estaría ayudando a mantener la homeostasis al minimizar respuestas inmunes desmesuradas (Webster y Sternberg 2004). En este sentido, varios estudios han demostrado que las infecciones podrían inducir la producción de glucocorticoides por parte del hospedador (Webster y Sternberg 2004; Love et al. 2016). En el caso particular de la malaria aviar, Schoenle y colaboradores (2018) estudiaron la relación entre la infección por hemospordios y los niveles de corticosterona plasmática en el sargento alirrojo (*A. phoeniceus*), descubriendo que las concentraciones hormonales más altas estaban asociadas con menores costes derivados de la infección, lo cual sugiere que este glucocorticoide está más implicado en mecanismos de tolerancia que de resistencia.

Estrés oxidativo y antioxidantes

Montar una respuesta inmune no solo conlleva grandes costes energéticos y metabólicos (Eraud et al. 2005), sino que además podría causar autoinmunidad y estrés oxidativo (Costantini y Møller 2009; Sorci y Faivre 2009). En un metaanálisis llevado a cabo por Costantini y Møller (2009) en aves, se confirmó que el estrés oxidativo podía ser un coste fisiológico asociado a la respuesta inmune, resaltando el papel crucial que desempeñan los antioxidantes a la hora de prevenir el daño inmunopatológico sobre distintos tejidos del hospedador. En esta línea, muchos estudios han señalado que los efectos perjudiciales de los hemospordios aviares durante las primeras etapas de la infección podrían estar causados por la estimulación de la respuesta inmune innata (Ots y Hórak 1998; Garvin et al. 2003), ya que su fracción celular podría estar generando y liberando especies reactivas de oxígeno (ROS, comúnmente conocido como “explosión oxidativa”) que atacan al parásito (Swindle y Metcalfe 2007; Costantini y Møller 2009). Los leucocitos son la principal fuente de ROS, y en el caso de inflamación, la producción excesiva de ROS podría deteriorar incluso al sistema de protección antioxidante. Esta respuesta innata frente a parásitos tiene como ventaja su rapidez, ya que la respuesta inmune adquirida necesitaría más tiempo para desarrollar los anticuerpos específicos. Por el contrario, su falta de especificidad y su alta citotoxicidad podrían causar daño oxidativo tanto a distintas moléculas (lípidos, proteínas y ADN) como a células adyacentes. Este desequilibrio entre la producción de radicales libres y mecanismos de defensa antioxidante del organismo es lo que se conoce como estrés oxidativo (Halliwell 2007). Además, los parásitos de la malaria aviar podrían incrementar los niveles de estrés oxidativo en el hospedador de un modo más directo, ya que, en el caso de sobrepasar las barreras inmunológicas, estos comenzarían a crecer y multiplicarse, generando mayores niveles de ROS como un subproducto de la digestión de la hemoglobina (Goldberg 2005). Indirectamente, este incremento de ROS podría conllevar una reducción de la supervivencia y esperanza de vida de los hospedadores, ya que varios estudios han encontrado una relación directa entre el estrés oxidativo y el acortamiento de los telómeros (Chatelain et al. 2020), aunque este acortamiento podría ralentizarse por la acción de los antioxidantes (Badás et al. 2015). De hecho, estudios recientes en aves han demostrado que la infección por hemospordios podría conllevar a un acortamiento de los telómeros (Asghar et al. 2015, 2016; Karell et al. 2017). El balance entre los beneficios y los costes de ROS van a depender de características específicas de los hospedadores o del contexto ambiental (Monaghan et al. 2009; Herrera-Dueñas et al. 2017).

Conclusiones

Las aves portadoras de haemosporidios pueden ver mermada su eficacia biológica al reducirse su supervivencia y/o su éxito reproductor. Sin embargo, existe una gradación en la severidad de esos costes, ya que la virulencia de una infección no sólo estaría determinada por el propio genotipo del parásito, sino que además estará condicionada tanto por rasgos del propio hospedador como por el contexto ambiental. En un momento dado, factores como la calidad del individuo, la edad, el sexo o el estatus reproductivo, podrían condicionar la distribución de recursos entre funciones vitales, lo que podría determinar que un hospedador adopte, dentro de un gradiente, estrategias de resistencia o de tolerancia frente a los parásitos. Por lo tanto, evaluar los costes fisiológicos de las infecciones por hemospodios mediante diversas variables a nivel individual es fundamental para entender la evolución de la interacción parásito-hospedador. La reducción de la condición física de los hospedadores durante la fase aguda de la infección es evidente, sin embargo, se necesitan más estudios experimentales que exploren los costes fisiológicos de las infecciones en su fase crónica. Estudios futuros no solo se deberían basar en la prevalencia de hemospodios, sino que además deberían incorporar la intensidad de infección (idealmente de cada linaje). De este modo se podría evaluar con mayor precisión la capacidad del hospedador para desarrollar estrategias de resistencia o tolerancia, y ver como se relacionan con su eficacia biológica. Al fin y al cabo, los costes de las infecciones crónicas a nivel individual y poblacional podrían estar relacionados con cambios fisiológicos sutiles que ocurren a lo largo del curso de la infección.

Agradecimientos

Quiero dar las gracias a Josué Martínez de la Puente y Martina Ferraguti por su invitación para participar en este monográfico sobre la ecología de transmisión de parásitos sanguíneos en aves, así como a los dos revisores anónimos que con sus comentarios han mejorado notablemente esta revisión. Este trabajo lo he podido llevar a cabo gracias a un contrato postdoctoral del subprograma Juan de la Cierva Formación (FJCI-2017-34109), con el patrocinio financiero del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (MCIU) de España. Por último, quiero dar las gracias a todo el personal sanitario, así como al resto de personal que sigue ejerciendo un servicio público a la ciudadanía durante este estado de alarma generado por el COVID-19: cajeros de supermercado, servicios de limpieza, trabajadores del transporte público, etc.; ya que sin ellos no hubiéramos tenido la estabilidad necesaria para desarrollar nuestro trabajo con cierta tranquilidad.

Referencias

- Alkie, T.N., Yitbarek, A., Hodgins, D.C., Kulkarni, R.R., Taha-Abdelaziz, K., Sharif, S. 2019. Development of innate immunity in chicken embryos and newly hatched chicks: a disease control perspective. *Avian Pathology* 48: 288-310.
- Apanius, V., Yorinks, N., Bermingham, E., Ricklefs, R.E. 2000. Island and taxon effects in parasitism and resistance of Lesser Antillean birds. *Ecology* 81: 1959-1969.
- Arriero, E., Pérez-Tris, J., Ramírez, A., Remacha, C. 2018. Trade-off between tolerance and resistance to infections: an experimental approach with malaria parasites in a passerine bird. *Oecologia* 188: 1001-1010.
- Asghar, M., Hasselquist, D., Hansson, B., Zehindjiev, P., Westerdahl, H., Bensch, S. 2015. Hidden costs of infection: Chronic malaria accelerates telomere degradation and senescence in wild birds. *Science* 347: 436-438.
- Asghar, M., Palinauskas, V., Zaghdoudi-Allan, N., Valkiūnas, G., Mukhin, A., Platonova, E., Färner, A., et al. 2016. Parallel telomere shortening in multiple body tissues owing to malaria infection. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 283: 20161184.
- Atkinson, C., Van Riper, C. III 1991. Pathogenicity and epizootiology of avian haematocysts: *Plasmodium*, *Leucocytozoon* and *Haemoproteus*. En: (Loye, J.E., Zuk, M. (eds.)), *Bird-parasite Interactions*, pp. 19-48. Oxford University Press, Oxford, Reino Unido.
- Atkinson, C.T., Dusek, R.J., Woods, K.L., Iko, W.M. 2000. Pathogenicity of avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. *Journal of Wildlife Diseases* 36: 197-204.
- Atkinson, C.T., Dusek, R.J., Lease, J.K. 2001. Serological responses and immunity to superinfection with avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. *Journal of Wildlife Diseases* 37: 20-27.
- Atkinson, C.T., Saili, K.S., Utzurrum, R.B., Jarvi, S.I. 2013. Experimental evidence for evolved tolerance to avian malaria in a wild population of low elevation Hawaii Amakihi (*Hemignathus virens*). *EcoHealth* 10: 366-375.
- Badás, E.P., Martínez, J., Rivero de Aguilar Cachafeiro, J., Miranda, F., Fíguerola, J., Merino, S. 2015. Ageing and reproduction: Antioxidant supplementation alleviates telomere loss in wild birds. *Journal of Evolutionary Biology* 28: 896-905.
- Bañbura, J., Bañbura, M., Kaliński, A., Skwarska, J., Słomczyński, R., Wawrzyniak, J., Zieliński, P. 2007. Habitat and year-to-year variation in haemoglobin concentration in nestling blue tits *Cyanistes caeruleus*. En: *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A Molecular and Integrative Physiology* 148: 572-577.
- Bichet, C., Cornet, S., Larcombe, S., Sorci, G. 2012. Experimental inhibition of nitric oxide increases *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) parasitaemia. *Experimental parasitology* 132: 417-423.
- Booth, C.E., Elliott, P.F. 2003. Hematological responses to hematozoa in North American and neotropical songbirds. En: *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A Molecular and Integrative Physiology* 133(3):451-67.
- Bourgeon, S., Kauffmann, M., Geiger, S., Raclot, T., Robin, J.P. 2010. Relationships between metabolic status, corticosterone secretion and maintenance of innate and adaptive humoral immunities in fasted re-fed mallards. *Journal of Experimental Biology* 213: 3810-3818.
- Brown, D.H., Zwilling, B.S. 1994. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis differentially affects the anti-mycobacterial activity of macrophages from BCG-resistant and susceptible mice. *Journal of Neuroimmunology* 53: 181-187.
- Burrack, K.S., Hart, G.T., Hamilton, S.E. 2019. Contributions of natural killer cells to the immune response against *Plasmodium*. *Malaria Journal* 18: 321.
- Calero-Riestra, M., García, J.T. 2016. Sex-dependent differences in avian malaria prevalence and consequences of infections on nestling growth and adult condition in the Tawny pipit, *Anthus campestris*. *Malaria Journal* 15: 1-11.
- Campbell, T.W., Ellis, C.K. 2007. Avian and exotic animal hematology and cytology, 3rd edition. Blackwell Publishing Professional, Ames, IA, Estados Unidos.
- Cellier-Holzem, E., Esparza-Salas, R., Garnier, S., Sorci, G. 2010. Effect of repeated exposure to *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) on infection dynamics in domestic canaries. *International Journal for Parasitology* 40: 1447-1453.
- Chatelain, M., Drobniak, S.M., Szulkin, M. 2020. The association between stressors and telomeres in non-human vertebrates: a meta-analysis. *Ecology Letters* 23: 381-398.
- Chen, M.M., Shi, L., Sullivan, D.J. 2001. Haemoproteus and Schistosoma synthesize heme polymers similar to *Plasmodium* hemozoin and β -hematin. *Molecular and Biochemical Parasitology* 113: 1-8.
- Cloutier, A., Mills, J.A., Yarrall, J.W., Baker, A.J. 2011. *Plasmodium* infections of red-billed gulls (*Larus scopulinus*) show associations with host condition but not reproductive performance. *Journal of the Royal Society of New Zealand* 41: 261-277.
- Coffin, G.S. 1951. Passive immunization of birds against malaria. *Journal of Infectious Diseases* 89: 8-15.
- Congdon, L.L., Farmer, J.N., Longenecker, B.M., Breitenbach, R.P. 1969. Natural and acquired antibodies to *Plasmodium lophurae* in intact and bursaless chickens. II. Immunofluorescent Studies. *The Journal of Parasitology* 55: 817.
- Cordero del Campillo, M., Rojo Vázquez, F.A. 2002. *Parasitología veterinaria*. McGraw-Hill Interamericana de España. Madrid, España.
- Cornet, S., Bichet, C., Larcombe, S., Faivre, B., Sorci, G. 2014. Impact of host nutritional status on infection dynamics and parasite virulence in a bird-malaria system. *Journal of Animal Ecology* 83: 256-265.
- Costantini, D., Møller, A.P. 2009. Does immune response cause oxidative stress in birds? A meta-analysis. En: *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A Molecular and Integrative Physiology* 153: 339-344.

- Davis, A.K., Maney, D.L., Maerz, J.C. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: A review for ecologists. *Functional Ecology* 22: 760-772.
- Dawson, R.D., Bortolotti, G.R. 2000. Effects of hematozoan parasites on condition and return rates of American kestrels. *The Auk* 117: 373-380.
- De Roode, J.C., Helinski, M.E.H., Anwar, M.A., Read, A.F. 2005. Dynamics of multiple infection and within-host competition in genetically diverse malaria infections. *American Naturalist* 166: 531-542.
- Delhaye, J., Glaizot, O., Christe, P. 2018. The effect of dietary antioxidant supplementation in a vertebrate host on the infection dynamics and transmission of avian malaria to the vector. *Parasitology Research* 117: 2043-2052.
- Desser, S.S., Bennett, G.F. 1993. The genera *Leucozytozoon*, *Haemoproteus*, and *Hepatocystis*. En: Kreier, J.P. (ed.), *Parasitic protozoa*, pp. 273-310, Vol. 7, 2nd ed. Academic Press, San Diego, CA, Estados Unidos.
- Dhabhar, F.S., McEwen, B.S. 2001. Bidirectional effects of stress and glucocorticoid hormones on immune function: Possible explanations for paradoxical observations. En: Ader, R., Felten, R.L., Cohen, N. (Eds.), *Psychoneuroimmunology* (3rd ed.), pp. 301-338. Academic Press. San Diego, CA, Estados Unidos.
- Dimitrov, D., Marinov, M.P., Bobeva, A., Ilieva, M., Bedev, K., Atanasov, T., Zehindjiev, P. 2019. Haemosporidian parasites and leukocyte profiles of pre-migratory rosy starlings (*Pastor roseus*) brought into captivity. *Animal Migration* 6: 41-48.
- Dufva, R., Allander, K. 1995. Intraspecific Variation in plumage coloration reflects immune response in great tit (*Parus major*) males. *Functional Ecology* 9: 785.
- Ellis, V.A., Kunkel, M.R., Ricklefs, R.E. 2014. The ecology of host immune responses to chronic avian haemosporidian infection. *Oecologia* 176: 729-737.
- Ellis, V.A., Cornet, S., Merrill, L., Kunkel, M.R., Tsunekage, T., Ricklefs, R.E. 2015. Host immune responses to experimental infection of *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) in domestic canaries (*Serinus canaria*). *Parasitology Research* 114: 3627-3636.
- Ellis, V.A., Sari, E.H.R., Rubenstein, D.R., Dickerson, R.C., Bensch, S., Ricklefs, R.E. 2019. The global biogeography of avian haemosporidian parasites is characterized by local diversification and intercontinental dispersal. *Parasitology* 146: 213-219.
- Eraud, C., Duriez, O., Chastel, O., Faivre, B. 2005. The energetic cost of humoral immunity in the Collared Dove, *Streptopelia decaocto*: Is the magnitude sufficient to force energy-based trade-offs? *Functional Ecology* 19: 110-118.
- Esparza, B., Martínez-Abraín, A., Merino, S., Oro, D. 2004. Immunocompetence and the prevalence of haematozoan parasites in two long-lived seabirds. *Ornis Fennica* 81: 40-46.
- Figuerola, J., Muñoz, E., Gutiérrez, R., Ferrer, D. 1999. Blood parasites, leukocytes and plumage brightness in the Cirl Bunting, *Emberiza cirius*. *Functional Ecology* 13: 594-601.
- Gao, S., Deviche, P.J. 2019. The causative effects of corticosterone on innate immunity during the stress response in the house sparrow, *Passer domesticus*. *General and Comparative Endocrinology* 275: 30-37.
- 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.
- Garvin, M.C., Homer, B.L., Greiner, E.C. 2003. Pathogenicity of *Haemoproteus danilewskyi*, kruse, 1890, in blue jays (*Cyanocitta cristata*). *Journal of Wildlife Diseases* 39: 161-169.
- Goater C.P., Holmes J.C. 1997. Parasite-mediated natural selection. En: Clayton D.H., Moore J. (eds), *Host-parasite evolution: general principles and avian models*, pp. 9-29. Oxford University Press, Oxford, Reino Unido.
- Goldberg, D.E. 2005. Hemoglobin degradation. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 295: 275-291.
- Gonzalez, G., Sorci, G., Møller, A.P., Ninni, P., Haussy, C., De Lope, F. 1999. Immunocompetence and condition-dependent sexual advertisement in male house sparrows (*Passer domesticus*). *Journal of Animal Ecology* 68: 1225-1234.
- Graczyk, T.K., Cranfield, M.R., Skjoldager, M.L., Shaw, M.L. 1994. An ELISA for detecting anti-plasmodium spp. antibodies in African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*). *The Journal of Parasitology* 80(1): 60-66.
- Gross, W.B., Siegel, H.S. 1983. Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. *Avian diseases* 27: 972-979.
- Halliwell, B. 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions* 35 (5): 1147-1150.
- Hamilton, W.D., Zuk, M. 1982. Heritable true fitness and bright birds: A role for parasites? *Science* 218: 384-387.
- Hart, B.L. 2011. Behavioural defences in animals against pathogens and parasites: Parallels with the pillars of medicine in humans. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 366: 3406-3417.
- Hegemann, A., Alcalde Abril, P., Muheim, R., Sjöberg, S., Alerstam, T., Nilsson, J.Å., Hasselquist, D. 2018. Immune function and blood parasite infections impact stopover ecology in passerine birds. *Oecologia* 188: 1011-1024.
- Herrera-Dueñas, A., Pineda-Pampliega, J., Antonio-García, M.T., Aguirre, J.I. 2017. The influence of urban environments on oxidative stress balance: A case study on the house sparrow in the Iberian Peninsula. *Frontiers in Ecology and Evolution* 5: 106.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Capra, J.D. 1999. Immunobiology: the immune system in health and disease, 4th edn. Current Biology Publications, London
- Jarvi, S.I., Atkinson, C.T., Fleischer, R.C. 2001. Immunogenetics and resistance to avian malaria (*Plasmodium relictum*) in Hawaiian honeycreepers (Drepanidinae). En: Scott, J.M., Conant, S., Van Riper III, C. (eds.) *Evolution, Ecology, Conservation and Management of Hawaiian Birds: A Vanishing Avifauna*, pp 254-263. *Studies in Avian Biology* 22, Cooper Ornithological Society, San José, CA, Estados Unidos.
- Kaiser, P. 2010. Advances in avian immunology-prospects for disease control: A review. *Avian Pathology* 39: 309-324.
- Karell, P., Bensch, S., Ahola, K., Asghar, M. 2017. Pale and dark morphs of tawny owls show different patterns of telomere dynamics in relation to disease status. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 284:20171127.
- Klein, S.L. 2004. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. *Parasite Immunology* 26: 247-264.
- Knowles, S.C.L., Nakagawa, S., Sheldon, B.C. 2009. Elevated reproductive effort increases blood parasitaemia and decreases immune function in birds: A meta-regression approach. *Functional Ecology* 23: 405-415.
- Krams, I.A., Suraka, V., Rantala, M.J., Sepp, T., Mierauskas, P., Vrublevska, J., Krama, T. 2013. Acute infection of avian malaria impairs concentration of haemoglobin and survival in juvenile altricial birds. *Journal of Zoology* 291: 34-41.
- Lee, K.A., Martin, L.B., Hasselquist, D., Ricklefs, R.E., Wikelski, M. 2006. Contrasting adaptive immune defenses and blood parasite prevalence in closely related *Passer* sparrows. *Oecologia* 150: 383-392.
- Longenecker, B.M., Breitenbach, R.P., Congdon, L.L., Farmer, J.N. 1969. Natural and Acquired Antibodies to *Plasmodium lophurae* in Intact and Bursaless Chickens. I. Agglutination and Passive Immunity Studies. *The Journal of Parasitology* 55: 418.
- Love, A.C., Foltz, S.L., Adelman, J.S., Moore, I.T., Hawley, D.M. 2016. Changes in corticosterone concentrations and behavior during *Mycoplasma gallisepticum* infection in house finches (*Haemorhous mexicanus*). *General and Comparative Endocrinology* 235: 70-77.
- Macchi, B. de M., Quaresma, J.A.S., Herculano, A.M., Crespo-López, M.E., DaMatta, R.A., do Nascimento, J.L.M. 2010. Pathogenic action of *Plasmodium gallinaceum* in chickens: Brain histology and nitric oxide production by blood monocyte-derived macrophages. *Veterinary Parasitology* 172: 16-22.
- Macchi, B. de M., Miranda, F.J.B., de Souza, F.S., de Carvalho, E.C.Q., Albernaz, A.P., do Nascimento, J.L.M., DaMatta, R.A. 2013. Chickens treated with a nitric oxide inhibitor became more resistant to *Plasmodium gallinaceum* infection due to reduced anemia, thrombocytopenia and inflammation. *Veterinary research* 44: 8.
- Magallanes, S., Møller, A.P., García-Longoria, L., De Lope, F., Marzal, A. 2016. Volume and antimicrobial activity of secretions of the uropygial gland are correlated with malaria infection in house sparrows. *Parasites and Vectors* 9: 232.
- Martin, L.B., Han, P., Lewittes, J., Kuhlman, J.R., Klasing, K.C., Wikelski, M. 2006. Phytohemagglutinin-induced skin swelling in birds: Histological support for a classic immunoeological technique. *Functional Ecology* 20: 290-299.

- Martin, L.B., Weil, Z.M., Nelson, R.J. 2008. Seasonal changes in vertebrate immune activity: Mediation by physiological trade-offs. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363: 321-339.
- Martínez-De La Puente, J., Merino, S., Tomás, G., Moreno, J., Morales, J., Lobato, E., García-Fraile, S., Belda, E.J. 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: 541-545.
- Masello, J.F., Choconi, R.G., Helmer, M., Kremberg, T., Lubjuhn, T., Quillfeldt, P. 2009. Do leucocytes reflect condition in nestling burrowing parrots *Cyanoliseus patagonus* in the wild? En: *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A Molecular and Integrative Physiology* 152: 176-181.
- Matson, K.D., Cohen, A.A., Klasing, K.C., Ricklefs, R.E., Scheuerlein, A. 2006. No simple answers for ecological immunology: Relationships among immune indices at the individual level break down at the species level in waterfowl. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 273: 815-822.
- Merino, S., Moreno, J., Jose Sanz, J., Arriero, E., Sanz, J.J., Arriero, E. 2000. Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 267: 2507-2510.
- Møller, A.P., Nielsen, J.T. 2007. Malaria and risk of predation: A comparative study of birds. *Ecology* 88: 871-881.
- Monaghan, P., Metcalfe, N.B., Torres, R. 2009. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: Mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology Letters* 12: 75-92.
- More Bayona, J.A., Karuppanan, A.K., Trites, M.J., Barreda, D.R. 2017. Application of imaging flow cytometry for characterization of acute inflammation in non-classical animal model systems. *Methods* 112: 167-174.
- Muriel, J., Graves, J.A., Gil, D., Magallanes, S., Salaberria, C., Casal-López, M., Marzal, A. 2018. Molecular characterization of avian malaria in the spotless starling (*Sturnus unicolor*). *Parasitology Research* 117: 919-928.
- Navarro, C., Marzal, A., De Lope, F., Møller, A.P. 2003. Dynamics of an immune response in house sparrows *Passer domesticus* in relation to time of day, body condition and blood parasite infection. *Oikos* 101: 291-298.
- Navarro, C., De Lope, F., Marzal, A., Møller, A.P. 2004. Predation risk, host immune response, and parasitism. *Behavioral Ecology* 15: 629-635.
- Norris, K., Evans, M.R. 2000. Ecological immunology: life history trade-offs and immune defense in birds. *Behavioral Ecology* 11: 19-26.
- Norte, A.C., Araújo, P.M., Sampaio, H.L., Sousa, J.P., Ramos, J.A. 2009. Haematzoa infections in a great tit parus major population in Central Portugal: Relationships with breeding effort and health. *Ibis* 151: 677-688.
- Ots, I., Horak, P. 1996. Great tits *Parus major* trade health for reproduction. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 263: 1443-1447.
- Ots, I., Hōrak, P. 1998. Health impact of blood parasite in breeding great tits. *Oecologia* 116: 441-448.
- Ots, I., Murumägi, A., Hōrak, P. 1998. Haematological health state indices of reproducing Great Tits: Methodology and sources of natural variation. *Functional Ecology* 12: 700-707.
- Palinauskas, V., Valkiunas, G., Bolshakov, C. V., Bensch, S. 2008. *Plasmodium relictum* (lineage P-SGS1): Effects on experimentally infected passerine birds. *Experimental Parasitology* 120: 372-380.
- Palinauskas, V., Valkiunas, G., Bolshakov, C. V., Bensch, S. 2011. *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) and *Plasmodium ashfordi* (lineage GRW2): The effects of the co-infection on experimentally infected passerine birds. *Experimental Parasitology* 127: 527-533.
- Palmer, J.L., McCutchan, T.F., Vargas, F.H., Deem, S.L., Cruz, M., Hartman, D.A., Parker, P.G. 2013. Seroprevalence of malarial antibodies in Galapagos penguins (*Spheniscus mendiculus*). *Journal of Parasitology* 99: 770-776.
- Peev, S., Zehindjiev, P., Ilieva, M., Träff, J., Briedis, M., Adamík, P. 2016. Haemosporidian blood parasite diversity and prevalence in the semi-collared flycatcher (*Ficedula semitorquata*) from the eastern Balkans. *Parasitology International* 65: 613-617.
- Price, P.W., Westoby, M., Rice, B., Atsatt, P.R., Fritz, R.S., Thompson, J.N., Moberly, K. 1986. Parasite mediation in ecological interactions. *Annual review of ecology and systematics*. 17: 487-505.
- Pursall, E.R., Rolff, J. 2012. Immunopathology in ecological immunology. En: Demas GE Nelson RJ (eds.). *Ecoimmunology*, pp. 530-547. Oxford University Press. Nueva York, Estados Unidos.
- Quaye, I.K. 2008. Haptoglobin, inflammation and disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 102: 735-742.
- Qureshi, M.A. 1998. Role of macrophages in avian health and disease. *Poultry Science* 77: 978-982.
- Råberg, L., Sim, D., Read, A.F. 2007. Disentangling genetic variation for resistance and tolerance to infectious diseases in animals. *Science* 318: 812-814.
- Rank, R.G., Weidanz, W.P. 1976. Nonsterilizing immunity in avian malaria: An antibody-independent phenomenon. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 151: 257-259.
- Ricklefs, R.E., Sheldon, K.S. 2007. Malaria prevalence and white-blood-cell response to infection in a tropical and in a temperate thrush. *The Auk* 124: 1254.
- 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.
- Riera Romo, M., Pérez-Martínez, D., Castillo Ferrer, C. 2016. Innate immunity in vertebrates: An overview. *Immunology* 148: 125-139.
- Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. (eds.) 1998. *Immunology*, 5th ed. Mosby International, Londres. Reino Unido.
- Romano, A., Nodari, R., Bandi, C., Caprioli, M., Costanzo, A., Ambrosini, R., Rubolini, D., et al. 2019. Haemosporidian parasites depress breeding success and plumage coloration in female barn swallows *Hirundo rustica*. *Journal of Avian Biology* 50: .
- Salaberria, C., Muriel, J., De Luna, M., Gil, D., Puerta, M. 2013. The PHA test as an indicator of phagocytic activity in a passerine bird. *PLoS ONE* 8: 84108.
- Santiago-Alarcon, D., Palinauskas, V., Schaefer, H.M. 2012. Diptera vectors of avian Haemosporidian parasites: Untangling parasite life cycles and their taxonomy. *Biological Reviews* 87: 928-964.
- Schat, K.A., Kaspers, B., Kaiser, P. 2014 *Avian Immunology*, 2nd ed.; Academic Press: San Diego, CA, Estados Unidos.
- Schmid-Hempel, P. 2011. *Evolutionary parasitology: the integrated study of infections, immunology, ecology, and genetics*. Oxford University Press, Oxford, Reino Unido.
- Schoenle, L.A., Kernbach, M., Haussmann, M.F., Bonier, F., Moore, I.T. 2017. An experimental test of the physiological consequences of avian malaria infection Ardia, D. (ed.),. *Journal of Animal Ecology* 86: 1483-1496.
- Schoenle, L.A., Schoepf, I., Weinstein, N.M., Moore, I.T., Bonier, F. 2018. Higher plasma corticosterone is associated with reduced costs of infection in red-winged blackbirds. *General and Comparative Endocrinology* 256: 89-98.
- Schwarzer, E., Kühn, H., Valente, E., Arese, P. 2003. Malaria-parasitized erythrocytes and hemozoin nonenzymatically generate large amounts of hydroxy fatty acids that inhibit monocyte functions. *Blood* 101: 722-728.
- Seguin, M.C., Klotz, F.W., Schneider, I., Weir, J.P., Goodbary, M., Slayter, M., Raney, J.J., Anigolou, J.U., Green, S.J. 1994. Induction of nitric oxide synthase protects against malaria in mice exposed to irradiated *Plasmodium berghei* infected mosquitoes: involvement of interferon g and CD81 T cells. *Journal of Experimental Medicine* 180: 353-358.
- Sepil, I., Lachish, S., Hinks, A.E., Sheldon, B.C. 2013. Mhc supertypes confer both qualitative and quantitative resistance to avian malaria infections in a wild bird population. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280: 20130134.
- Sheldon, B.C., Verhulst, S. 1996. Ecological immunology - costly parasite defenses and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 317-321.
- Sild, E., Hōrak, P. 2009. Nitric oxide production: An easily measurable condition index for vertebrates. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 63: 959-966.
- Smits, J.E., Bortolotti, G.R., Tella, J.L. 1999. Simplifying the phytohaemagglutinin skin-testing technique in studies of avian immunocompetence. *Functional Ecology* 13: 567-572.
- Soares, L., Ellis, V.A., Ricklefs, R.E. 2016. Co-infections of haemosporidian and trypanosome parasites in a North American songbird. *Parasitology* 143: 1930-1938.

- Sorci, G. 2013. Immunity, resistance and tolerance in bird-parasite interactions. *Parasite Immunology* 35: 350-361.
- Sorci, G., Faivre, B. 2009. Inflammation and oxidative stress in vertebrate host-parasite systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364: 71-83.
- Stearns, S.C. 1992. *The evolution of life histories*. Oxford University Press, Oxford, Reino Unido.
- Sun, J., Zhang, X., Broderick, M., Fein, H. 2003. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using griess reaction assay. *Sensors* 3: 276-284.
- Swindle, E.J., Metcalfe, D.D. 2007. The role of reactive oxygen species and nitric oxide in mast cell-dependent inflammatory processes. *Immunological Reviews* 217: 186-205.
- Tella, J.L. 2002. The evolutionary transition to coloniality promotes higher blood parasitism in birds. *Journal of Evolutionary Biology* 15: 32-41.
- Tomás, G., Merino, S., Martínez, J., Moreno, J., Sanz, J.J., Martínez, J., Moreno, J., Sanz, J.J. 2005. Stress protein levels and blood parasite infection in blue tits (*Parus caeruleus*): a medication field experiment. *Annales Zoologici Fennici* 42: 45-56.
- Tomás, G., Merino, S., Moreno, J., Morales, J., Martínez-De La Puente, J. 2007. Impact of blood parasites on immunoglobulin level and parental effort: A medication field experiment on a wild passerine. *Functional Ecology* 21: 125-133.
- Vale, P.F., Salvaudon, L., Kaltz, O., Fellous, S. 2008. The role of the environment in the evolutionary ecology of host parasite interactions. Meeting report, Paris, 5th December, 2007. *Infection, Genetics and Evolution* 8: 302-305.
- Valkiūnas, G. 2005. *Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia*. CRC Press, Boca Raton, FL, Estados Unidos.
- Valkiūnas, G., Zickus, T., Shapoval, A.P., Iezhova, T.A. 2006. Effect of *Haemoproteus belopolnyi* (Haemosporida: Haemoproteidae) on body mass of the blackcap *Sylvia atricapilla*. *Journal of Parasitology* 92: 1123-1125.
- van de Crommenacker, J., Richardson, D.S., Koltz, A.M., Hutchings, K., Komdeur, J. 2012. Parasitic infection and oxidative status are associated and vary with breeding activity in the Seychelles warbler. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279: 1466-1476.
- van Riper, C., van Riper, S.G., Goff, M.L., Laird, M. 1986. The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaiian land birds. *Ecological Monographs* 56: 327-344.
- Videvall, E., Palinauskas, V., Valkiūnas, G., Hellgren, O. 2020. Host transcriptional responses to high- and low-virulent avian malaria parasites. *The American Naturalist* 195(6): 1070-1084.
- Vinkler, M., Schnitzer, J., Munclinger, P., Votýpka, J., Albrecht, T., Voty, J., Albrecht, T. 2010. Haematological health assessment in a passerine with extremely high proportion of basophils in peripheral blood. *Journal of Ornithology* 151: 841-849.
- Weatherhead, P.J., Bennett, G.F. 1992. Ecology of parasitism of brown-headed cowbirds by haematozoa. *Canadian Journal of Zoology* 70: 1-7.
- Webster, J.I., Sternberg, E.M. 2004. Role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, glucocorticoids and glucocorticoid receptors in toxic sequelae of exposure to bacterial and viral products. *Journal of Endocrinology* 181: 207-221.
- Westerdahl, H., Asghar, M., Hasselquist, D., Bensch, S. 2012. Quantitative disease resistance: To better understand parasite-mediated selection on major histocompatibility complex. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279: 577-584.
- White, N.J. 2018. Anaemia and malaria. *Malaria Journal* 17: 1-17.