



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA  
AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA:**

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE  
*Trypanosoma* spp. EN TRES FINCAS GANADERAS DEL CANTÓN CHONE,  
PROVINCIA DE MANABÍ, ECUADOR”

**AUTORA:**

MEDINA POZO, MICHELL LORENA

**DIRECTOR:**

PROAÑO PÉREZ, FREDDY Ph.D.

**SANGOLQUÍ**

**2018**



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**CERTIFICACIÓN**

Certifico que el trabajo de titulación, “**Caracterización molecular y análisis filogenético de *Trypanosoma* spp. en tres fincas ganaderas del Cantón Chone, Provincia de Manabí, Ecuador**”, fue realizado por la señorita **Medina Pozo, Michell Lorena** el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, Agosto 2018.

**Proaño Pérez, Freddy Ph.D.**

**DIRECTOR**

**C.C.: 1002081162**



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD**

Yo, Medina Pozo, Michell Lorena, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Caracterización molecular y análisis filogenético de *Trypanosoma* spp. en tres fincas ganaderas del Cantón Chone, Provincia de Manabí, Ecuador”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciado las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, Agosto 2018.

---

**MEDINA POZO, MICHELL LORENA**

C.C.: 1724592017



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, Medina Pozo, Michell Lorena, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas Espe publicar el trabajo de titulación: **“Caracterización molecular y análisis filogenético de *Trypanosoma* spp. en tres fincas ganaderas del Cantón Chone, Provincia de Manabí, Ecuador”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, Agosto 2018.

MEDINA POZO, MICHELL LORENA  
C.C.: 1724592017

## **DEDICATORIA**

A mis padres, Carlos y Fanny por ser un apoyo incondicional en cada etapa de mi vida, por creer en mí, por apoyarme en cada decisión que he tomado y por alentarme a seguir adelante hasta alcanzar mis metas.

Por su amor, su confianza, su dedicación, sus enseñanzas y todo su esfuerzo para convertirme en la persona que soy ahora y de la cual se sentirán muy orgullosos.

A mi hermana, Diana con quien he compartido grandes momentos y aunque hemos tenido dificultades, siempre ha estado para mí.

*Michell Lorena Medina Pozo*

## AGRADECIMIENTOS

Quiero empezar agradeciendo a Dios y a la Virgen Dolorosa, por haberme permitido concluir mis estudios universitarios, por ser un apoyo y una fortaleza en los momentos difíciles, permitiéndome superar los obstáculos presentados a lo largo de este camino.

Al Dr. Freddy Proaño, por haberme permitido realizar mi proyecto de titulación en el laboratorio de Biotecnología Animal, por la confianza brindada, su ayuda y tiempo durante el desarrollo de esta investigación.

Quiero agradecer de manera especial al Dr. Armando Reyna por toda su ayuda, colaboración científica, tiempo y dedicación en la realización de este proyecto. Por ser un gran guía y compartir conmigo sus conocimientos.

Les doy gracias a mis padres por ser un ejemplo de vida, por los valores inculcados, por todo su amor, su esfuerzo, su comprensión y paciencia desde el día que inicié este proceso hasta hoy que lo he finalizado.

A mi hermana, por ser parte importante de mi vida, por todo su cariño, su apoyo incondicional y por ser un ejemplo de vida profesional.

A mis amigos de la universidad, Dennys, Juan Sebastián, Cristina, Fernanda, Alex, Andrés L, Fernando, Stephanie, Andrés A, Anahí, Andrés J y Marissa con quienes pase inolvidables momentos e hicieron que esta etapa sea maravillosa, espero tenerlos en mi vida para siempre.

A mis amigas del colegio Katherine, Valeria y Marilyn, quienes han estado junto a mí en todo momento, me han apoyado siempre y de quienes he aprendido muchas cosas, gracias por su amistad sincera.

Dennys, gracias por compartir junto a mí esta bonita etapa, por apoyarme cuando más lo necesité y sobre todo por tu cariño. Espero lo mejor para ti.

Por último, quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio, en especial a Jimmy y Cristina por la ayuda brindada en la realización de este proyecto.

*Michell Lorena Medina Pozo*

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>CERTIFICACIÓN .....</b>	<b>i</b>
<b>DECLARACION DE RESPONSABILIDAD.....</b>	<b>ii</b>
<b>AUTORIZACIÓN.....</b>	<b>iii</b>
<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>iv</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>v</b>
<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTADO DE FIGURAS .....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTADO DE TABLAS .....</b>	<b>xii</b>
<b>LISTADO DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>xiii</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>xv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xvi</b>
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Formulación del problema .....	1
1.2 Justificación del problema.....	2
1.3 Objetivos de la investigación .....	5
1.3.1 Objetivo general .....	5
1.3.2 Objetivos específicos.....	5
<b>CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>6</b>



2.1 Generalidades .....	6
2.2 Morfología de <i>Trypanosoma vivax</i> .....	6
2.3 Clasificación taxonómica .....	8
2.4 Organización genómica.....	8
2.5 Marcadores moleculares para el estudio de <i>Trypanosoma vivax</i> . .....	9
2.6 Transmisión y ciclo biológico .....	10
2.7 Hospederos mamíferos .....	12
2.8 Origen y consideraciones epidemiológicas de <i>Trypanosoma vivax</i> .....	12
2.9 Sintomatología de tripanosomosis bovina.....	13
2.10 Métodos de diagnóstico.....	15
2.10.1 Pruebas parasitológicas .....	15
2.10.2 Pruebas serológicas .....	15
2.10.3 Pruebas moleculares .....	16
2.11 Tratamiento y control .....	20
2.12 Hipótesis .....	21
<b>CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
3.1 Participantes .....	22
3.2 Zona de estudio .....	22
3.2.1 Trabajo de campo .....	22

3.2.2 Trabajo de laboratorio .....	23
3.3 Duración de la investigación.....	23
<b>3.4 Metodología.....</b>	<b>23</b>
3.4.1 Extracción, procesamiento y conservación de muestras de sangre .....	23
3.4.2 Extracción de ADN a partir de sangre periférica .....	24
3.4.3 Cuantificación de ADN .....	25
3.4.4 Determinación de la integridad de ADN extraído.....	26
3.4.5 Identificación de muestras positivas a <i>Trypanosoma</i> spp. por PCR anidada.....	26
3.4.6 Clonación .....	28
3.4.7 Purificación del plásmido .....	30
3.4.8 Amplificación de plásmidos a través de PCR .....	32
3.4.9 Identificación de muestras positivas a <i>Trypanosoma vivax</i> por (TviCatL-PCR).....	32
3.4.10 Purificación de producto de PCR .....	34
3.4.11 Secuenciación.....	35
3.4.12 Ensamblaje de secuencias .....	36
3.4.13 Análisis de similitud y homología.....	36
3.4.14 Análisis filogenético.....	36
<b>CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>39</b>
4.1 Extracción y calidad de ADN.....	39

4.2 Evaluación de la presencia de diferentes especies de <i>Trypanosoma</i> spp. en muestras sanguíneas de bovinos.....	39
4.3 Obtención de colonias recombinantes y determinación de la presencia del fragmento de ADN clonado en plásmidos purificados.....	42
4.4 Análisis de similitud y homología de la secuencia amplificada por ITS-PCR .....	45
4.5 Identificación de <i>Trypanosoma vivax</i> mediante TviCatL-PCR .....	46
4.6 Análisis de similitud y homología de las secuencias amplificadas por TviCatL-PCR .....	49
4.7 Relaciones filogenéticas entre secuencias de cdCatL-like de diferentes aislados de América del Sur y África .....	52
4.8 Análisis filogenético entre secuencias de la región ITS y 5.8S de <i>Trypanosoma godfreyi</i> .....	55
<b>CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>58</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>60</b>

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diagrama de <i>Trypanosoma vivax</i> mostrando sus características morfológicas.....	7
<b>Figura 2.</b> Estructura de parte del locus del gen de ARN ribosómico.....	19
<b>Figura 3.</b> Representación esquemática del gen de catepsina L-like.....	20
<b>Figura 4.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, de los productos amplificados de la región ITS de <i>Trypanosoma</i> spp. por Nested PCR.....	41
<b>Figura 5.</b> Placas Petri con medio LBP suplementadas con X-gal e IPTG , de la muestra M2 clonada.....	43
<b>Figura 6.</b> Integridad del ADN plasmídico M2.. ..	44
<b>Figura 7.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, de los productos amplificados del ADN plasmídico de cada colonia.....	44
<b>Figura 8.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 2%, de los productos amplificados de la región CatL-like de <i>Trypanosoma vivax</i> .....	48
<b>Figura 9.</b> Neighbor-joining tree basado en el análisis de máxima verosimilitud de las secuencias del dominio catalítico de Catepsina L-Like (cdCatL-like) de aislados de <i>T.vivax</i> de América del sur y África. ....	53
<b>Figura 10.</b> Neighbor-joining tree basado en el análisis de máxima verosimilitud de las secuencias de la región ITS del ADNr de aislados de <i>T.godfreyi</i> . ....	56
<b>Figura 11.</b> Neighbor-joining tree basado en el análisis de máxima verosimilitud de las secuencias de la región 5.8s de los aislados de <i>T. godfreyi</i> , <i>T. vivax</i> , <i>T. theileri</i> y muestras de Ecuador.....	57

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> <i>Clasificación taxonómica de Trypanosoma spp.</i> .....	8
<b>Tabla 2.</b> <i>Fármacos utilizados para el tratamiento de Trypanosoma vivax</i> .....	20
<b>Tabla 3.</b> <i>Cebadores de la región ITS para Trypanosoma spp.</i> .....	26
<b>Tabla 4.</b> <i>Concentraciones y reactivos utilizados para la amplificación de la región ITS</i> .....	27
<b>Tabla 5.</b> <i>Condiciones para la reacción de PCR anidada</i> .....	27
<b>Tabla 6.</b> <i>Reactivos necesarios para la ligación</i> .....	29
<b>Tabla 7.</b> <i>Cebadores de la región CatL-like para Trypanosoma vivax</i> .....	32
<b>Tabla 8.</b> <i>Concentraciones y reactivos utilizados para la amplificación de la región CatL-Like</i> ..	33
<b>Tabla 9.</b> <i>Condiciones para la reacción de TviCatL-PCR</i> .....	33
<b>Tabla 10.</b> <i>Secuencias ITS de Trypanosoma godfreyi de los diferentes aislados empleados en este estudio y su origen geográfico</i> .....	37
<b>Tabla 11.</b> <i>Secuencias CatL-like de Trypanosoma vivax de los diferentes aislados, empleadas en este estudio y su origen geográfico</i> .....	38
<b>Tabla 12.</b> <i>Secuencia similar y homóloga de la base de datos de GenBank a la muestra M2 obtenida por ITS-PCR</i> .....	45
<b>Tabla 13.</b> <i>Secuencias similares y homólogas de la base de datos de GenBank a las muestras M5, 14, 17 obtenidas por TviCatL-PCR</i> .....	49

**LISTADO DE ABREVIATURAS**

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNk</b>	ADN mitocondrial
<b>ADNr</b>	ADN ribosomal
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNr</b>	ARN ribosomal
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Search Tool
<b>bp</b>	Pares de bases
<b>CatL-like</b>	Cisteína proteasa catepsina L-like
<b>cdCatL-like</b>	Dominio catalítico catepsina L-like
<b>CN</b>	Control negativo
<b>CP</b>	Control positivo
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfato
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>ELISAI</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas indirecto
<b>IFAT</b>	Prueba indirecta de anticuerpos inmunofluorescentes
<b>ITS</b>	Espaciadores transcritos internos
<b>ITS-PCR</b>	PCR para la amplificación de la región ITS
<b>Kg</b>	Kilogramos
<b>LAMP</b>	Amplificación Isotérmica mediada por Lazo
<b>LSU</b>	Subunidad grande del ARNr
<b>M</b>	Muestra

<b>mA</b>	Miliamperios
<b>Medio LB</b>	Medio Luria -Bertani
<b>mg</b>	Miligramo
<b>mL</b>	Mililitros
<b>mM</b>	Milimolar
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>ng</b>	Nanogramos
<b>nL</b>	Nanolitros
<b>nm</b>	Nanometros
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>RCF</b>	Fuerza centrífuga relativa
<b>RFLP</b>	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
<b>SSU</b>	Subunidad pequeña del ARNr
<b>TviCatL-PCR</b>	PCR para la amplificación de Catepsina L-Like
<b>U</b>	Unidades
<b>μL</b>	Microlitros
<b>μM</b>	Micromolar
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>V</b>	Voltios

## RESUMEN

La tripanosomosis animal es una enfermedad hemoparasitaria de alto impacto económico y representa un obstáculo para la producción ganadera debido a las pérdidas producidas por la clínica presentada, incluso, si los animales no son tratados adecuadamente pueden morir durante la etapa aguda de la enfermedad. En el Ecuador se ha evidenciado brotes de esta enfermedad, por lo que en este proyecto se planteó caracterizar el agente causal mediante técnicas moleculares altamente sensibles y específicas. Para lograr este objetivo, se recolectaron un total de 21 muestras de sangre periférica de bovinos con síntomas compatibles con tripanosomosis bovina, del cantón Chone. Estas muestras fueron analizadas mediante ITS-PCR capaz de discriminar las especies de tripanosoma según el tamaño de fragmento amplificado y TviCatL-PCR que amplifica una región exclusiva del ADN genómico de *T. vivax*. El diagnóstico se confirmó a través de secuenciación y análisis de similitud y homología mediante la herramienta BLAST, obteniendo 3 muestras con un 100% de homología con *T. vivax* y 1 muestra con un 91 % de similitud a *T. godfreyi*. Con las secuencias obtenidas en este estudio y aquellas disponibles en Genbank, se establecieron relaciones filogenéticas, que sugieren una estrecha relación de los aislados ecuatorianos de *T. vivax* con los de Sudamérica y África occidental. Por último, esta investigación reporta por primera vez la presencia de *Trypanosoma vivax* en el Ecuador y se asocia con un brote de tripanosomosis bovina, lo que representa un nuevo enfoque en el estudio de este tripanosomatidio en el territorio nacional.

### Palabras claves:

- *Trypanosoma vivax*
- ITS
- CATEPSINA L



## ABSTRACT

Animal trypanosomosis is a hemoparasitic disease with a high economic impact and represents an obstacle to livestock production worldwide, due to the losses it produces by the clinical presentation. Animals can even death during the acute stage of the parasitosis, if the disease is not treated properly. In Ecuador, an outbreak of trypanosomosis has been observed, so the aim of this project was characterized the causal agent using highly sensitive and specific molecular techniques. To achieve this objective, a total of 21 samples of peripheral blood from cattle with compatible symptoms of bovine trypanosomosis from Chone canton were collected. Samples were analyzed by ITS-PCR capable to discriminate trypanosome species according to the size of the amplified fragment and TviCatL-PCR that amplifies a region exclusive of *T. vivax* genomic DNA. The diagnosis was confirmed through sequencing and analysis of similarity and homology using BLAST tool, obtaining as a result 3 samples with 100% homology with *T. vivax* and 1 sample with 91% similarity to *T. godfreyi*. Phylogenetic relationships were established by the maximum likelihood method, using the obtained sequences, that suggest a close relationship of the Ecuadorian isolates of *T. vivax* with those of South America and West Africa. Finally, this research reports for the first time the presence of *Trypanosoma vivax* in Ecuador and it's associated with an outbreak of bovine trypanosomosis; therefore, it represents a new approach in the study of this trypanosomatid at national level.

### Key words:

- *Trypanosoma vivax*
- ITS
- CATHEPSIN L

## CAPÍTULO 1

### INTRODUCCIÓN

#### 1.1 Formulación del problema

La tripanosomosis animal es una enfermedad causada por parásitos del género tripanosoma, caracterizada principalmente por fiebre y anemia. Esta hemoparasitosis tiene una distribución en todas las zonas tropicales y subtropicales del mundo afectando a casi todos los animales mamíferos, incluyendo el hombre (Desquesnes, 2004; Gonzatti et al., 2014; OIE, 2008).

Esta enfermedad fue descrita por primera vez en el continente africano donde se determinó que la distribución geográfica de los tripanosomas está estrechamente relacionada con la distribución de la mosca tse-tsé en África, afectando a 48 millones de bovinos en un área de 10 millones Km<sup>2</sup> en 37 países. Sin embargo, algunas especies africanas de tripanosoma como *T. vivax*, *T. equiperdum* y *T. evansi*, se propagaron fuera del cinturón de mosca *Glossina* (tse-tsé) en África, debido a su adaptación a otras moscas hematófagas como el tábano (Greif et al., 2015), este hecho, aunado al desplazamiento de animales de zonas endémicas a zonas libres de la enfermedad, ha ampliado mundialmente la distribución de estos hemoflagelados (Gonzatti et al., 2014).

El primer reporte de esta enfermedad en América fue en el año 1919, por Leger y Vienne quienes describieron una epizootia de tripanosomosis bovina en la Guayana Francesa cerca de Cayena, a partir de este año los tripanosomas se establecieron permanentemente en toda América del Sur, reportándose la presencia de *T. vivax* por primera vez en Venezuela en el año de 1920 y

en la costa atlántica de Colombia en 1931 debido a la importación de ganado venezolano. Años más tarde en 1944, se descubrió que el parásito también estaba presente en el noreste de Brasil, en el estado de Pará y en la isla de Marajo. Además, en 1977 se reportó la presencia del parásito en Perú, El Salvador, Ecuador, Paraguay y Costa Rica (Wells et al., 1977). Mas recientemente en Argentina, *T. vivax* se reportó por primera vez a finales del año 2006 mediante frotis finos de sangre de bovinos, pertenecientes a la provincia de Formosa (Monzón et al. 2013).

En el Ecuador la información disponible sobre tripanosomosis bovina es poco consistente, según la (OIE, 2017) no hay reportes sobre la presencia de esta enfermedad en el país. Sin embargo, se han realizado diferentes estudios que demuestran la prevalencia de *T. vivax*, *T. evansi* y *T. theileri* en Ecuador (Cholota, 2017; González, 2016; Medina et al., 2017; Rodríguez, 2017).

Por lo tanto, la presente investigación se enfoca en la identificación de la especie de *Trypanosoma* spp. circulante en un brote de tripanosomosis bovina reportado en el cantón Chone en la provincia de Manabí, mediante la secuenciación de los Espaciadores Transcritos Internos (ITS) del ARN ribosomal y del dominio catalítico de catepsina L-like de los parásitos

## **1.2 Justificación del problema**

En el mes de noviembre de 2017 en Chone, provincia de Manabí, se reportó la muerte de aproximadamente 600 reses, este incidente se vinculó a la presencia de tábanos en la zona y se presume que esta mosca está transmitiendo de manera mecánica *Trypanosoma* spp. (El Universo, 2017).

Esta enfermedad afecta al desarrollo agropecuario de extensas zonas ganaderas en África y América del Sur, por lo general es de evolución crónica, pero si no es tratada de forma eficiente puede conducir a la muerte del animal. En su forma aguda, produce cuadros clínicos con fiebre, edema, adenitis, trastornos nerviosos, anemia, aborto, palidez de las mucosas y disminución tanto de masa corporal como de producción de leche (Cassalett et al., 2006; FAO, 1983).

El diagnóstico de la tripanosomosis bovina en la actualidad, se realiza mediante la aplicación de una diversidad de métodos que incluyen pruebas clínicas, parasitológicas, serológicas y moleculares. Los diagnósticos clínico y parasitológico presentan baja sensibilidad durante la etapa crónica, sin embargo, son los más utilizados para trabajo en campo ya que son altamente específicos en la fase aguda de la enfermedad. El primero consiste en la observación de los signos clínicos descritos anteriormente; el segundo se basa en pruebas como observación microscópica y prueba de Woo, cuyo límite de detección es  $10^3$  parásitos/mL. Estas pruebas presentan limitaciones importantes ya que no permiten detectar la presencia del parásito en la fase crónica, donde los niveles de la parasitemia son muy bajos, además los signos clínicos pueden confundirse con los producidos por otras enfermedades causadas por parásitos hemotrópicos como la babesiosis y anaplasmosis (Cassalett et al., 2006; Gonzatti et al., 2014).

Las pruebas serológicas mayormente utilizadas son ELISAI y prueba indirecta de anticuerpos inmunofluorescentes (IFAT), estas permiten determinar la presencia de anticuerpos contra *Trypanosoma* spp., en las fases agudas y crónicas de la enfermedad, ofreciendo una mayor sensibilidad que las pruebas parasitológicas y clínicas; sin embargo, al igual que las anteriores, no permiten diferenciar si existe una infección mixta con diferentes especies de *Trypanosoma* spp. o la especie causante de la enfermedad (Gonzatti et al., 2014). Por otro lado, las técnicas

moleculares que involucran el ADN del parásito, como la PCR y LAMP, son pruebas con una alta sensibilidad y especificidad que detectan un número bajo de parásitos (25 parásitos/ml), tanto a nivel del vector como en el hospedero. Además, permiten obtener un mosaico de secuencias altamente conservadas, para la diferenciación y caracterización especie específico del parásito (Biteau, et al., 2000).

Como se puede evidenciar, es necesario realizar un diagnóstico adecuado, mediante una técnica molecular eficiente de la especie *Trypanosoma* spp., para el estudio del brote epidémico producido en la parroquia Convento del cantón Chone, tomando en consideración que Manabí es la provincia con mayor uso de suelo en producción ganadera, y Chone el cantón con mayor número de reses de la provincia, con unas 260.000 cabezas de ganado, destinadas tanto a la producción de leche como de carne.

### **1.3 Objetivos de la investigación**

#### **1.3.1 Objetivo general**

Caracterizar *Trypanosoma* spp. utilizando técnicas moleculares en muestras sanguíneas de bovinos de tres fincas ganaderas del Cantón Chone, Provincia de Manabí, Ecuador

#### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Identificar la presencia de *Trypanosoma* spp. en muestras sanguíneas de bovinos sometidas a la prueba de PCR anidada.
- Secuenciar la región ITS, de muestras positivas a la prueba de PCR anidada.
- Realizar un análisis filogenético de las especies de *Trypanosoma* spp. encontradas.

## CAPÍTULO 2

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Generalidades

La tripanosomosis animal se define como un conjunto de enfermedades hemoparasitarias complejas, generalmente de curso crónico, causadas por diferentes parásitos del género *Trypanosoma*, los cuales se multiplican en su hospedero (Desquesnes, 2004; Monzón et al., 2013).

Los tripanosomas patógenos de importancia veterinaria presente en América Latina son *T. vivax* (subgénero *Duttonella*), *T. evansi* y *T. equiperdum* (subgénero *Trypanozoon*) de la sección salivaria y *T. theileri* (subgénero *Megatrypanum*) de la sección stercoraria (Desquesnes 2004).

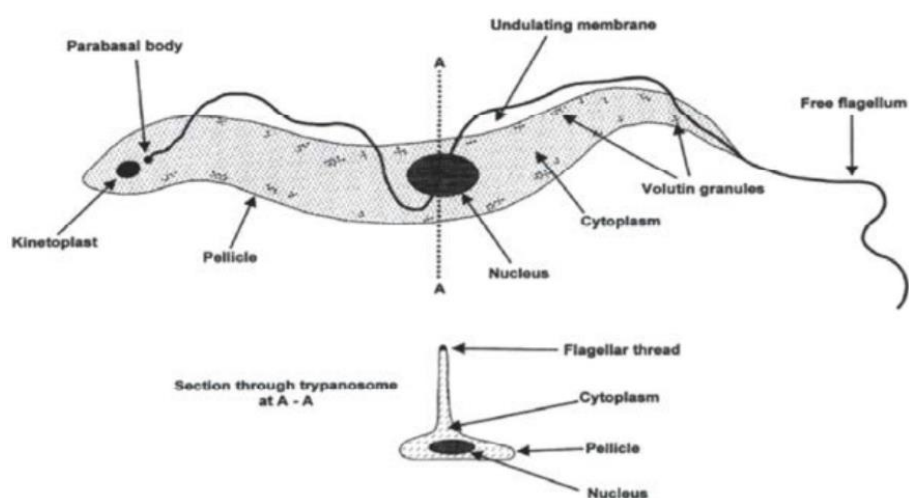
*T. equiperdum* y *T. evansi* han sido descritos como los agentes etiológicos de las enfermedades Dourina y surra (derrengadera en Latinoamérica) respectivamente, que afectan a los equinos principalmente. Si embargo, el ganado bovino igualmente puede ser afectado por *T. evansi*, sin mayores daños a su salud al igual que por *T. theileri*; no obstante, *T. vivax* presenta una mayor patogenicidad y ocasiona una enfermedad crónica conocida como "secadera, cachera, cacho hueco o huequera", que genera una disminución de la producción e incluso la muerte de varios animales en brotes epizooticos (Desquesnes, 2004).

#### 2.2 Morfología de *Trypanosoma vivax*

Las especies del subgénero *Duttonella* se caracterizan por tener una membrana ondulada de desarrollo medio, un flagelo libre y un cinetoplasto grande el cual constituye un rasgo de

diagnóstico valioso, ya que facilita la identificación en frotis sanguíneos y su diferenciación con *T. evansi*. (Osório et al., 2008).

*Trypanosoma vivax* es un protozooario monomórfico (esbelto) con un tamaño que oscila entre 18 y 31  $\mu\text{m}$ , con un flagelo libre y terminal de 3 a 6  $\mu\text{m}$  de largo, el cual está unido al parásito por una membrana ondulante menos desarrollada que la de *T. brucei* y *T. evansi*. El núcleo, ya sea redondeado o alargado, dependiendo del aislado, se encuentra en la parte media del parásito y tiene un cinetoplasto prominente de 1,1  $\mu\text{m}$  ubicado cerca o en el extremo posterior de *T. vivax*, el cual es redondeado (Gonzatti et al., 2014).



**Figura 1.** Diagrama de *Trypanosoma vivax* mostrando sus características morfológicas  
Fuente:(Uilenberg & Boyt, 1998)



## 2.3 Clasificación taxonómica

El género *Trypanosoma* pertenece a la rama protozoaria, orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae. En la Tabla 1 se detalla la taxonomía de los tripanosomas de importancia veterinaria tanto de la sección Salivaria como Stercoraria.

**Tabla 1**

*Clasificación taxonómica de Trypanosoma spp.*

Clasificación taxonómica				
<b>Subreino</b>	Protozoo			
<b>Filo</b>	Sarcomastigophora			
<b>Subfilo</b>	Mastigophora			
<b>Clase</b>	Zoomastigophorea			
<b>Orden</b>	Kinetoplastida			
<b>Suborden</b>	Trypanosomatina			
<b>Familia</b>	Trypanosomatidae			
<b>Género</b>	<i>Trypanosoma</i>			
<b>Subgénero</b>	<i>Duttonella</i>	<i>Trypanozoon</i>	<i>Trypanozoon</i>	<i>Megatrypanum</i>
<b>Especie</b>	<i>Trypanosoma vivax</i>	<i>Trypanosoma equiperdum</i>	<i>Trypanosoma evansi</i>	<i>Trypanosoma theileri</i>

Fuente: (Desquesnes, 2004)

## 2.4 Organización genómica

El material genómico del tripanosoma está dividido en ADN nuclear y ADN mitocondrial (ADNk) el cual se encuentra contenido en el cinetoplasto. El ADNk, está organizado en dos tipos de estructuras circulares concatenadas, los maxicírculos y los minicírculos.

Según (Maudlin et al., 2004), los maxicírculos codifican a genes mitocondriales encargados de la producción de energía, necesarios para el desarrollo y diferenciación del

tripanosoma en el vector (*Glossina* spp). Mientras que los minicírculos codifican ARN que permite la edición de los maxicírculos (Simpson et al., 2000).

El ADNk varía considerablemente entre especies, puede contener de 5-50  $\times 10^3$  minicírculos y de 20-50 maxicírculos (Gonzatti et al., 2014). Según Masiga (1990) citado por (Yurchenko, V. Yu.; Kolesnikov, 2001), *T. vivax* contiene los minicírculos más pequeños (465bp) y los maxicírculos más grandes (40kbp). Recientemente, Greif et al., (2015), secuenciaron completamente el ADNk, encontrando que los aislados latinoamericanos presentaron deleciones que impiden la edición de varios genes que participan en la respiración oxidativa del parásito. Igualmente se encontraron 56 minicírculos diferentes (muchos de ellos con más de una repetición) con tamaños variables de 300 a 600bp (Greif et al., 2015).

## **2.5 Marcadores moleculares para el estudio de *Trypanosoma vivax*.**

Para estudios de diversidad genética y relación filogenética de *T. vivax* con otros tripanosomas africanos se han utilizado varios marcadores moleculares, los cuales están presentes en un alto número de copias en el genoma de los tripanosomatidios; ya que mientras más copias de la secuencia target, mayores son las posibilidades de amplificación por PCR (Desquesnes & Dávila, 2002).

Se han utilizado los ADN satélites contenidos en los minicromosomas del ADN nuclear para el desarrollo de cebadores específicos de especie (*T. vivax*, *T. evansi* y *T. simiae*), los cuales demostraron ser capaces de detectar cantidades muy pequeñas de ADN del parásito (Desquesnes & Dávila, 2002).

Los espaciadores transcritos internos (ITS) de ADN ribosomal (ADNr); han permitido un diagnóstico específico de varias especies de *Trypanosoma* spp. en una única PCR. El ADN nuclear lleva los genes que codifican el ARNr, los cuales están conformados por unidades transcripcionales (la subunidad pequeña 18S, 5.8S y subunidad grande 28S) separadas por espaciadores no transcritos (ITS1 e ITS2) (Figura 2) (Desquesnes & Dávila, 2002).

Otro marcador molecular que se ha utilizado con éxito en los estudios de diversidad genética y relaciones filogenéticas es el gen que codifica la cisteína proteasa Catepsina L (CatL-like) perteneciente al clan CA, familia C1, codificada por una familia de genes multicopia organizada como una matriz en tándem. Estas peptidasas del cinetoplasto comprenden típicamente un péptido señal, un pro péptido un dominio catalítico y una extensión C-terminal altamente inmunogénica aunque de función desconocida (Figura 3) (Eyssen et al., 2018)

## **2.6 Transmisión y ciclo biológico**

La transmisión de *Trypanosoma* spp. dependerá de dos factores: la ubicación geográfica y la especie. Principalmente se han determinado dos tipos: la transmisión biológica o cíclica por moscas *Glossina* (tse-tsé) y la mecánica mediante los insectos hematófagos Tabánidos y *Stomoxys* spp. (Desquesnes, 2004).

Sin embargo, se ha demostrado otros tipos de transmisión como la iatrogénica, mediante jeringas durante la vacunación; venérea en el caso de *T. equiperdum*, el cual se transmite al pasar a través de la mucosa genital durante el coito o mediante las membranas mucosas del ojo y la nariz. La transmisión vía transplacentaria que puede ser muy importante en la epidemiología de la tripanosomosis en América Latina ya que la descendencia de animales portadores subclínicos

puede hacer que la enfermedad reaparezca en rebaños que han regresado al estado de no infectado (Desquesnes, 2004).

*Trypanosoma vivax* presenta una transmisión esencialmente cíclica en África, mediante varias especies de moscas del género *Glossina* (tse-tsé); en estas, los *T. vivax* se anclan a la probóscide de la mosca donde el parásito se transforma de la fase tripomastigote a epimastigote, se multiplica y finalmente se diferencia en formas metacíclicas infecciosas (Jackson et al., 2015).

Tanto en América central y del sur como en África, *T. vivax* puede transmitirse de manera mecánica, en la cual los procesos de diferenciación y multiplicación ocurren en el huésped vertebrado y no en el vector. Los vectores responsables de una transmisión mecánica exitosa son varias especies de *Stomoxys* spp., en particular la subespecie *Stomoxys nigra*, y varias especies de tabánidos americanos: *Tabanus importunus*, *T. nebulosus* y *Cryptotylus unicolor* (Desquesnes, 2004; Gonzatti et al., 2014).

Los tabánidos pueden mantener de 1 a 12 nL de sangre infectada en sus piezas bucales donde los parásitos tienen un tiempo de supervivencia limitado, por lo que una transferencia inmediata a un segundo huésped es necesaria para una transmisión mecánica favorable, sin embargo esto no siempre es posible ya que en el campo los vectores muerden al mismo huésped varias veces y se ha demostrado que solo del 2 al 3% de los tábanos alcanza un segundo huésped en 10 minutos (Foil, 1989).

La capacidad de transmisión de *T. vivax* tanto cíclica como mecánica podría permitir la coexistencia de ambas formas de transmisión en la misma área, el mismo huésped y, quizás, en el mismo vector (Desquesnes et al., 2009).

## 2.7 Hospederos mamíferos

Las especies de tripanosomas patógenos descritos anteriormente tienen afinidad a diferentes hospederos de importancia económica en América latina.

*T. evansi*, afecta principalmente a caballos, burros, mulas, gatos, perros y búfalos de agua; esta especie también puede infectar ovejas, cabras y ganado vacuno pero estos últimos generalmente son portadores asintomáticos; sin embargo, se han demostrado algunas cepas virulentas en el ganado vacuno (Desquesnes, 2004).

*T. vivax* se encuentra regularmente en bovinos (*Bos indicus* y *Bos taurus*), ovinos, caprinos y búfalos de agua. Aunque se ha descrito en otros hospedadores como jirafas en África o en equinos en América (Gonzatti et al., 2014).

*T. equiperdum* naturalmente infecta solo a los equinos y *T. theileri* ha sido descrito solo en ganado y búfalos de agua (Desquesnes, 2004).

## 2.8 Origen y consideraciones epidemiológicas de *Trypanosoma vivax*

*T. vivax* tiene su origen en África donde afecta a 37 países, con una población de 48 millones de bovinos (Desquesnes et al., 2013). Esta especie logró adaptarse a nuevas formas de transmisión, vectores y hospedadores, lo que le permitió diseminarse entre animales domésticos y silvestres nunca expuestos al mismo, por ello, actualmente se encuentra distribuido en el Oriente y Occidente de África y en América del Centro y Sur (Desquesnes, 2004; Garcia et al., 2007).

Los estudios filogenéticos apoyan la teoría de que *T. vivax* ingresó al Nuevo mundo en ganado infectado de África Occidental, originando la fase aguda de la enfermedad y una alta

mortalidad (Desquesnes & Dávila, 2002; Osório et al., 2008). No obstante, los animales que eran sometidos a constantes reinfecciones por la presencia de los vectores, fueron desarrollando inmunidad ante este parásito, convirtiendo a las áreas donde se encontraban en zonas endémicas (Osório et al., 2008).

En las zonas endémicas los animales se mantienen en fase crónica de la enfermedad, es decir no presentan signos clínicos y su salud no se ve afectada, aunque la producción disminuye levemente. Sin embargo, en estas zonas diferentes factores de estrés tanto del animal como ambientales son de gran importancia epidemiológica en la prevalencia y en la severidad de las manifestaciones clínicas (García et al., 2007).

## **2.9 Sintomatología de tripanosomosis bovina**

Los signos clínicos que se presentan en el ganado bovino dependen de tres diferentes periodos descritos para la enfermedad causada por el parásito *Trypanosoma vivax*.

**Periodo prepatente:** En esta etapa no existen manifestaciones clínicas de la enfermedad, es el periodo en el que el parásito es inoculado por el vector hasta que son detectados en la sangre del animal o se comienzan a presentar los signos clínicos. Esta etapa tiene un rango de tiempo de duración de 2 a 10 días, y depende de la carga de parásitos del inoculo y de la virulencia del aislado (Gonzatti et al., 2014).

**Periodo agudo:** Este periodo inicia cuando los parásitos aparecen en la sangre del hospedero, y se presentan los primeros signos y síntomas de la enfermedad, los cuales pueden

ser el incremento de la temperatura y la anemia moderada o grave debido al descenso de eritrocitos en circulación (Osório et al., 2008).

Los animales afectados también sufren trastornos reproductivos severos; en los machos la espermatogénesis se inhibe, existe degeneración testicular y epididimal que conduce a la infertilidad o incluso a la esterilidad; en las hembras los genitales sufren lesiones severas, los ciclos de estro son anormales, se presenta anestro transitorio o permanente y aumenta la cantidad de abortos (Adamu et al., 2007; Betancur et al., 2016; Sekoni, 1994).

Otros signos característicos de este periodo son lagrimeo, edema submandibular, descargas nasales, pérdida progresiva de peso, letargo y disminución de la producción de leche, palidez de las membranas mucosas e inflamación de ganglios linfáticos (Osório et al., 2008).

Un porcentaje variable de los animales afectados morirá durante este período que dura aproximadamente de 2 a 3 meses; esto dependerá de la patogenicidad de la cepa de *T. vivax*, el estado de estrés y la raza del bovino (Desquesnes, 2004; Osório et al., 2008).

**Periodo crónico** Los animales que sobreviven la fase aguda de la enfermedad, mantienen una parasitemia críptica, empiezan a recuperar los niveles normales de eritrocitos en sangre y no se puede percibir síntomas; sin embargo si el animal es sometido a factores de estrés es probable que la parasitemia se incremente y los signos clínicos descritos en el periodo agudo surjan (Gonzatti et al., 2014).

Este compendio de signos son los responsables de aumentar los costos de producción a través de una mayor necesidad de tratamiento y atención veterinaria. Las implicaciones

económicas de la tripanosomosis en regiones subtropicales en desarrollo ponen de relieve el valor de la investigación que cubre la patogénesis de *T. vivax* (Salas et al., 2017).

## **2.10 Métodos de diagnóstico**

El control y la gestión eficaz de la enfermedad dependen en gran medida del conocimiento de su epidemiología, que a su vez se basa en métodos de diagnóstico eficientes. Para la detección de estos parásitos se usa un conjunto de pruebas parasitológicas, serológicas y moleculares las cuales varían en su sensibilidad y especificidad. La elección de una prueba correcta depende de factores económicos, experiencia, requisito y necesidad (OIE, 2008).

### **2.10.1 Pruebas parasitológicas**

Estas pruebas resultan las más útiles para utilizarlas en el campo cuando se presenta la fase aguda de la enfermedad, ya que son altamente específicas, además ofrecen otras ventajas como un corto tiempo de procesamiento, bajos costos, la obtención inmediata de un resultado y la facilidad de determinar a su vez el grado de anemia del animal (Gonzatti et al., 2014). Dentro de estas podemos encontrar la prueba de woo que se basa en la separación de los diferentes componentes de la muestra de sangre en función de su gravedad específica; la examinación microscópica directa y la prueba de capa leucocitaria (OIE, 2008).

### **2.10.2 Pruebas serológicas**

Las pruebas serológicas son altamente sensibles ya que permiten diagnosticar animales tanto en la fase aguda como crónica de la enfermedad, además pueden ser aplicadas a un gran número de muestras y se utilizan para determinar la seroprevalencia de la tripanosomosis (Reyna



1998). Las técnicas más utilizadas son ELISA y Ensayo de inmunofluorescencia indirecto (IFAT) (Desquesnes, 2004).

El ELISAi es utilizado para la detección de tripanosomosis animal usando antígenos crudos de *T. evansi* y *T. vivax*. Sin embargo, debido a la reactividad cruzada entre ellos a nivel serológico, y al menor costo de producción del antígeno *T. evansi*, este es utilizado con mayor frecuencia para identificar indiferenciadamente *T. vivax* o *T. evansi* en el ganado, esto constituye una desventaja en zonas donde coexisten los dos parásitos, ya que la prueba se vuelve inespecífica y tanto la gravedad como el tratamiento dependen de la especie de tripanosoma (Reyna-Bello et al., 1998).

### **2.10.3 Pruebas moleculares**

Los métodos moleculares se basan en la detección de un segmento de ADN específico capaces de identificar una o varias especies que están presentes en las poblaciones de huéspedes y/o vectores, por lo tanto proporcionan un diagnóstico específico de especie de infecciones activas y crónicas causadas por tripanosomas (Desquesnes, 2004).

Se han desarrollado diferentes técnicas para la detección de especies de *Trypanosoma* spp., por métodos moleculares estos incluyen pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y Amplificación Isotérmica mediada por Lazo (LAMP) (Geysen et al., 2003; Laohasinnarong et al., 2011)

### 2.10.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es una reacción enzimática *in vitro* que sintetiza nuevas cadenas de ADN complementarias a la cadena molde. Para que se produzca la reacción es necesario el uso de la enzima termoestable ADN polimerasa, la cual tiene capacidad de polimerizar ácidos nucleicos; cebadores que se encargan de delinear la región específica de la secuencia de interés que se desea amplificar; y también dNTPs, MgCl<sub>2</sub> y un tampón apropiado (Tamay et al., 2013). La mezcla de todos los componentes se somete a ciclos de calor los cuales se comprenden de tres fases: Desnaturalización, donde las dobles hélices de ADN se abren; Hibridación donde los oligonucleótidos se unen a la secuencia complementaria de ADN matricial, y la fase de Extensión durante la cual los ácidos nucleicos se polimerizan. Los productos obtenidos en las fases iniciales de PCR sirven como matriz para las polimerizaciones posteriores, repitiendo este ciclo aproximadamente 30 veces donde al final se han sintetizado muchas porciones de ADN con pesos y secuencias idénticas (Desquesnes, 2004). Una vez terminado el proceso de amplificación por PCR los amplicones obtenidos son visualizados por electroforesis y si el tamaño del fragmento amplificado es el teórico (según los cebadores forward y reverse utilizados), la prueba es positiva (Tamay et al., 2013).

Para el diagnóstico de *Trypanosoma* spp. por PCR se han utilizado diferentes secuencias como marcadores moleculares, y se han desarrollado cebadores sensibles a especies específicas. Algunos de los marcadores moleculares utilizados incluyen un antígeno específico reconocido por el anticuerpo monoclonal Tv27, satélites, microsátélites, spliced leader; espaciadores transcritos internos del ADN ribosomal (Gonzatti et al., 2014) y genes de catepsina L-Like (Cortez et al., 2009).

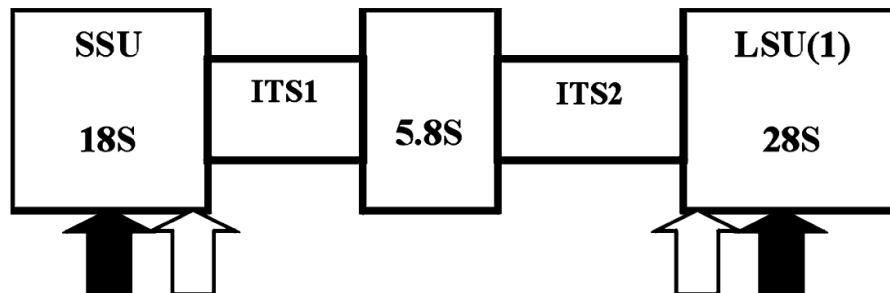
Esta prueba presenta una alta sensibilidad y especificidad ya que permite detectar de 1 a 10 tripanosomas/ml de sangre, y reconoce la especie específica causante de la infección en contraste con las pruebas serológicas actualmente utilizadas (Solano et al., 1999).

### **PCR para la amplificación de los ITS del ADNr**

Para la amplificación de los espaciadores transcritos internos (ITS 1 y 2), se diseñó una PCR anidada, la cual es una modificación de la PCR convencional que mejora tanto la sensibilidad como la especificidad ya que utiliza 2 sets de cebadores y 2 reacciones de PCR sucesivas (ThermoFisher, n.d.).

Los cebadores externos (ITS 1 y 2) en la primera reacción de PCR delimitan una secuencia extensa de ADN diana que contiene el amplicón de interés, entonces el segundo set de cebadores (ITS 3 y 4) amplifican la secuencia específica corta de los amplicones de la primera reacción, obteniendo fragmentos de 600 a 1200 pb con lo que se puede discriminar entre una especie y otra (Cox et al., 2005).

Esta técnica se desarrolló para reconocer varias especies de tripanosomas africanos a la vez, disminuyendo así los costos de esta prueba que suelen ser muy elevados al necesitar una PCR para cada especie de tripanosoma (Cox et al., 2005).

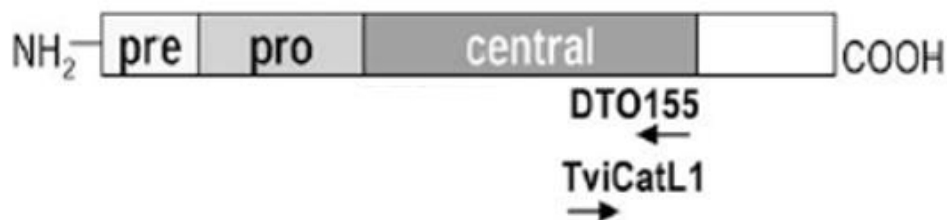


**Figura 2.** Estructura de parte del locus del gen de ARN ribosómico. Nota: Cada gen tiene regiones codificantes conservadas SSU, LSU y regiones espaciadoras no codificantes (ITS 1 y 2). Los cebadores externos (ITS1 e ITS2) están representados por flechas negras y los cebadores internos (ITS3 e ITS4) por flechas blancas

### **PCR para la amplificación de Catepsina L-Like (TviCatL-PCR)**

Las cisteínas proteasas de CatL-Like poseen secuencias correspondientes al dominio catalítico conservadas y divergentes entre las especies de tripanosoma, por lo que son objetivos útiles para el diagnóstico de infecciones por tripanosomas y para estudios genéticos poblacionales (Cortez et al., 2009; Adriana C. Rodríguez et al., 2010).

Basado en este principio Cortez y colaboradores (2009), desarrollaron una PCR convencional altamente sensible y específica para la amplificación de una región de 177bp exclusivamente del ADN genómico de *T. vivax* utilizando los cebadores TviCatL1 y DTO 155.



**Figura 3.** Representación esquemática del gen de cathepsina L-like.  
Nota: Dominios catalíticos pre, pro y centrales además de los cebadores empleados para la amplificación por PCR de secuencias que codifican los dominios catalíticos de tripanosoma.

## 2.11 Tratamiento y control

Un control eficaz de la tripanosomosis animal, consiste en restringir el movimiento de animales enfermos, tratamiento a los animales infectados y control de vectores (Dagnachew & Bezie, 2015).

Existen dos fármacos comunes para el tratamiento de tripanosomosis bovina causada por *T. vivax*, los cuales se detallan en la Tabla 2, con la vía de administración y la dosificación adecuada para control y prevención de la enfermedad.

**Tabla 2**

*Fármacos utilizados para el tratamiento de Trypanosoma vivax.*

Nombre genérico	Nombre comercial	Dosis		Vía de administración
		Preventiva	Curativa	
Aceturato de diminazeno	Berenil®, Ganaseg®, Trypazen®, Veriben®	3.3 mg/kg	7 mg/kg	Intramuscular
Cloruro de isometamidio	Samorin®, Trypamidium®	-	1 mg/kg	Intramuscular

Fuente: (Dagnachew & Bezie, 2015).

Para un tratamiento satisfactorio es necesaria la administración correcta a la dosis establecida de los tripanocidas debido a que su uso indiscriminado causa resistencia a los medicamentos en algunos aislados de *T. vivax*. También es necesario un adecuado plan de nutrición y el reposo durante la convalecencia de la enfermedad, ya que los animales bien descansados y bien alimentados se recuperan más rápidamente después de la terapia tripanocida (Osório et al., 2008).

## **2.12 Hipótesis**

Basado en los antecedentes antes expuestos el proyecto de investigación plantea la siguiente hipótesis:

La prueba de PCR anidada permite detectar *Trypanosoma* spp. en muestras de sangre de ganado bovino.

## CAPÍTULO 3

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Participantes

El presente proyecto de investigación fue financiado por el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE

La responsable a cargo del desarrollo de la investigación es la señorita Michell Lorena Medina Pozo, egresada de la carrera de Ingeniería en Biotecnología, con la colaboración científica del Dr. Freddy Proaño Ph.D, docente principal tiempo parcial de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, el Dr. Armando Reyna Ph.D, docente investigador de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE extensión Santo Domingo de los Tsáchilas y la Ing. Cristina Cholota Técnico Docente del Laboratorio de Biotecnología Animal.

#### 3.2 Zona de estudio

El presente proyecto de investigación se desarrolló en dos fases:

##### 3.2.1 Trabajo de campo

Se tomó un total de 21 muestras de aquellos animales que presentaron cuadros clínicos compatibles con tripanosomosis bovina en 3 fincas ganaderas de la Parroquia Convento, Cantón Chone, de la provincia de Manabí, ubicada en la región litoral ecuatoriana, Latitud: -0.1346, Longitud: -79.9301 y Altura: 210 msnm.

De cada animal se llenó un registro con información proporcionada por el dueño o responsable de la finca (ANEXO D), posteriormente las muestras fueron trasladadas hacia el laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

### **3.2.2 Trabajo de laboratorio**

El procesamiento y análisis de las muestras se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Animal, de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, ubicado en el sector de Sangolquí: Av. General Rumiñahui S/N y Paseo Escénico Santa Clara.

Las muestras fueron sometidas a la técnica de PCR: Anidada para la amplificación de la región ITS del ADNr y convencional para amplificar la región CatL-Like; los amplicones resultantes fueron sometidos a secuenciación para su posterior análisis filogenético.

### **3.3 Duración de la investigación**

El tiempo requerido para la culminación de la investigación fue de 9 meses. Iniciando en el mes de noviembre de 2017 y terminando en julio de 2018.

### **3.4 Metodología**

#### **3.4.1 Extracción, procesamiento y conservación de muestras de sangre**

Se realizó una extracción de sangre periférica mediante el método de venopunción de la vena coccígea con la ayuda del sistema vacutainer agujas de seguridad calibre 21G, tubos al vacío (BD Vacutainer) sin anticoagulante y con anticoagulante EDTA.



El primer paso para realizar la extracción fue rotular los tubos de recolección con la información necesaria (Nombre o número del animal, tipo de muestra, especie, sitio de recolección y fecha), posteriormente se inmovilizó al animal, se levantó la cola hasta casi colocarla en posición vertical sujetándola en el tercio medio y se retiró los restos de material fecal desinfectando el área de punción con alcohol al 70% para eliminar contaminación de las muestras.

A continuación, se insertó la aguja empataada con el capuchón a una profundidad de 8-12 milímetros en la línea media entre las vértebras coccígeas 6 y 7, y se colocó el tubo hasta consumir todo el vacío, una vez lleno el 75% de la capacidad del tubo se retiró y se almacenó.

### **3.4.2 Extracción de ADN a partir de sangre periférica**

Para la extracción de ADN de sangre se utilizó el kit Wizard® Genomic DNA Purification de Promega, siguiendo el protocolo descrito en el kit con modificaciones el cual se detalla a continuación.

Para la lisis celular de los glóbulos rojos, se colocó 300  $\mu$ L de sangre periférica con EDTA en un tubo de microcentrifugación de 1.5 mL, a continuación, se adicionó 900  $\mu$ L de tampón (Tris HCl-20mM; pH 7.6), se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos, invirtiendo el tubo cada 3 minutos, posteriormente, se centrifugó a 15040 RCF durante 1 minuto, se desechó el sobrenadante y se sometió el pellet a vortex durante 15 segundos.

Posteriormente se añadió 300  $\mu$ L de solución de lisis nuclear homogeneizando suavemente con la pipeta, seguido de 100  $\mu$ L de solución de precipitación de proteínas, vortex

durante 20 segundos e incubación a 65°C por 30 minutos, transcurrido este tiempo se centrifugó nuevamente a 15040 RCF por 5 minutos.

Para la precipitación del ADN se colocó 900 µL de isopropanol en un tubo estéril de 1.5 mL, y se añadió el sobrenadante mezclando por inversión hasta que se observó la formación de hilos de ADN, se dejó incubar los tubos a -20°C durante 30 minutos, se centrifugó a 15040 RCF por 2 minutos y se descargó el sobrenadante. Seguidamente, se realizaron 2 lavados del precipitado con 90 µL de etanol al 70% frío, centrifugando a 15040 RCF por 2 minutos. Para eliminar el etanol sobrante se dejó secar los tubos boca abajo durante 15 minutos, una vez transcurrido el tiempo, se procedió a resuspender las muestras de ADN en 30 µL de solución de resuspensión durante toda la noche a 4°C.

### **3.4.3 Cuantificación de ADN**

La concentración de ADN total extraído se cuantificó por espectrofotometría UV, mediante el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA).

Antes de iniciar la cuantificación de ADN se limpió el lente con 2 µL de HCl 1N y agua destilada, posteriormente se configuró el equipo con el programa para cuantificación de ácidos nucleicos y se colocó 2 µL de solución blanco. Una vez listo el equipo, se colocó 2 µL de cada muestra en el lente y se cuantificó la concentración de ADN y su pureza mediante las absorbancias 260/280 y 260/230.

### 3.4.4 Determinación de la integridad de ADN extraído

Para la determinación de la integridad de los ADNs se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa al 0,8% (p/v) teñido con SYBR® Safe DNA Gel Stain. En cada pocillo del gel se cargó una mezcla de 5 µL de ADN con 1 µL de buffer de carga Blue Juice 10x; se programó la fuente a 100 mA, 120 voltios V y se dejó correr durante 1 hora. Finalizado este procedimiento se visualizó el gel mediante UV en el equipo ChemiDoc™ Imaging System.

### 3.4.5 Identificación de muestras positivas a *Trypanosoma* spp. por PCR anidada

Para la identificación de *Trypanosoma* spp. se amplificó las regiones conservadas ITS, variables en tamaños según la especie de tripanosoma.

Se siguió la metodología para PCR anidada descrita por (Cox et al., 2005), y estandarizada por (Rodríguez, 2017), utilizando los cebadores ITS1 e ITS2 en la primera reacción y los cebadores ITS3 e ITS4 en la segunda reacción, descritos en la Tabla 3.

**Tabla 3**

*Cebadores de la región ITS para Trypanosoma spp.*

Cebador	Secuencia
ITS1	5 -GAT TAC GTC CCT GCC ATT TG- 3
ITS2	5 -TTG TTC GCT ATC GGT CTT CC- 3
ITS3	5-GGA AGC AAA AGT CGT AAC AAG G-3
ITS4	5 -TGT TTT CTT TTC CTC CGC TG- 3

Fuente: (Cox et al, 2005)

En las Tablas (4 y 5), se describen las concentraciones de los reactivos y las condiciones de ciclo para las dos rondas de PCR anidada. En la primera ronda se usó 1 µL de ADN a una

concentración de 100 ng/ $\mu$ L, mientras que en la segunda se cargó 1  $\mu$ L de producto de PCR de la primera ronda.

El control positivo usado fue el plásmido P26 (*Trypanosoma theileri*), proporcionado por el laboratorio de Biotecnología Animal.

**Tabla 4**

*Concentraciones y reactivos utilizados para la amplificación de la región ITS*

Reactivos	Unidad	Stock	Concentración Final	Volumen ( $\mu$ L)
H2O	$\mu$ L	N/A	-	15,75
Buffer + Cl <sub>2</sub> Mg	X/ mM	10,00/ 20,00	1,00	2,50
Cebador ITS1/3	$\mu$ M	10,00	1,00	2,50
Cebador ITS2/4	$\mu$ M	10,00	1,00	2,50
dNTP	$\mu$ M	40,00	0,80	0,50
Dream Taq polimerasa	U/ $\mu$ L	5,00	1,25	0,25
ADN/ Producto de PCR	ng/ $\mu$ L	100	100	1
<b>Total</b>				<b>25,00</b>

Nota:  $\mu$ L: microlitro;  $\mu$ m: micromolar; mM: milimolar; U/ $\mu$ L: unidades por microlitro; ng/ $\mu$ L: nanogramos por microlitro; dNTP: mix de desoxinucleótidos.

**Tabla 5**

*Condiciones para la reacción de PCR anidada*

Proceso	Temperatura ( $^{\circ}$ C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	7	1
Desnaturalización	94	1	35
Hibridación	55	1	35
Extensión	72	2	35
Extensión final	72	10	1
Mantenimiento	4	$\infty$	-

Nota:  $^{\circ}$ C: grados centígrados; min: minutos

Fuente: (Rodríguez, 2017)

### 3.4.5.1 Visualización de los productos de PCR amplificados de la región ITS

Una vez finalizada la PCR anidada se cargó una mezcla de 5  $\mu\text{L}$  de producto de PCR con 2  $\mu\text{L}$  de buffer de carga Blue Juice 10X, en geles de agarosa al 1.5% (p/v) teñidos con SYBR® Safe DNA Gel Stain (0,1  $\mu\text{L}/\text{mL}$  TBE 1X). Como marcador molecular se usó 3  $\mu\text{L}$  de GeneRuler 100bp Ladder con 1  $\mu\text{L}$  de buffer de carga de ADN 6X.

La fuente para la corrida electroforética se programó a 120 V, 300 mA y se corrió durante 75 minutos para un gel de 70 mL; los resultados fueron visualizados en ChemiDoc™ Imaging System.

### 3.4.6 Clonación

Para realizar la clonación del fragmento amplificado se eligió 1 muestra positiva para *Trypanosoma* spp. por PCR. Este proceso se realizó con el Kit TOPO® TA Cloning® y las células químicamente competentes One shot® TOP 10 de Invitrogen, siguiendo el protocolo descrito en el inserto del kit.

#### 3.4.6.1 Ligación

En el proceso de ligación se ensambló el fragmento de ADN amplificado con el vector TOPO TA, esto fue posible gracias a la enzima topoisomerasa I, la cual tiene funciones tanto de enzima de restricción como de ligasa. Esta enzima es la encargada de ligar el extremo 3' con una polideoxitimina (T) extra del vector, al extremo 3' del producto de PCR que contiene una desoxiadenosina (A) añadida por la Dream Taq Polimerasa, formando así el plásmido el cual será insertado en bacterias *E. coli* para su replicación (Technologies Corporation, 2014).

Para realizar un eficiente proceso de ligación todos los reactivos necesarios y el producto de PCR deben permanecer en hielo. El primer paso fue colocar en un tubo estéril de 250  $\mu\text{L}$  los reactivos y producto de PCR en el orden descrito en la Tabla 6; posteriormente se mezcló gentilmente y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente para la posterior transformación.

**Tabla 6**

*Reactivos necesarios para la ligación*

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad</b>
Producto de PCR	2 $\mu\text{L}$
Solución salina	1 $\mu\text{L}$
Agua	2 $\mu\text{L}$
Vector TOPO TA	1 $\mu\text{L}$
<b>Volumen Total</b>	<b>6 <math>\mu\text{L}</math></b>

Nota:  $\mu\text{L}$ : microlitro

### 3.4.6.2 Transformación y selección de células transformadas

En el proceso de transformación se insertó el plásmido en las células químicamente competentes One Shot® TOP 10 (*E. coli*), para posteriormente ser sembradas en placas con medio LB selectivas para kanamicina, suplementado con X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido) e IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) (ThermoFisher, n.d.).

A continuación, se detalla el procedimiento seguido para transformación y selección, tomando en cuenta la importancia de la cadena de frío en el proceso, por lo que las células competentes y el plásmido fueron colocados en hielo durante todo el proceso.

Para iniciar se colocó 2  $\mu\text{L}$  del plásmido en un vial de 50  $\mu\text{L}$  de células químicamente competentes One Shot® TOP 10 y se mezcló gentilmente, a continuación, se incubó la mezcla en hielo durante 10 minutos agitando 3 veces, para posteriormente incubar el vial a 42°C durante 30 segundos y se colocó en hielo nuevamente causando un shock térmico. Posteriormente se adicionó 250  $\mu\text{L}$  de medio SOC a temperatura ambiente y se incubó a 37°C de manera horizontal a 200 rpm durante 1 hora.

Una vez que transcurrió el tiempo, se sembró 100  $\mu\text{L}$  de las bacterias en medio SOC en 1 placa con medio selectivo y 50  $\mu\text{L}$  en 1 placa sin el antibiótico kanamicina, estas fueron incubadas a 37°C durante toda la noche. Cuando se observó la proliferación de las colonias se seleccionaron 6 para realizar la purificación del plásmido.

La preparación de las placas de medio LB suplementadas con kanamicina, X-gal e IPTG se describe en el ANEXO A

### **3.4.7 Purificación del plásmido**

El proceso de purificación de plásmido permitió aislar y purificar el ADN plasmídico, para esto se siguió el protocolo descrito en la base de datos del Laboratorio de Biotecnología Animal, el cual se detalla a continuación.

Las colonias seleccionadas se sembraron en medio LB suplementado con Kanamicina (50 mg/mL), las cuales se dejaron crecer durante 24 horas a 37°C bajo agitación vigorosa. Posteriormente se transfirió 1.5 mL de cada cultivo a un tubo de microcentrifugación y se precipitó las células centrifugando los tubos durante 1 min a 15000 RCF.

A continuación, se descartó el sobrenadante y se agregó 100  $\mu\text{L}$  de solución de resuspensión o solución A fría, seguida de 200  $\mu\text{L}$  de solución de lisis o solución B y se invirtió el tubo suavemente 8 veces, para luego incubar en hielo por 5 minutos. Al cabo de este tiempo, se añadió 150  $\mu\text{L}$  de solución C o solución de neutralización fría y se incubó la mezcla en hielo por 5 minutos (observándose un precipitado blanco), se centrifugó la mezcla durante 7 minutos a 15000 RCF.

Para la precipitación del ADN plasmídico se colocó 400  $\mu\text{L}$  de isopropanol en un tubo estéril de 1.5 mL, y se transfirió el sobrenadante mezclando por inversión varias veces, inmediatamente se centrifugó a 15000 RCF por 10 minutos y se descargó el sobrenadante dejando el pellet lo más seco posible. Seguidamente, se añadió 200  $\mu\text{L}$  de etanol al 95% y se dio un pequeño toque con el vortex, luego se centrifugó a 15000 RCF por 5 minutos y se descargó el sobrenadante.

Para eliminar el etanol sobrante se dejó secar los tubos boca abajo durante 15 minutos, una vez transcurrido el tiempo, se procedió a resuspender las muestras de ADN en 50  $\mu\text{L}$  de agua destilada previamente calentada a 65 °C, dejando incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos, luego de lo cual se añadió 1  $\mu\text{L}$  de ARNasa y se incubó por 10 minutos a 37 °C. Los plásmidos purificados se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Las Soluciones A, B y C utilizadas en este protocolo se describen en el ANEXO B



### 3.4.8 Amplificación de plásmidos a través de PCR

Se realizó una PCR convencional de los 5 plásmidos purificados utilizando los cebadores ITS 3 e ITS 4, con el fin de comprobar la presencia del fragmento de ADN clonado. Los reactivos y concentraciones utilizados se detallan en la Tabla 4 y las condiciones de ciclado en la Tabla 5.

### 3.4.9 Identificación de muestras positivas a *Trypanosoma vivax* por (TviCatL-PCR)

Para la identificación especie específica de *Trypanosoma vivax* se amplificó la cisteína proteasa CatL-like, siguiendo la metodología descrita por (Cortez et al., 2009), utilizando los cebadores TviCatL y DTO 155 descritos en Tabla 7.

#### Tabla 7

*Cebadores de la región CatL-like para Trypanosoma vivax.*

Cebador	Secuencia
<b>TviCatL</b>	5 – GCC ATC GCC AAG TAC CTC GCC GA- 3
<b>DTO 155</b>	5 – TTA AAG CTT CCA CGA GTT CTT GAT CCA GTA- 3

Fuente: (Cortez et al., 2009)

En las Tablas (8 y 9), se describen las concentraciones de los reactivos y las condiciones de ciclo para la PCR que se utilizaron para identificar las muestras positivas a *Trypanosoma vivax*. Se utilizó 4 µL de ADN a una concentración de 100 ng/µL y el control positivo fue donado por la Universidad Simón Rodríguez de Venezuela.

**Tabla 8***Concentraciones y reactivos utilizados para la amplificación de la región CatL-Like*

Reactivos	Unidad	Stock	Concentración Final	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
H <sub>2</sub> O	$\mu\text{L}$	N/A		15,00
Buffer + Cl <sub>2</sub> Mg	X/ mM	10,00/ 20,00	1,00	2,50
Cebador TviCatL	$\mu\text{M}$	10,00	0,50	1,25
Cebador DTO 155	$\mu\text{M}$	10,00	0,50	1,25
dNTP	$\mu\text{M}$	40,00	0,80	0,50
Dream Taq polimerasa	U/ $\mu\text{L}$	5,00	2,5	0,50
ADN	ng/uL	100	400	4
<b>Total</b>				<b>25,00</b>

Nota:  $\mu\text{L}$ : microlitro;  $\mu\text{m}$ : micromolar; mM: milimolar; U/ $\mu\text{L}$ : unidades por microlitro; ng/uL: nanogramos por microlitro; dNTP: mix de desoxinucleótidos

**Tabla 9***Condiciones para la reacción de TviCatL-PCR.*

Proceso	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5 min	1
Desnaturalización	94	30 s	35
Hibridación	65	30 s	35
Extensión	72	30 s	35
Extensión final	72	10	1
Mantenimiento	4	$\infty$	-

Fuente: (Cortez et al., 2009)

### 3.4.9.1 Visualización de los productos de PCR amplificados de la región CatL-Like

Para la visualización de los productos de PCR amplificados de esta región, se corrió por electroforesis horizontal 10  $\mu\text{L}$  de cada amplicón mezclado con 2  $\mu\text{L}$  de buffer de carga Blue

Juice 10X, en geles de agarosa al 2% (p/v) teñidos con SYBR® Safe DNA Gel Stain (0,1 µL/mL TBE 1X). Como marcador molecular se usó 3 µL de GeneRuler 100bp Ladder con 1 µL de buffer de carga de ADN 6X.

La fuente para la corrida electroforética se programó a 120 V, 300 mA y se corrió durante 90 minutos para un gel de 70 mL. Los resultados fueron visualizados en ChemiDoc™ Imaging System.

#### **3.4.10 Purificación de producto de PCR**

Se realizó una purificación de los productos de PCR que dieron positivos para *T. vivax*, mediante la amplificación de CatL-like. Para esto se realizó una extracción del fragmento de ADN amplificado del gel y se utilizó el kit QIAquick® Gel Extraction de Qiagen, siguiendo el protocolo descrito en el kit, el cual se detalla a continuación.

Para iniciar este proceso se cortó el fragmento de ADN del gel de agarosa con un bisturí limpio y afilado en el transiluminador Safe Imager™ 2.0 de luz azul, y se colocó en tubos de 1,5 mL previamente pesados para así conocer el peso del pedazo de gel cortado. Posteriormente se agregó 3 volúmenes de tampón QG a 1 volumen de gel (100 mg ~ 100 µL) y se incubó a 50°C durante 10 minutos o hasta que se disolvió completamente el gel, durante este tiempo se agitó en vortex cada 3 minutos. Es necesario verificar que el color de la mezcla sea amarillo esto indica que el pH es menor a 7,5 óptimo para la adsorción del ADN a la membrana QIAquick, si presenta una coloración naranja o violeta agregar 10 µL de acetato de sodio (3M, pH 5). Una vez verificado el color amarillo de la mezcla se añadió 1 volumen de isopropanol por 1 volumen de gel y se mezcló.

A continuación, se colocó una columna giratoria QIAquick en un tubo de recolección de 2 mL, se añadió la mezcla a la columna y se centrifugó a 15040 RCF durante 1 minuto, se desechó el sobrenadante y se colocó la columna en el mismo tubo recolector. Seguidamente se agregó 0,5 mL de tampón QG a la columna QIAquick y se centrifugó a 15040 RCF por 1 minuto; esto sirvió para eliminar todo el resto de agarosa.

Para lavar se agregó 0,75 mL de tampón PE a la columna, se dejó reposar durante 5 minutos y se centrifugó durante 1 minuto, seguidamente se eliminó el sobrenadante y se realizó una centrifugación adicional por 1 minuto de la columna para eliminar el etanol residual del tampón PE.

Para eluir el ADN se colocó la columna en un tubo limpio de 1,5 mL y se agregó 50  $\mu$ L de tampón EB en el centro de la membrana de la columna para posteriormente centrifugar durante 1 minuto a velocidad máxima, adicionalmente se agregó 30  $\mu$ L de tampón de elución en la membrana se dejó reposar 1 minuto y se centrifugó durante 1 minuto, este último paso aumenta la concentración de ADN. Las muestras fueron almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **3.4.11 Secuenciación**

El proceso de secuenciación de los clones y productos de PCR, se realizó en la empresa MacroGen® Corea, mediante la técnica de Sanger. Estos tenían una concentración de 100 ng/ $\mu$ L y se envió 20  $\mu$ L de cada uno.

Los cebadores utilizados para la secuenciación fueron ITS3, ITS4, TviCatL y DTO 155 como se muestra en las Tablas (3 y 7), los cuales se encontraban a una concentración de 10  $\mu$ M y se envió 10  $\mu$ l por cada reacción.

#### **3.4.12 Ensamblaje de secuencias**

Las secuencias obtenidas fueron analizadas y editadas mediante el programa Sequencher 5.4.6 para esto se observó la calidad de los picos del cromatograma y se eliminó los extremos de las secuencias donde se observó la menor calidad de estas.

Una vez que las secuencias estuvieron limpias se alinearon y se obtuvo una secuencia consenso de alta calidad para cada una de las muestras, estas fueron guardadas en formato FASTA.

#### **3.4.13 Análisis de similitud y homología**

Este proceso se realizó mediante la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) para nucleótidos, comparando las secuencias consenso obtenidas con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) para determinar a qué especie de *Trypanosoma* spp. tienen similitud estas secuencias.

#### **3.4.14 Análisis filogenético**

El análisis filogenético de la región ITS del ADNr, se estableció mediante análisis de las secuencias obtenidas en el presente estudio, secuencias M20 y CMQ73 obtenidas por Cholota (2017) y Rodríguez (2017) respectivamente, y aquellas recuperadas de la base de datos de

GenBank detalladas en Tabla 10. La secuencia de *Trypanosoma vivax* se usó como grupo externo.

Las relaciones filogenéticas basadas en el dominio catalítico de CatL-like, se establecieron mediante un análisis de las secuencias obtenidas en el presente estudio y aquellas que fueron recuperadas de la base de datos de GenBank detalladas en Tabla 11. La secuencia de *Trypanosoma evansi* se usó como grupo externo.

Para el análisis filogenético se realizó un alineamiento múltiple con la herramienta MUSCLE del programa MEGA 7. Los alineamientos fueron analizados mediante el método de máxima verosimilitud y el modelo evolutivo Kimura 2 parámetros, 1000 repeticiones fue obtenido por el programa Mega 7.

### Tabla 10

*Secuencias ITS de Trypanosoma godfreyi de los diferentes aislados empleados en este estudio y su origen geográfico*

Aislados de <i>T. godfreyi</i>	Origen	Número de acceso de GenBank	
ZWA6307	África centro-sur	Luangwa*	JN673383
ZWA7407	África centro-sur	Luangwa*	JN673384
TS06134	África central	Serengeti*	JN673385
M2	América del sur	Ecuador	-
M20	América del sur	Ecuador	-
CMQ73	América del sur	Ecuador	-
TviIL3905	África oriental	Kenya	DQ316042

Nota: \* Parques nacionales de África

**Tabla 11**

*Secuencias CatL-like de Trypanosoma vivax de los diferentes aislados, empleadas en este estudio y su origen geográfico*

<b>Aislados de <i>T. Vivax</i></b>	<b>Origen</b>	<b>Número de acceso de GenBank</b>
TviBrMi	América del sur Brasil	EU753790, EU753789
TviBrCa.cl3	América del sur Brasil	EU753788
IL3905	África oriental Kenya	EU753802, EU753804
TviVeMe	América del sur Venezuela	EU753791, EU753792
Y486.cl3	África occidental Nigeria	EU753794
IL2160.cl3	África occidental Nigeria	EU753795
TviMzMa08	África oriental Mozambique	EU753817
TviMzNy.cl39	África oriental Mozambique	EU753815
TviMzMa07	África oriental Mozambique	EU753816
TviBfMene	África occidental Burkina Faso	EU753801, EU753798, EU753799
TviCo851.1	América del sur Colombia	MF142349, MF142350
TviGha	África occidental Ghana	AB781078
TviZam	África centro-sur Zambia	AB781076, AB781075
TviEcuM5	América del Sur Ecuador	-
TviEcuM14	América del Sur Ecuador	-
TviEcuM17	América del Sur Ecuador	-
Ted2. <i>T. evansi</i>	América del Sur Brasil	EU753818

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Extracción y calidad de ADN

Se recolectaron un total de 21 muestras de sangre periférica de bovinos en 3 haciendas ganaderas del cantón Chone, Provincia de Manabí; de cada muestra se extrajo ADN y se evaluó concentración, pureza e integridad.

La cuantificación de la concentración de las muestras mediante espectrofotometría se basa en la propiedad de los ácidos nucleicos de absorber la luz UV a una longitud de onda de 260 nm, mientras que la pureza se determina a través de las relaciones A260/280 cuyo valor debe oscilar entre 1,8 y 2,1 para descartar contaminación por proteínas, y A260/230 que determina la presencia de contaminantes orgánicos si el valor obtenido es menor a 1,8 (Thermo Scientific, 2007).

Las concentraciones de ADN de las muestras resultaron en un rango de 118 a 991 ng/ $\mu$ L, y las relaciones A260/280 y A260/230 variaron en rangos de 1,78-1,94 y 1,80-2,4 respectivamente, por lo que se consideran óptimas para su análisis posterior mediante PCR.

#### 4.2 Evaluación de la presencia de diferentes especies de *Trypanosoma* spp. en muestras sanguíneas de bovinos

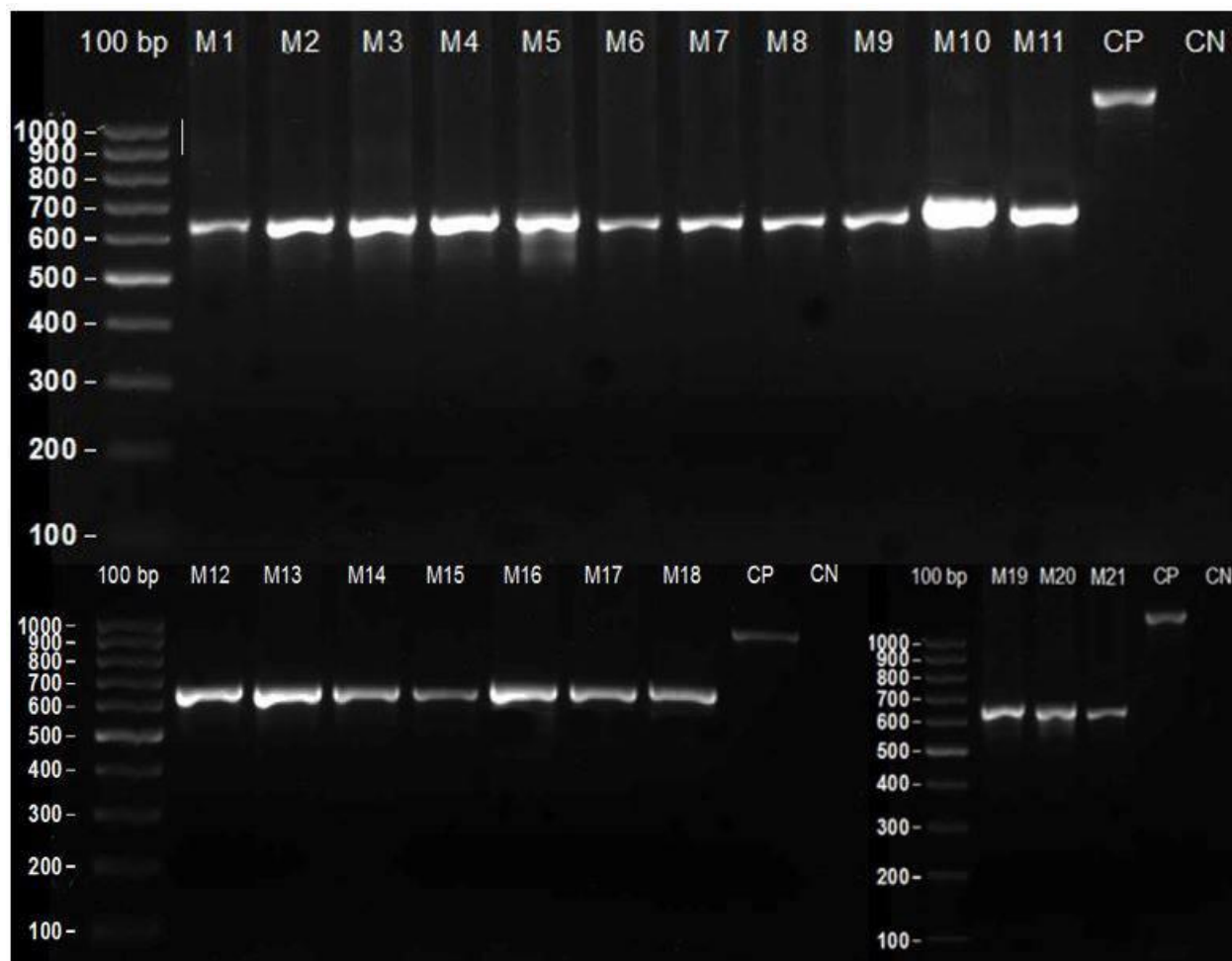
En la actualidad se han diseñado diferentes cebadores para detectar ADN de tripanosoma, los cuales han permitido la identificación específica para la mayoría de las especies y subespecies de este hemotrópico, tanto en infecciones animales naturales como experimentales. Aquellos



cebadores dirigidos a la amplificación de la región espaciadora transcrita interna (ITS1, 5.8S e ITS2) del ADNr dependen de las diferencias específicas en la longitud de la secuencia para distinguir las distintas especies de *Trypanosoma* spp. Estas secuencias son altamente conservadas en tamaño de una misma especie, pero varían entre especies; además de esto la región es un locus multicopia aproximadamente de 100-200 copias, lo que lo convierte en un objetivo de diagnóstico óptimo (Ahmed et al., 2013; Auty et al., 2012).

Es por esto por lo que, en el año 2005, Cox y colaboradores diseñaron una técnica de PCR anidada que amplifica la región ITS (ITS-PCR), que resulta beneficiosa en estudios de prevalencia, ya que reducen tiempo y costos al aplicar una única PCR para diferenciar simultáneamente varias especies de tripanosoma presentes dentro de una muestra, ya que se conoce que los tripanosomas patógenos se superponen en regiones endémicas de los vectores. Además se minimiza el manejo de muestras y por lo tanto se disminuye la posibilidad de contaminación (Ahmed et al., 2013; Auty et al., 2012).

En este estudio la técnica de ITS-PCR utilizada, dio como resultado bandas bien definidas de tamaño aproximado de 600 a 670bp para las 21 muestras del cantón Chone como se observa en *Figura 4*.



**Figura 4.** Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, de los productos amplificados de la región ITS de *Trypanosoma* spp. por Nested PCR.

Nota: 100bp: Marcador molecular de GeneRuler 100bp Ladder; Muestras 1-21; CP: control positivo (*T. theileri*); CN: control negativo

Según la base de datos del NCBI el tamaño de banda esperado para *Trypanosoma vivax* es de 611bp y en el estudio realizado por (Cox et al., 2005) se obtiene un fragmento de 620bp para esta especie de tripanosoma; sin embargo, en el estudio realizado por (Auty et al., 2012) para la identificación de especies de tripanosomas en la vida silvestre mediante ITS-PCR, 12 de las secuencias estudiadas representaron organismos que variaban en longitud y se superponían con las longitudes de secuencia descritas para otras especies de tripanosomas, como fue el caso de *T.*

*vivax* y *T. godfreyi* que presentaron una longitud de 594 a 654bp y de 648 a 650bp, respectivamente.

Auty et al., (2012), analizaron posteriormente las muestras positivas a *T. vivax* y *T. godfreyi* por ITS-PCR, con cebadores específicos para cada especie, obteniendo resultados positivos solo para *T. godfreyi*.

#### **4.3 Obtención de colonias recombinantes y determinación de la presencia del fragmento de ADN clonado en plásmidos purificados**

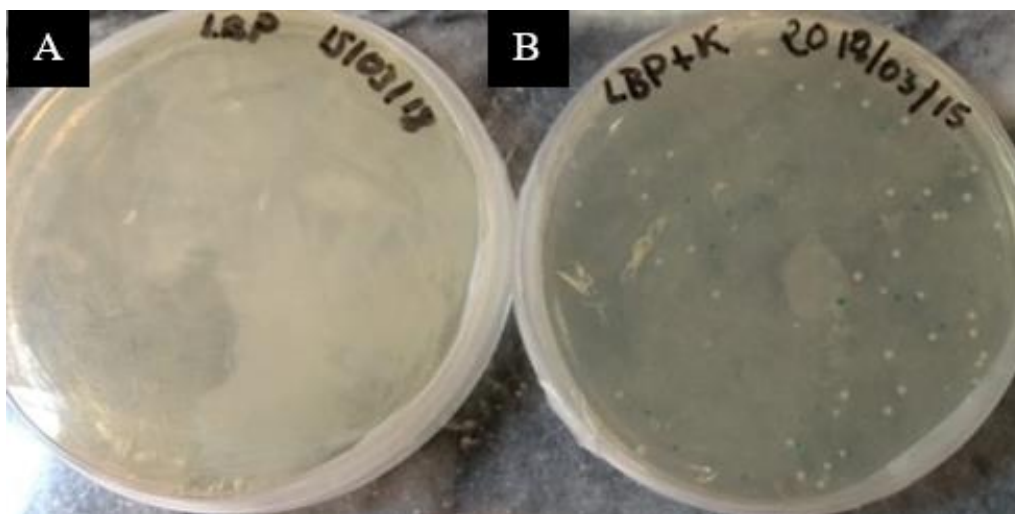
Para el proceso de clonación se seleccionó la muestra M2 ya que presenta una alta concentración (991,9 ng/ $\mu$ L) y estándares óptimos de pureza 1,91 y 2,09 para las relaciones A260/280 y A260/230 respectivamente.

El fragmento de 650bp de ADN amplificado se ligó con el vector TOPO TA, posteriormente se realizó la transformación en células químicamente competentes One Shot® TOP 10, se sembró en placas con medio LBP selectivas para kanamicina suplementadas con X-gal e IPTG y se dejó incubar por 24h a 37°C.

Este último proceso permitió seleccionar únicamente las células que fueron exitosamente transformadas, ya que el vector TOPO TA tiene en su secuencia genes de resistencia a la kanamicina, ampicilina y el gen *lacZ $\alpha$* . En consecuencia, solo las células que incorporaron el vector fueron capaces de crecer en el medio LB con antibiótico. Por otro lado, la expresión del gen *lacZ $\alpha$*  que codifica la enzima  $\beta$ -galactosidasa se ve interrumpida al insertarse el fragmento de ADN, por lo tanto, aquellas células en las que el fragmento no se ligó con el vector presentaron

coloración azul ya que el gen *lacZα* estaba funcional y el IPTG absorbido por las células indujo a la expresión de β-galactosidasa la cual hidrolizó el X-gal a galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroxiindol que se oxidó a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, un compuesto azul insoluble (Dorado, 2014).

Como se observa en la *Figura 5A*, existe un crecimiento masivo de bacterias en la placa control sin antibiótico, esto permitió verificar la viabilidad de las células *E. coli* (One shot® TOP 10) utilizadas en la transformación. Por otro lado, basado en lo descrito anteriormente la *Figura 5B* muestra el crecimiento de las células transformadas de color blanco y de color azul aquellas células en las que el vector no logró ligarse al producto de PCR.

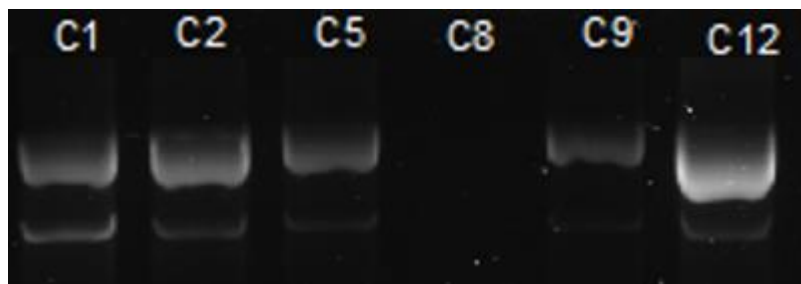


**Figura 5.** Placas Petri con medio LBP suplementadas con X-gal (40 mg/mL) e IPTG (100 mM), de la muestra M2 clonada. A) Placa control sin antibiótico B) Colonias transformantes

Nota: (100 µL de bacterias sembradas)

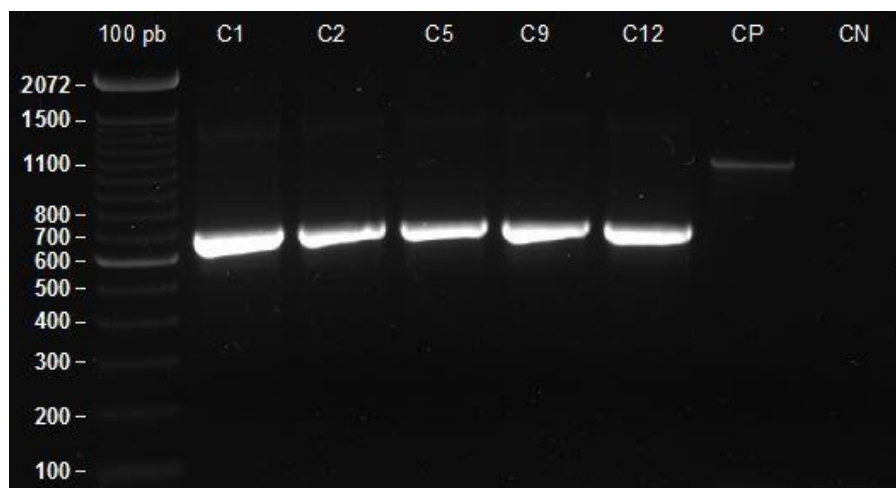
Consecuentemente, se seleccionó un total de 6 colonias blancas para realizar la extracción y purificación de ADN plasmídico y se evaluó su integridad mediante electroforesis en un gel de

agarosa 0,8% (p/v), obteniendo como resultado un patrón de bandas definidas para 5 de las 6 colonias a las que se realizó la extracción como se observa en la *Figura 6*.



**Figura 6.** Integridad del ADN plasmídico M2.  
Nota: Electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, de las colonias 1,2,5,8,9 y 12.

En las colonias c1, 2, 5, 9 y 12 se confirmó la presencia de ADN plasmídico por lo que fueron seleccionadas para realizar la ITS-PCR con los cebadores ITS3 e ITS4, para así confirmar la presencia del fragmento correspondiente a la región ITS (ITS 1, 5.8S e ITS2); observándose un tamaño de banda de 650bp para las 5 colonias (*Figura 7*).



**Figura 7.** Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, de los productos amplificados del ADN plasmídico de cada colonia.

Nota: 100 pb: Marcador molecular de invitrogen 100bp DNA Ladder;  
Colonias 1,2,5,9 y 12; CP: control positivo (*T. theileri*); CN: control  
negativo

#### 4.4 Análisis de similitud y homología de la secuencia amplificada por ITS-PCR

Mediante la técnica de PCR anidada se amplificó un fragmento de 650bp para la muestra M2, el cual según bibliografía sería *T. vivax*, sin embargo, el proceso de secuenciación y análisis de similitud confirmó una identidad del 91% de la muestra M2 con la secuencia de GenBank JN673385 correspondiente a *T. godfreyi* (Tabla 12).

**Tabla 12**

*Secuencia similar y homóloga de la base de datos de GenBank a la muestra M2 obtenida por ITS-PCR*

Aislado muestras Chone - Ecuador	Tamaño del fragmento	Secuencia similar de GenBank	Número de acceso GenBank	Porcentaje de Identidad	E- value
M2	650bp	<i>Trypanosoma godfreyi</i> isolate TS06134 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	JN673385	91	2e-65

Los resultados encontrados en este estudio son similares a los obtenidos por (Rodríguez, 2017) y (Auty et al., 2012) en los que mediante secuenciación de la región ITS de aproximadamente 750bp y 650bp respectivamente, se confirmó la homología de los aislados

hallados con *T. godfreyi*. Sin embargo, esta especie nunca ha sido descrita en América latina; además, en la base de datos de GenBank se encuentran disponibles solamente 3 secuencias obtenidas de hospederos de vida salvaje en África para comparar con nuestra secuencia. *T. godfreyi* fue aislada por primera vez de moscas del género *Glossina morsitans submorsitans* en Gambia donde se demostró que era genética y fenotípicamente distinta de *T. simiae* y *T. congolense* como lo eran el uno del otro, por lo que se clasificó como una nueva especie la cual se sabe causa una enfermedad crónica ocasionalmente mortal en cerdos infectados experimentalmente (McNamara et al., 1994).

Desafortunadamente, no se logró identificar *Trypanosoma vivax* mediante ITS-PCR, como se observa en la Tabla 12, donde el resultado de secuenciación no coincide con el esperado según el tamaño de fragmento obtenido por PCR según (Cox et al., 2005), lo que refuerza otros estudios que demuestran que la PCR dirigida a la amplificación de la región ITS del ADNr tiene una baja sensibilidad y especificidad para detectar *T. vivax*, en comparación con aquellas PCR que utilizan cebadores específicos para esta especie (Ahmed et al., 2013). Esto podría deberse a la compleja estructura genética de *T. vivax* según los aislados sudamericanos, africanos orientales y occidentales, los cuales presentan grandes distancias genéticas (Cortez et al., 2009). Por lo tanto, *T. vivax* puede ser difícil de detectar usando una única PCR.

#### **4.5 Identificación de *Trypanosoma vivax* mediante TviCatL-PCR**

Las enzimas catepsina L-like (CatL-like) son cisteína proteasas que se encuentran en los tripanosomatidios, donde desempeñan un papel importante en diferentes etapas de la infección del parásito en su hospedero. Entre los principales procesos en los que intervienen podemos

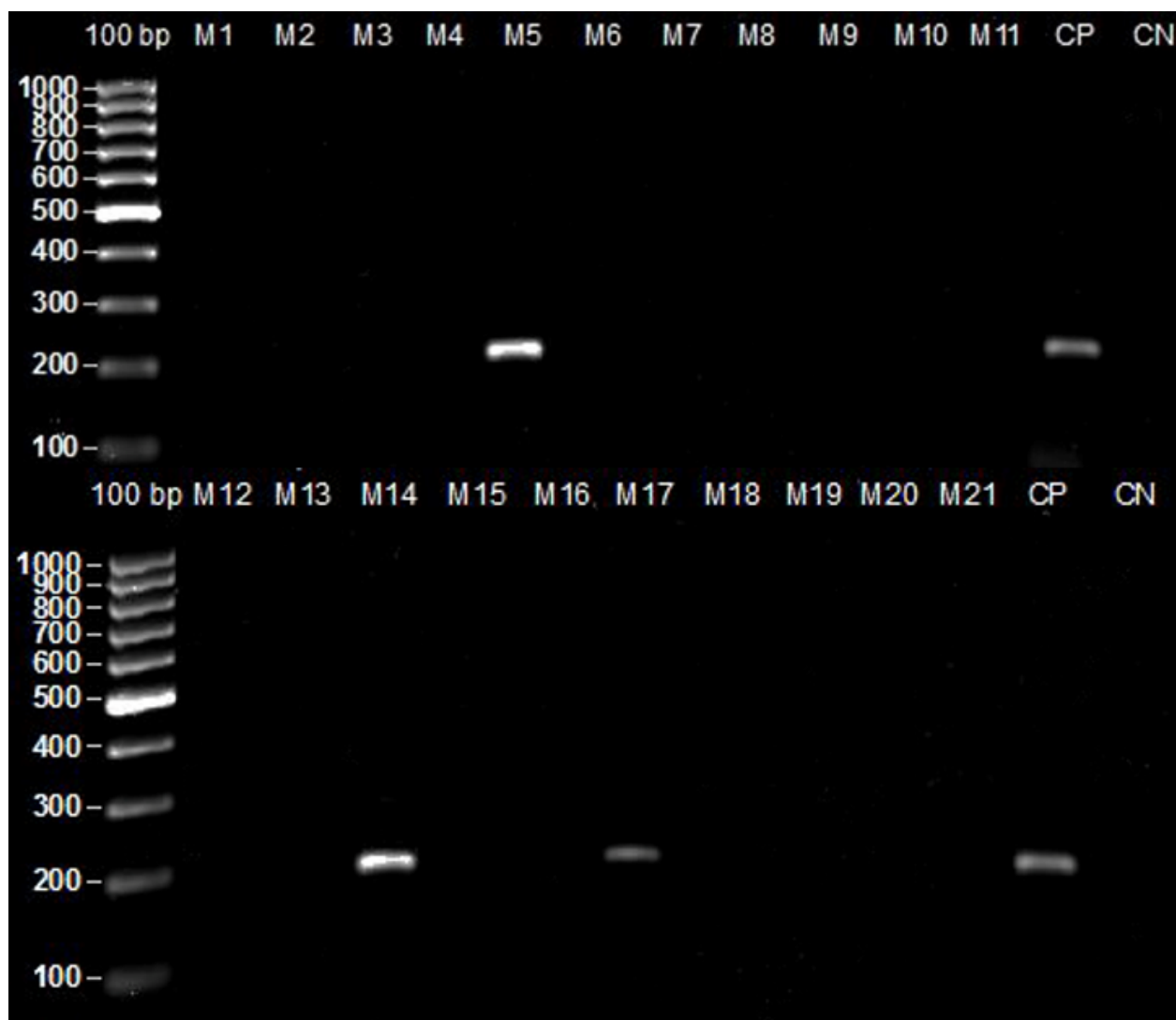
destacar el metabolismo, diferenciación celular, infectividad, patogenicidad y la evasión del sistema inmune. En la actualidad estas enzimas están siendo estudiadas como posibles dianas para el desarrollo de fármacos y vacunas, debido a su propiedad inmunogénica (Correia, 2013).

En el caso del diagnóstico molecular, las CatL-like han demostrado ser objetivos óptimos para la diferenciación entre especies de *Trypanosoma* spp., como se observa en los estudios de Tanaka, (1997) e Higo et al., (2007), donde los polimorfismos en los genes CatL-like permitieron distinguir *T. cruzi* de *T. rangeli* y evaluar los genotipos de *T. cruzi*.

En el caso de *T. vivax*, Cortez et al., (2009), diseñaron un conjunto de cebadores específicos para la amplificación de una región altamente conservada del dominio catalítico de CatL-like (cdCatL-like), entre los diferentes aislados de *T. vivax* de África Occidental, África Oriental y América del Sur, la cual permitió una alineación de secuencias fiable, incluso cuando se compararon organismos genéticamente distantes y se comprobó que este método es altamente sensible y específico para la detección del parásito en parasitemias tanto agudas como crónicas (Cortez et al., 2009; Nakayima et al., 2013; Rodríguez et al., 2015)

En esta investigación se utilizó TviCatL-PCR específica para la identificación de *T. vivax* y se obtuvo como resultado un fragmento amplificado claramente definido de tamaño aproximado a 210bp, de los aislamientos M5, 14 y 17 como se observa en la *Figura 8*.





**Figura 8.** Electroforesis en gel de agarosa al 2%, de los productos amplificados de la región CatL-like de *Trypanosoma vivax*.

Nota: 100 bp: Marcador molecular de GeneRuler 100bp Ladder; Muestras 1-21; CP: control positivo; CN: control negativo

En las investigaciones realizadas por (Cortez et al., 2009) y (Mossaad et al., 2017) utilizando los cebadores TviCatL1 y DTO 155 para la amplificación de cdCatL-like, se obtuvo

una región aproximada de 177 y 200 bp respectivamente, exclusiva del ADN genómico de *T. vivax* por lo que el ADN aislado de las muestras M5, 14 y 17 corresponderían a este hemotrópico altamente patógeno para el ganado.

#### 4.6 Análisis de similitud y homología de las secuencias amplificadas por TviCatL-PCR

Mediante los resultados de secuenciación directa (ANEXO C) y un análisis con la herramienta BLAST se confirmó la identidad de las muestras M5, 14 y 17 cuyos fragmentos tenían un tamaño de banda de 210bp, positivas para *Trypanosoma vivax* (Tabla 13).

**Tabla 13**

*Secuencias similares y homólogas de la base de datos de GenBank a las muestras M5, 14, 17 obtenidas por TviCatL-PCR.*

Aislado muestras Chone - Ecuador	Tamaño del fragmento	Secuencia similar de GenBank	Número de acceso GenBank	Porcentaje de Identidad	E-value
M5	210bp	<i>Trypanosoma vivax</i> isolate TviBrRp.c11 cathepsin L (CatL) gene, partial cds	KR822728	100	2e-85
M14	210bp	<i>Trypanosoma vivax</i> isolate TviBrMo.c14 cathepsin L (CatL) gene, partial cds	KR822726	100	3e-84
M17	210bp	<i>Trypanosoma vivax</i> isolate TviBrRp.c11 cathepsin L (CatL) gene, partial cds	KR822728	100	2e-85

La tripanosomosis animal ha sido descrita en áreas tropicales y sub tropicales de varios países de América del Sur, como Venezuela, Brasil y Colombia donde se han reportado altas

seroprevalencias de los parásitos en bovinos y búfalos de agua, sin embargo, en los últimos 10 años se ha reportado varios brotes epizooticos de enfermedades agudas en regiones no endémicas, las cuales afectan no solo a los bovinos sino también a ovejas y caballos, los cuales han ocasionado altas tasas de mortalidad y morbilidad en los hatos ganaderos americanos (Gonzatti et al., 2014). Recientemente se realizó un estudio en los departamentos de Antioquía y Arauca en Colombia un país fronterizo con Ecuador donde se reportó una prevalencia del 39.2% de tripanosomiasis animal causada por *T. theileri* (38.6%), *T. evansi* (6.7%) y *T. vivax* (0.2%) mediante análisis molecular (Jaimes-Dueñez et al., 2018); lo que sugiere la presencia de estas especies de tripanosoma en el Ecuador.

A pesar de que se han ejecutado pocos estudios, sobre tripanosomosis animal causada por *T. theileri*, *T. vivax* y *T. evansi* en Ecuador, investigaciones realizadas en los últimos años demuestran la presencia de estos hemoflagelados en el territorio ecuatoriano. González, (2016) y Medina et al., (2017), reportaron seroprevalencias de *Trypanosoma* spp., de 48% en Santo Domingo y de 31,03% en Pastaza mediante ELISAi usando un extracto de *T. evansi*, como antígeno. En el cantón El Carmen, Cholota (2017), realizó un estudio mediante PCR anidada en una población de 264 bovinos, encontrando una seroprevalencia de 39,77% de *T. vivax*, 8,33% de *T. evansi* y 1,89% de *T. theileri*; además Rodríguez (2017), comprobó por PCR anidada y secuenciación genotipos circulantes de *T. theileri* en la costa ecuatoriana. Sin embargo, no se ha comprobado la presencia de *T. vivax* por secuenciación, ni como agente causal de un brote epidemiológico.

En el presente proyecto de investigación se documenta por primera vez la presencia de *Trypanosoma vivax* en el Ecuador mediante TviCatL-PCR y se confirma esto mediante análisis

de secuenciación. Por lo que asumimos que el parásito se encuentra circulante en el país y se cree es el causante del brote epizoótico producido en la Parroquia Convento, Cantón Chone, de la provincia de Manabí.

La aparición de los brotes epizoóticos se relaciona con diversos factores como introducción de animales infectados a un hato nunca expuesto al parásito, condiciones ambientales, la actividad estacional de los vectores, características del parásito y condiciones del huésped. Durante esta etapa se presentan signos de la fase aguda de la enfermedad como alta parasitemia, anemia grave, trastornos hematológicos y neurológicos progresivos que pueden conducir a la muerte si los animales no son tratados apropiadamente (Cadioli et al., 2012; Galiza et al., 2011; Jaimes-Dueñez et al., 2018).

Basado en lo anteriormente expuesto es probable que el brote reportado en la región de Manabí en el mes de Noviembre durante la estación seca, se deba a la importación de ganado infectado o a que los bovinos resultantes positivos a *T. vivax* eran portadores de una infección crónica y las condiciones ambientales adversas características de la estación seca como las altas temperaturas y la falta de lluvia, además de las limitaciones de la ingesta de alimentos e infecciones concurrentes, hayan ocasionado una inmunosupresión del rebaño, originando la recrudescencia de la enfermedad, como se ha descrito en diversos estudios de brotes epidemiológicos producidos por *T. vivax* en América Latina (Desquesnes, 2004; Jaimes-Dueñez et al., 2018; Osório et al., 2008; Rodríguez et al., 2015; Cadioli et al., 2012). Por esta razón se hace necesario más estudios enfocados en la epidemiología de *T. vivax* en el Ecuador, para así tener un mejor control y manejo de los brotes que causan grandes pérdidas económicas para los productores.

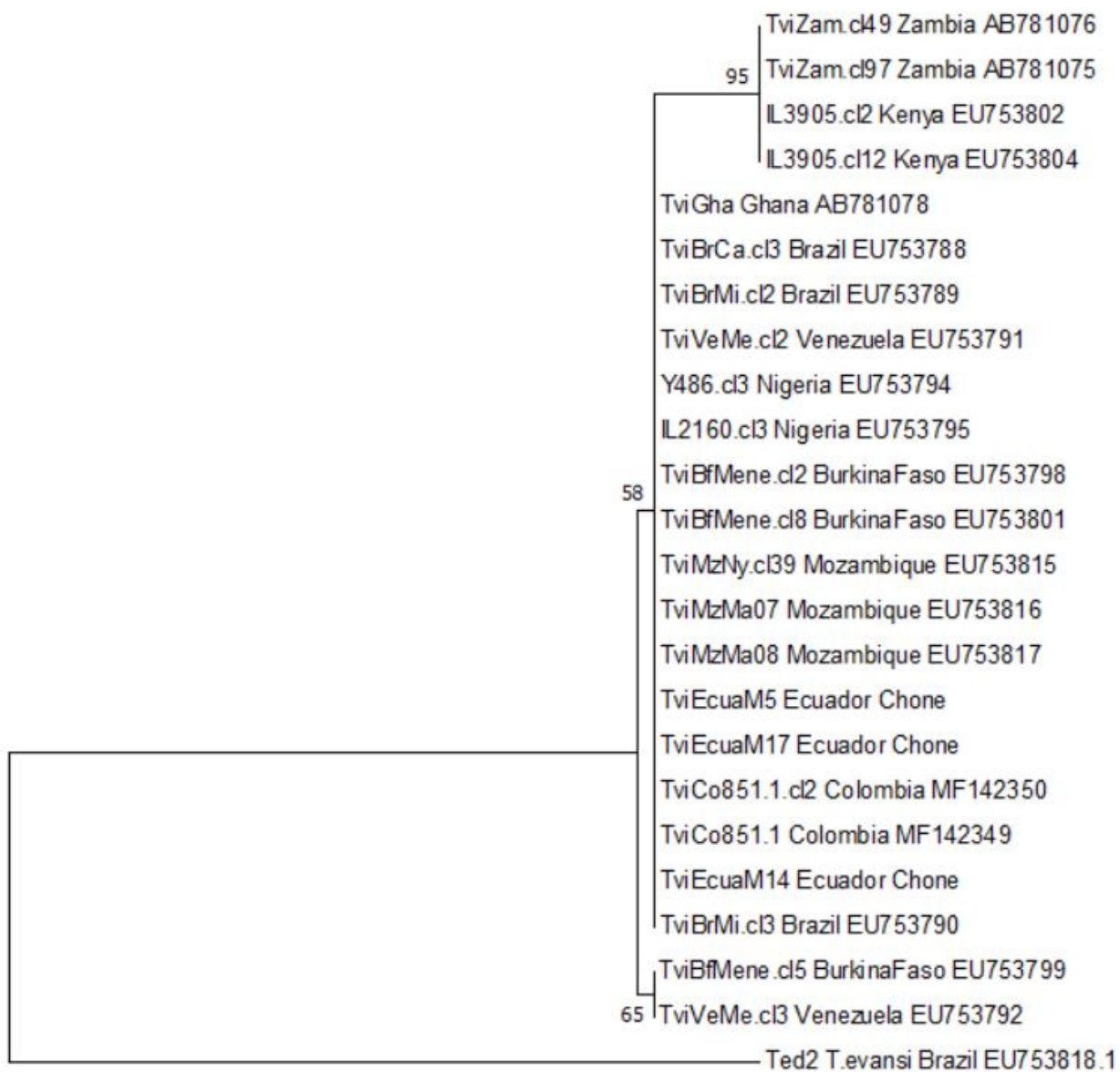
Como se observa en la *Figura 8*, las 3 muestras positivas para *T. vivax* mediante TviCatL-PCR se confirmaron mediante secuenciación por lo que sugieren que esta técnica es altamente sensible y específica, y nos proporciona resultados confiables para estudios de caracterización y epidemiología de este hemotrópico superando las barreras limitantes de otras pruebas utilizadas como las parasitológicas que presentan una baja sensibilidad y las serológicas que tienen baja especificidad.

#### **4.7 Relaciones filogenéticas entre secuencias de cdCatL-like de diferentes aislados de América del Sur y África**

**Se estableció relaciones filogenéticas entre los aislados ecuatorianos obtenidos, los sudamericanos y africanos de *Trypanosoma vivax*, mediante el análisis de secuencias representativas de CatL-like las cuales han presentado una gran diversidad genética entre los diferentes aislados. Un total de 23 secuencias de *T. vivax* fueron analizadas, 10 correspondientes a América del sur, 5 de África oriental, 6 de África occidental y 2 del centro sur de África**

Tabla 11.

El análisis filogenético obtenido dio como resultado que los aislados de Ecuador estaban más estrechamente relacionados con los aislados de América del sur y los del occidente de África, mientras que los aislamientos del sur y oriente de África presentaron diferentes genotipos formando un clado diferente, a excepción de las secuencias de Mozambique (EA) las cuales estaban estrechamente relacionadas con los genotipos sudamericanos como se observa en *Figura 9*.



**Figura 9.** Neighbor-joining tree basado en el análisis de máxima verosimilitud de las secuencias del dominio catalítico de Cathepsina L-Like (cdCatL-like) de aislados de *T. vivax* de América del sur y África.

La agrupación de *T. vivax* de Ecuador en el clado de los aislados de África occidental y América del Sur coincide con estudios filogenéticos previos para aislados sudamericanos (Cortez

et al., 2009; Jaimes-Dueñez et al., 2018; Rodríguez et al., 2015), lo que reafirma la hipótesis de que esta especie patógena para el ganado ingresó al Nuevo mundo con bovinos importados de África occidental. Además varios estudios muestran evidencia de que algunos aislados del este africano pueden estar estrecha o remotamente relacionados con los genotipos de África Occidental y Sudamérica debido a la alta variabilidad genética que se ha encontrado entre las poblaciones de *T. vivax* del Este de África, la cual es mayor en comparación a la diversidad moderada de África Occidental y América del Sur, como se observó en este estudio en el caso de los aislados de Mozambique (Cortez et al., 2009; Nakayima et al., 2013; Rodríguez et al., 2008; Rodríguez et al., 2017).

En la Figura 9, se observa que los aislados ecuatorianos se encuentran mayormente relacionados con los aislados colombianos (TviCo851.1, TviCo851.1.c12) y brasileño (TviBr.c13), esto coincide con la teoría de que *T. vivax* fue introducido en América Latina a partir de un ganado originario del Oeste de África, que entró a este continente a partir de unas importaciones de ganado realizada por Guyana Francesa y posteriormente se diseminó por toda América latina (Gonzatti et al., 2014). Estos resultados señalan la posibilidad que el origen de *T. vivax* en Ecuador se deba a ganado importando desde Colombia debido a la proximidad genética encontrada, y que este es un país fronterizo.

Es importante recalcar que a pesar de la estrecha relación que existe entre las secuencias de los aislados de África Occidental y Sudamérica existen estudios que respaldan que ninguna secuencia encontrada de África occidental es idéntica a las descritas en el continente americano, además de que presenta una mayor diversidad, por lo tanto reafirman la hipótesis de que los aislados de América del sur pueden ser un genotipo de cuello de botella que recientemente

divergió de genotipos estrechamente relacionados que escaparon de África occidental (Rodríguez et al., 2017).

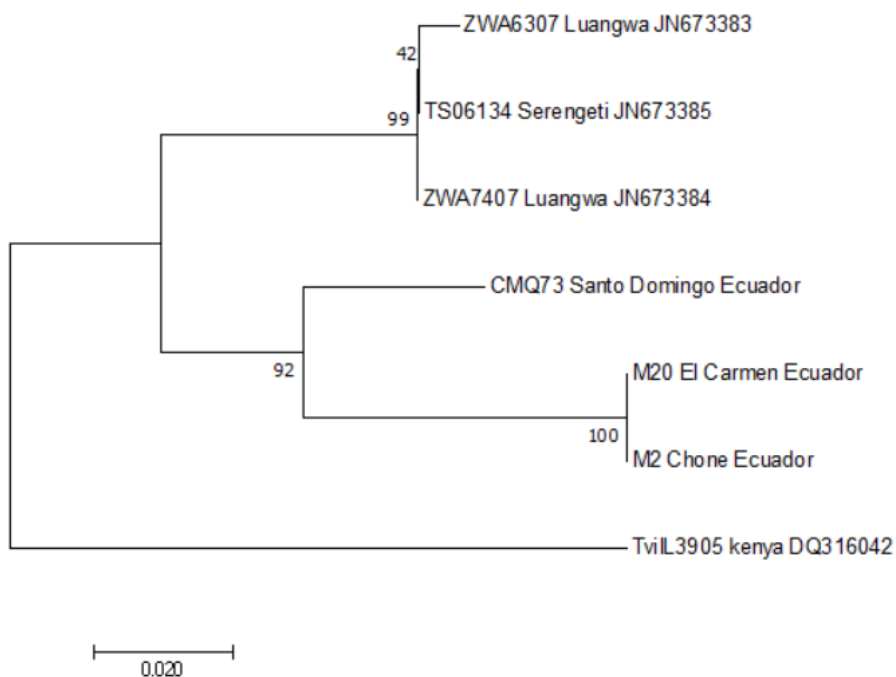
Las inferencias filogenéticas encontradas para *Trypanosoma vivax*, están relacionadas con las características morfológicas, inmunológicas, patológicas, moleculares y de comportamiento en la mosca tse-tsé y los huéspedes mamíferos de los aislados del oeste y este de África, por lo que es necesario conocer su verdadera diversidad considerando las diferencias en el resultado de la enfermedad (Nakayima et al., 2013).

#### **4.8 Análisis filogenético entre secuencias de la región ITS y 5.8S de *Trypanosoma godfreyi*.**

Las relaciones filogenéticas para *T. godfreyi* se establecieron mediante el análisis de las 3 secuencias disponibles en GenBank para la región ITS (ITS1, 5.8s, ITS2) de esta especie, la secuencia de la muestra M2 obtenida en este estudio y las secuencias M20 y CMQ73 (Tabla 10).

Como se observa en Figura 10, las muestras M2, M20 y CMQ73 constituyen un grupo monofilético agrupados en un solo clado, sin embargo, se evidencia polimorfismos entre las secuencias, ya que los aislados de la provincia de Manabí (M2 y M20) se encuentran estrechamente relacionadas entre ellas, pero la muestra de Santo Domingo (CMQ 73) diverge de estas. De igual manera se puede observar que los aislados africanos (ZWA6307, ZWA7407, TS06134), presentaron diferentes genotipos agrupándose en un único clado diferente al de los aislados ecuatorianos.



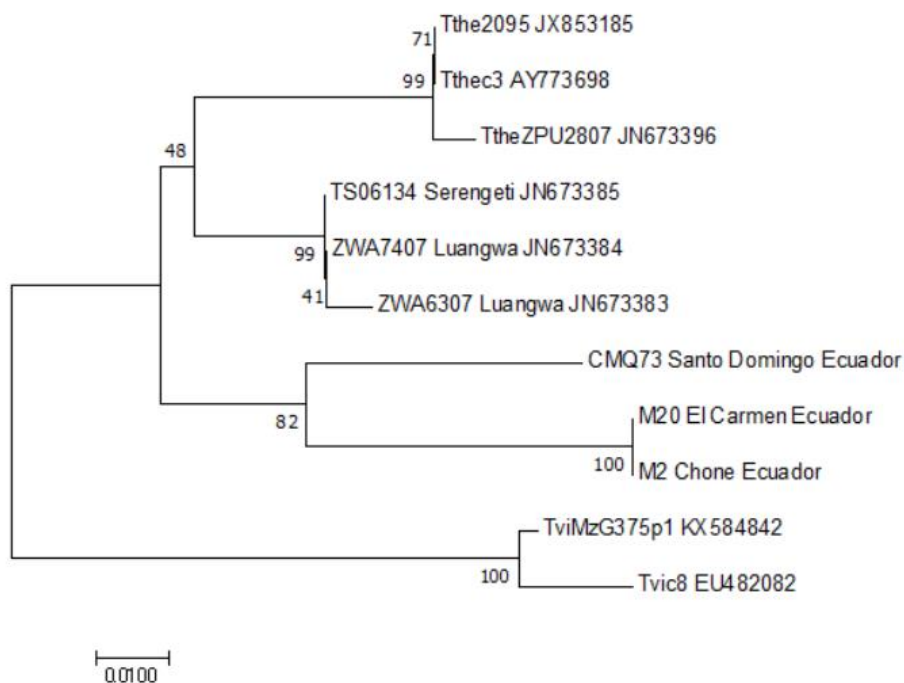


**Figura 10.** Neighbor-joining tree basado en el análisis de máxima verosimilitud de las secuencias de la región ITS del ADNr de aislados de *T. godfreyi*.

Adicionalmente se realizó un análisis de la región 5.8s de los aislados correspondientes a *T. theileri* (Tthe2095, Tthec3, TtheZPU2807), *T. vivax* (TviMzG375p1, Tvic8), *T. godfreyi* (TS0134, ZWA7407, ZW6307) y las muestras similares a *T. godfreyi* de los aislados ecuatorianos.

Según Rodríguez, (2017) la región 5.8s del ADNr es altamente conservada entre las diferentes especies de tripanosoma. Los resultados obtenidos del análisis de esta región confirmó lo descrito por Rodríguez, ya que como se observa en la *Figura 11*, los aislados correspondientes a *T. vivax*, *T. theileri* y *T. godfreyi* que se encuentran descritos en GenBank se agruparon en un

único clado para cada especie, al igual que los aislados ecuatorianos M2, M20 y CMQ73; sin embargo, estos se agruparon en un clado diferente al de *T. godfreyi*.



**Figura 11.** Neighbor-joining tree basado en el análisis de máxima verosimilitud de las secuencias de la región 5.8s de los aislados de *T. godfreyi*, *T. vivax*, *T. theileri* y muestras de Ecuador

Basado en los resultados obtenidos, se determinó que la muestra M2 presenta homología con *T. godfreyi*, no obstante, no es idéntico. Es por esto, que se requieren más estudios para la correcta clasificación de este tripanosomatidio.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES

Este estudio reportó por primera vez la asociación de *Trypanosoma vivax*, con un brote de tripanosomosis bovina, identificado mediante diagnóstico molecular utilizando TviCatL-PCR y confirmado mediante secuenciación. Obteniendo una identidad del 100% con otras CatL-like descritas para *T. vivax*.

Los resultados de secuenciación e ITS-PCR no fueron coincidentes, por lo que se concluye que el método de PCR anidada no fue sensible para la determinación de *Trypanosoma vivax* en las muestras analizadas.

El análisis filogenético de los aislados ecuatorianos de *Trypanosoma vivax*, mostró que estos se encontraban estrechamente relacionados con los aislamientos de Colombia y Brasil, al igual que con África occidental, lo que sugiere el origen de *T. vivax* de Ecuador.

Los análisis filogenéticos de las regiones ITS y 5.8s demuestran que la muestra M2 presenta una homología de 91% con *T. godfreyi* evidenciando en Ecuador una especie nueva aun no bien identificada por lo que se requieren de más estudios para identificar plenamente este parásito.

## RECOMENDACIONES

La presencia de *Trypanosoma vivax* en el país representa un nuevo enfoque en el estudio de tripanosomosis animal, es necesario realizar un diagnóstico adecuado con pruebas eficaces para determinar el mejor tratamiento de la enfermedad y establecer medidas de control para prevenir los brotes epizooticos y la propagación de los parásitos, evitando así, grandes pérdidas económicas producidas por esta enfermedad.

Utilizar los primers DTO 154 y DTO 155 para amplificar la región completa de cdCatL-like de las muestras positivas a *T. vivax* por TviCatL-PCR, para ampliar estudios filogenéticos.

Realizar un estudio molecular exhaustivo para determinar la identidad de la muestra M2, para comprobar los resultados obtenidos o identificar de que especie se trata, ya que se han reportado secuencias similares en muestras del El Carmen y Santo Domingo.

La regiones de la costa y el oriente ecuatoriano son áreas tropicales donde coexisten reservorios, vectores tabánidos y *Stomoxys* spp., junto a hospedadores susceptibles, por lo tanto representan áreas óptimas para el desarrollo de tripanosomosis animal la cual puede presentarse de manera crónica o aguda, causando una alta cantidad de muertes de ganado por lo que se recomienda realizar estudios epidemiológicos que permitan determinar la situación actual del país mediante técnicas de diagnóstico sensibles y específicas.

Se recomienda estudiar un tratamiento adecuado con tripanocidas para la recuperación de los animales afectados en los brotes, también será necesario que se establezcan medidas de control de los vectores.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Adamu, S., Fatihu, M. Y., Useh, N. M., Mamman, M., Sekoni, V. O., & Esievo, K. A. N. (2007). Sequential testicular and epididymal damage in Zebu bulls experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. *Veterinary Parasitology*, 143(1), 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.07.022>
- Ahmed, H. A., Picozzi, K., Welburn, S. C., & Macleod, E. T. (2013). A comparative evaluation of PCR- Based methods for species-Specific determination of African animal trypanosomes in Ugandan cattle. *Parasites and Vectors*, 6(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-316>
- Auty, H., Anderson, N. E., Picozzi, K., Lembo, T., Mubanga, J., Hoare, R., ... Welburn, S. C. (2012). Trypanosome Diversity in Wildlife Species from the Serengeti and Luangwa Valley Ecosystems. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001828>
- Auty, H., Torr, S. J., Michoel, T., Jayaraman, S., & Morrison, L. J. (2015a). Cattle trypanosomosis: the diversity of trypanosomes and implications for disease epidemiology and control. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz*, 34(2).
- Auty, H., Torr, S. J., Michoel, T., Jayaraman, S., & Morrison, L. J. (2015b). Cattle trypanosomosis: the diversity of trypanosomes and implications for disease epidemiology and control. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz*.
- Betancur, O. J., Jimenez, P. D., & Giraldo, C. (2016). Reproductive failures associated with *Trypanosoma (Duttonella) vivax*. *Veterinary Parasitology*, 229, 54–59.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.09.017>

Biteau, N., Bringaud, F., Gibson, W., Truc, P., & Baltz, T. (2000). Characterization of *Trypanozoon* isolates using a repeated coding sequence and microsatellite markers. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *105*(2), 187–202. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(99\)00171-1](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(99)00171-1)

Cadioli, F. A., Barnabé, P. de A., Machado, R. Z., Teixeira, M. C. A., André, M. R., Sampaio, P. H., ... Marques, L. C. (2012). First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, *21*(2), 118–124. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612012000200009>

Cassalett, E., Vera, V. J., Baldrich, R., & Parra, J. (2006). Clasificación por métodos moleculares de cepas de *Trypanosoma* spp. aisladas en Colombia y evaluación morfométrica. *Rev. Med. Vet. Zoot*, *53*, 86–93.

Cholota, C. (2017). Diagnóstico molecular y serológico de *Trypanosoma* spp. mediante PCR anidada y ELISA indirecto en el ganado bovino de la parroquia San Pedro de Suma, del cantón El Carmen, provincia de Manabí, Ecuador. Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE.

Correia, C. (2013). Clonación y expresión de la proteína quimera Tv70CatL en un sistema bacteriano. Universidad Central de Venezuela

Cortez, A. P., Rodrigues, A. C., Garcia, H. A., Neves, L., Batista, J. S., Bengaly, Z., ... Teixeira, M. M. G. (2009). Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and South

- America - characterization, relationships and diagnostic implications. *Molecular and Cellular Probes*, 23(1), 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2008.11.003>
- Cox, A., Tilley, A., McOdimba, F., Fyfe, J., Eisler, M., Hide, G., & Welburn, S. (2005). A PCR based assay for detection and differentiation of African trypanosome species in blood. *Experimental Parasitology*, 111(1), 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2005.03.014>
- Dagnachew, S., & Bezie, M. (2015). Review on *Trypanosoma vivax*. *African Journal of Basic & Applied Sciences*, 7(1), 41–64. <https://doi.org/10.5829/idosi.ajbas.2015.7.1.92116>
- Desquesnes, M. (2004). *Livestock Trypanosomoses and their Vectors in Latin America*. *Tropical Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.04.005>
- Desquesnes, M., Biteau-Coroller, F., Bouyer, J., Dia, M. L., & Foil, L. (2009). Development of a mathematical model for mechanical transmission of trypanosomes and other pathogens of cattle transmitted by tabanids. *International Journal for Parasitology*, 39(3), 333–346. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.07.004>
- Desquesnes, M., Dargantes, A., Lai, D. H., Lun, Z. R., Holzmuller, P., & Jittapalapong, S. (2013). *Trypanosoma evansi* and surra: A review and perspectives on transmission, epidemiology and control, impact, and zoonotic aspects. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/321237>
- Desquesnes, M., & Dávila, A. M. R. (2002). Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: A review and perspectives. *Veterinary Parasitology*, 109(3–4), 213–231. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00270-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00270-4)

Dorado, G. (2014). Clonación del DNA amplificado mediante PCR. Retrieved from <https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/45>

El Universo. (2017). Mosca tábano ha causado muerte de unas 600 reses en Chone | Ecuador | Noticias | El Universo. Retrieved December 23, 2017, from <https://www.eluniverso.com/noticias/2017/11/10/nota/6472027/mosca-tabano-ha-causado-muerte-600-reses>

Eyssen, L. E. A., Vather, P., Jackson, L., Ximba, P., Biteau, N., Baltz, T., ... Coetzer, T. H. T. (2018). Recombinant and native TviCATL from *Trypanosoma vivax*: Enzymatic characterisation and evaluation as a diagnostic target for animal African trypanosomosis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 223(April), 50–54. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2018.07.001>

FAO. (1983). African Animal Trypanosomiasis.

Foil, L. D. (1989). Tabanids as vectors of disease agents. *Parasitology Today (Personal Ed.)*, 5(3), 88–96. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15463186>

Galiza, G. J. N., Garcia, H. A., Assis, A. C. O., Oliveira, D. M., Pimentel, L. A., Dantas, A. F. M., ... Riet-Correa, F. (2011). High mortality and lesions of the central nervous system in Trypanosomosis by *Trypanosoma vivax* in Brazilian hair sheep. *Veterinary Parasitology*, 182(2–4), 359–363. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.016>

Garcia, H. A., Rodrigues, A., & Texeira, M. (2007). *Trypanosoma vivax* en rumiantes: interacciones epidemiológicas y aspectos patogénicos revelados por métodos de biología



molecular, 5771–5778. Retrieved from  
<http://saber.ucv.ve/bitstream/123456789/4427/1/8CursilloCarneExtenso.pdf>

Geysen, D., Delespaux, V., & Geerts, S. (2003). PCR-RFLP using Ssu-rDNA amplification as an easy method for species-specific diagnosis of *Trypanosoma* species in cattle. *Veterinary Parasitology*, *110*(3–4), 171–180. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00313-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00313-8)

González, Z. (2016). Optimización de la técnica inmunoenzimática ELISA para la detección de anticuerpos IgG contra *Trypanosoma* sp. En el ganado bovino. UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS

Gonzatti, M. I., González-Baradat, B., Aso, P. M., & Reyna-Bello, A. (2014). *Trypanosoma (duttonella) vivax* and typanosomosis in latin America: Secadera/Huequera/Cacho Hueco. Trypanosomes and Trypanosomiasis. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1556-5\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1556-5_11)

Greif, G., Rodriguez, M., Reyna-Bello, A., Robello, C., & Alvarez-Valin, F. (2015). Kinetoplast adaptations in American strains from *Trypanosoma vivax*. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* (Vol. 773). <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2015.01.008>

Jackson, A. P., Goyard, S., Xia, D., Foth, B. J., Sanders, M., Wastling, J. M., ... Berriman, M. (2015). Global gene expression profiling through the complete life cycle of *Trypanosoma vivax*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *9*(8), 1–29. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003975>

Jaimes-Dueñez, J., Triana-Chávez, O., & Mejía-Jaramillo, A. M. (2018). Spatial-temporal and

- phylogeographic characterization of *Trypanosoma* spp. in cattle (*Bos taurus*) and buffaloes (*Bubalus bubalis*) reveals transmission dynamics of these parasites in Colombia. *Veterinary Parasitology*, 249(52), 30–42. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.11.004>
- Laohasinnarong, D., Thekiso, O. M. M., Malele, I., Namangala, B., Ishii, A., Goto, Y., ... Inoue, N. (2011). Prevalence of *Trypanosoma* sp. in cattle from Tanzania estimated by conventional PCR and loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Parasitology Research*, 109(6), 1735–1739. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2513-2>
- Maudlin, I., Holmes, P. H., & Miles, M. A. (2004). The trypanosomiasis. Wallingford: CABI. <https://doi.org/10.1079/9780851994758.0000>
- McNamara, J. J., Mohammed, G., & Gibson, W. C. (1994). *Trypanosoma (Nannomonas) godfreyi* sp. Nov. from Tsetse Flies in the Gambia: Biological and Biochemical Characterization. *Parasitology*, 109(4), 497–509. <https://doi.org/10.1017/S0031182000080756>
- Medina, V., Reyna-Bello, A., Tavares, L., Campos, A., Ron-Román, J., Moyano, J., ... Chávez, M. (2017). Diagnóstico de los hemotrópicos *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma* spp. y *Babesia* spp. mediante las técnicas de ELISAi y PCR en tres fincas ganaderas de la Provincia de Pastaza, Ecuador. *Revista Científica*, 27(3), 162–171. Retrieved from <http://www.produccioncientifica.luz.edu.ve/index.php/cientifica/article/view/22736/22606>
- Monzón, C., Mancebo, O., Giménez, J., & Russo, A. (2013). Evolución de la Trypanosomosis bovina por *Trypanosoma vivax* en Formosa (Argentina). Años 2007-2012 y su potencial

dispersión en el país. *Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol*, 72(1), 38–44. Retrieved from [http://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/8545/CONICET\\_Digital\\_Nro.11223.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/8545/CONICET_Digital_Nro.11223.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Mossaad, E., Salim, B., Sukanuma, K., Musinguzi, P., Hassan, M. A., Elamin, E. A., ... Inoue, N. (2017). *Trypanosoma vivax* is the second leading cause of camel trypanosomosis in Sudan after *Trypanosoma evansi*. *Parasites and Vectors*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2117-5>

Nakayima, J., Nakao, R., Alhassan, A., Hayashida, K., Namangala, B., Mahama, C., ... Sugimoto, C. (2013). Genetic diversity among *Trypanosoma (Duttonella) vivax* strains from Zambia and Ghana, based on cathepsin L-like gene. *Parasite*, 20, 24. <https://doi.org/10.1051/parasite/2013024>

OIE. (2008). Trypanosomosis (tsetse-transmitted). *OIE Terrestrial Manual*, 813–822.

Osório, A. L. A. R., Madruga, C. R., Desquesnes, M., Soares, C. O., Ribeiro, L. R. R., & Costa, S. C. G. da. (2008). *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World - a review. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(1), 1–13. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008000100001>

Reyna-Bello, A., García, F., & Rivera, M. (1998). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of anti-*Trypanosoma evansi* equine antibodies. *Veterinary*, 80, 149–157. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030440179800199X>

Rodrigues, A. C., Garcia, H. A., Ortiz, P. A., Cortez, A. P., Martinkovic, F., Paiva, F., ...

- Teixeira, M. M. G. (2010). Cysteine proteases of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: Cathepsin L-like gene sequences as targets for phylogenetic analysis, genotyping diagnosis. *Parasitology International*, 59(3), 318–325. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.03.002>
- Rodrigues, A. C., Neves, L., Garcia, H. A., Viola, L. B., Marcili, A., Da Silva, F. M., ... Teixeira, M. M. G. (2008). Phylogenetic analysis of *Trypanosoma vivax* supports the separation of South American/West African from East African isolates and a new *T. vivax-like* genotype infecting a nyala antelope from Mozambique. *Parasitology*, 135(11), 1317–1328. <https://doi.org/10.1017/S0031182008004848>
- Rodrigues, C. M., Batista, J. S., Lima, J. M., Freitas, F. J., Barros, I. O., Garcia, H. A., ... Teixeira, M. M. (2015). Field and experimental symptomless infections support wandering donkeys as healthy carriers of *Trypanosoma vivax* in the Brazilian Semiarid, a region of outbreaks of high mortality in cattle and sheep. *Parasites and Vectors*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1169-7>
- Rodrigues, C. M., Garcia, H. A., Rodrigues, A. C., Costa-Martins, A. G., Pereira, C. L., Pereira, D. L., ... Teixeira, M. M. (2017). New insights from Gorongosa National Park and Niassa National Reserve of Mozambique increasing the genetic diversity of *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma vivax-like* in tsetse flies, wild ungulates and livestock from East Africa. *Parasites and Vectors*, 10(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2241-2>
- Rodríguez, A. (2017). “Caracterización molecular mediante clonación y secuenciación de regiones ITS de diferentes aislados de *Trypanosoma sp.* en Ecuador. UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS – ESPE. Retrieved from

<http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/13251/T-ESPE-057294.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Salas, R., Cardona, E., Reyes, J., Triana, O., Peña, V., Osorio, ... Polanco, D. (2017). Tripanosomiasis bovina en ganadería lechera de trópico alto primer informe de *Haematobia irritans* como principal vector de *T. vivax* y *T. evansi* en Colombia. *Red Med. Vet*, 33, 21–34. <https://doi.org/10.19052/mv.4048>

Sekoni, V. O. (1994). Reproductive disorders caused by animal trypanosomiasis: a review. *Theriogenology*, 42(4), 557–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16727562>

Simpson, L., Thiemann, O. H., Savill, N. J., Alfonzo, J. D., & Maslov, D. A. (2000). Evolution of RNA editing in trypanosome mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(13), 6986–6993. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.13.6986>

Solano, P., Michel, J. F., Lefrançois, T., De La Rocque, S., Sidibé, I., Zoungrana, A., & Cuisance, D. (1999). Polymerase chain reaction as a diagnosis tool for detecting trypanosomes in naturally infected cattle in Burkina Faso. *Veterinary Parasitology*, 86(2), 95–103. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(99\)00137-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00137-5)

Tamay, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2013/ir132d.pdf>

Technologies Corporation, L. (2014). TOPO ® TA Cloning ® Kit Five-minute cloning of Taq

polymerase-amplified PCR products. Retrieved July 16, 2018, from [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/topota\\_man.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/topota_man.pdf)

Thermo Scientific. (2007). *NanoDrop Spectrophotometers*. Retrieved from [www.nanodrop.com](http://www.nanodrop.com)

ThermoFisher. (n.d.). PCR Methods—Top Ten Strategies - EC. Retrieved July 9, 2018, from <http://www.thermofisher.com/ec/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-methods.html#Nested>

Uilenberg, G. (Gerrit), & Boyt, W. P. (1998). A field guide for the diagnosis, treatment and prevention of African animal trypanosomosis. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Retrieved from [http://www.fastonline.org/CD3WD\\_40/LSTOCK/001/LSGen/Trypanosomosis\\_Diagnosis/X0413E00.HTM#TOC](http://www.fastonline.org/CD3WD_40/LSTOCK/001/LSGen/Trypanosomosis_Diagnosis/X0413E00.HTM#TOC)

Wells E., Betancourt A. & Ramirez L. (1977) The epidemiology of *Trypanosoma vivax* in Latin America: some results from the use of an indirect fluorescent antibody test. *Journal of Protozoology* 24, 41A-2A.

Yurchenko, V. Yu.; Kolesnikov, A. (2001). Minicircular Kinetoplast DNA of Trypanosomatidae. *Molecular Biology*, 35, 3–13. Retrieved from <http://www1.osu.cz/~yurchenko/pdf/MolekBiol2001.pdf>