

---

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

Trabajo de Fin de Máster Titulado:

**Taxonomía filogenética y molecular de Trypanosoma spp con  
marcadores de ADN 18S ITS y Catepsina L**

Realizado por:

**Marco René Camacho Quijano**

Director del proyecto:

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

Como requisito para la obtención del título de:

**MAGISTER EN BIOMEDICINA**

Quito, 11 de abril de 2022

## ANEXO B

---

### DECLARACION JURAMENTADA

Yo, **Marco René Camacho Quijano**, con cédula de identidad 1722260542, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

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

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Marco René Camacho Quijano', written over a horizontal line.

FIRMA Y CÉDULA

1722260542

## ANEXO C

---

### DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

**Taxonomía filogenética y molecular de Trypanosoma spp con  
marcadores de ADN 18S ITS y Catepsina L**

Realizado por:

**Marco René Camacho Quijano**

como Requisito para la Obtención del Título de:

MAGISTER EN BIOMEDICINA

ha sido dirigido por el profesor

**JUAN CARLOS NAVARRO C.**

quien considera que constituye un trabajo original de su autor



FIRMA

## ANEXO D

---

### LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

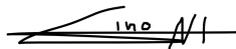
**LINO ARISQUETA HERRANZ**

**JOSÉ RUBÉN RAMÍREZ**

Después de revisar el trabajo presentado,

lo han calificado como apto para su defensa oral ante

el tribunal examinador



FIRMA



FIRMA

Quito, 11 de abril de 2022

## ANEXO E

---

### DEDICATORIA

A mi hermano José y mi hermana Kamilly que con su apoyo y tolerancia he salido adelante como ejemplo para ellos.

A ustedes, la razón de mi ser, los que abrigan mis días e iluminan mis noches, los que jamás se cansan de escuchar, los que siempre tienen para mí una palabra de aliento, los que me enseñan con palabras y hechos que la vida es equilibrio, bondad, paciencia y empatía. A ustedes mis padres.

A mis abuelos, quienes hasta en sus últimos días creyeron en mí, quienes quisieron verme triunfar en la vida y cada día me enseñaron a ser mejor persona y a quienes siempre vivirán en mi mente y corazón.

A mi amada familia quienes siempre han estado en los mejores y peores momentos con sus palabras de aliento y su apoyo incondicional.

A mis amigos gracias por su apoyo que sin esperar nada a cambio compartieron sus conocimientos, alegrías y tristezas.

Marco

*“La dicha de la vida consiste en tener siempre algo que hacer, alguien a quien amar y alguna cosa que esperar”.*

Thomas Chalmers

## **ANEXO F**

---

### **AGRADECIMIENTO**

A Dios y a la Madre Dolorosa, por darme salud y permitirme sonreír ante mis logros y cuando he caído me han puesto a prueba, de esta manera he aprendido de mis errores y he sido mejor cada día.

A mis padres Luis y Corona, mis hermanos José y Kamilly, que están siempre presentes apoyándome en todas las circunstancias de mi vida.

A Michelle Garzón por su alegría y por apoyo incondicional.

A mi tutor Juan Carlos Navarro por el apoyo técnico y la orientación en la consecución de este trabajo, y por compartir con generosidad sus conocimientos conmigo.

A la Universidad Internacional SEK, por darme la oportunidad de culminar mis estudios con un amplio conocimiento.

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

**SALUD GLOBAL**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

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

Artículo de tesis

# Taxonomía filogenética y molecular de *Trypanosoma* spp con marcadores de ADN 18S ITS y Catepsina L

Marco Camacho <sup>1</sup>, José Rubén Ramírez<sup>1,2,\*</sup>, Juan Carlos Navarro<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Internacional SEK, Maestría en Biomedicina, Facultad de Ciencias de la Salud;

[crcarrera.mbme@uisek.edu.ec](mailto:crcarrera.mbme@uisek.edu.ec); [juancarlos.navarro@uisek.edu.ec](mailto:juancarlos.navarro@uisek.edu.ec)

<sup>2</sup>Universidad Internacional SEK, Grupo de Enfermedades Emergentes, Desatendidas, Ecoepidemiología y Biodiversidad, Facultad de Ciencias de la Salud; [juancarlos.navarro@uisek.edu.ec](mailto:juancarlos.navarro@uisek.edu.ec)

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

**Resumen:** Las enfermedades causadas por *Trypanosoma* spp son una de las causas de muerte en los países tropicales, siendo estos parásitos transmitidos principalmente por insectos chupadores de sangre. El género *Trypanosoma* se ha convertido en un agente zoonótico que afecta a animales domésticos y silvestre, así como a humanos tangencialmente. Ecuador es un país que se encuentra ubicado en una región con presencia de enfermedades tropicales y zoonóticas, no existen suficientes datos que muestre un panorama más completo de estas enfermedades. La falta de un "Gold Estándar" para una identificación de diferentes tripanosomas, ha sido un problema para la obtención de datos, por eso se han desarrollado diferentes marcadores moleculares que son dirigidos hacia diferentes regiones del genoma de estos parásitos. Entre estos marcadores se encuentran el espaciador transcrita (ITS), proteína tipo catepsina L (CatL) y la subunidad pequeña 18SrRNA y en conjunto crear una matriz filogenética para la identificación de *Trypanosoma* spp. Se uso el programa MEGA 11 para el alineamiento de las secuencias obtenidas, se construyó de cada marcador un árbol filogenético con el método de Parsimonia Máxima. Como resultado se obtuvo de cada uno de los marcadores moleculares varios árboles parsimoniosos, se escogió el que más relación presentaba y con un alto de bootstrap, de esta manera pudiendo validar la matriz creada para la diferenciación filogenética de cada tripanosoma.

**Palabras clave:** *Trypanosoma* spp, marcadores moleculares ITS, catL, 18srRNA, Ecuador, Filogenética

**Abstract:** Diseases caused by *Trypanosoma* spp are one of the causes of death in tropical countries, these parasites being transmitted mainly by blood-sucking insects. The *Trypanosoma* genus has become a zoonotic agent that affects domestic and wild animals, as well as humans tangentially. Ecuador is a country that is located in a region with the presence of tropical and zoonotic diseases, there is not enough data to show a more complete picture of these diseases. The lack of a "Gold Standard" for the identification of different trypanosomes has been a problem for obtaining data, which is why different molecular markers have been developed that are directed towards different regions of the genome of these parasites. Among these markers are the transcribed spacer (ITS), cathepsin L-like protein (CatL) and the small subunit 18SrRNA and together create a phylogenetic matrix for the identification of *Trypanosoma* spp. The MEGA 11 program was used for the alignment of the obtained sequences, a phylogenetic tree was constructed from each marker with the Maximum Parsimony method. As a result, several parsimonious trees were obtained from each of the molecular markers, the one with the highest relationship and with a high bootstrap was chosen, thus being able to validate the matrix created for the phylogenetic differentiation of each trypanosome

**Keywords:** *Trypanosoma* spp, ITS molecular markers, catL, 18srRNA, Ecuador, Phylogenetics

## 1. Introducción

Entre las enfermedades infecciosas desatendidas (EID) se encuentran aquellas transmitidas por vectores (insectos), las cuales van a afectar principalmente a las poblaciones que no tienen acceso óptimo a los servicios de salud y viven en áreas rurales (Schneider et al., 2011).

Las EID en la actualidad son las que persisten en las comunidades más pobres del mundo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que alrededor de 1000 millones de personas sufren alguna de esas enfermedades o viven en zonas de alto riesgo (Organización Panamericana de la Salud, 2016).

Las EID como la enfermedad de Chagas, la fascioliasis, las helmintiasis, la lepra, la leishmaniasis, la filariasis linfática, la oncocercosis, la peste, la rabia humana, la esquistosomiasis, la sífilis congénita, el tétanos neonatal y el tracoma forman un grupo de enfermedades que en la actualidad están afectando a más mil millones de personas, representando un 12% en el mundo en los países tropicales y subtropicales (Organización Panamericana de la Salud, 2016; Varikuti et al., 2018).

En el presente trabajo, nos enfocamos en enfermedades causadas por *Trypanosoma* spp; los tripanosomas son parásitos protozoarios que son transmitidos principalmente por insectos chupadores de sangre (hematófagos), por vías transcutáneas y transmembrana, vía oral, venérea, entre otras (Marc Desquesnes et al., 2022; Truc et al., 2013).

El género *Trypanosoma* se encuentra distribuido a nivel mundial llegando a afectar a humanos, animales o ambos, como agentes zoonóticos. La tripanosomosis son un conjunto de enfermedades importantes de los mamíferos domésticos y salvajes que llegan a afectar en África, América y Asia. Por otra parte, la tripanosomiasis afecta a humanos en África y América Latina (Marc Desquesnes et al., 2022; Truc et al., 2013).

Las especies causantes de la tripanosomosis son: *T. aviium* afecta a las aves (Votýpka et al., 2002). *T. carassi* infecta principalmente a los peces (McAllister et al., 2019), *T. congolense* causante de la tripanosomiasis animal africana o nagana que infectan al ganado (Gibson et al., 2017). *T. equiperdum* causante de la durina, una enfermedad contagiosa crónica o aguda en los caballos (Luciani et al., 2018). *T. rotatorium* se encuentra presente en ranas (Desser et al., 1973; Hysek & Zizka, 1976), *T. dionisii* es un parásito presente en casi todos los biomas y se encuentra en América, Europa y Asia que llega a infectar principalmente a los murciélagos (Barros et al., 2020). *T. suis* se presenta en los cerdos salvajes causante de la surra en los animales, no es patógeno para el humano (Rodrigues et al., 2020). *T. theileri* como parásito oportunista que tiene como hospedadores a los rumiantes tanto domésticos y salvajes incluidos a los búfalos, ovejas, cabras, ciervos y antílopes (M. Desquesnes & Dávila, 2002). *T. grayi* se encuentra en el torrente sanguíneo de los cocodrilos (Kelly et al., 2014). *T. lainsoni* es un tripanosoma que llega a afectar a los lagartos, serpientes, roedores y marsupiales encontrado en la región amazónica (Díaz et al., 2020). *T. godfreyi* es un parásito que infecta a los animales domésticos y salvajes fue descubierto por David Godfrey (Gibson, 1999). *T. trinape-rronei* llega a afectar a bovinos y ciervos (Brotánková et al., 2022). *T. lewisi* se lo considera como un parásito cosmopolita específico que se encuentra en ratas (Calzolari et al., 2018; Li et al., 2020). *T. terrestris* es una especie selvática que fue descrita en el 2013 y se encuentra relacionada con tapires de tierras bajas (Pérez et al., 2019). *T. erneyi* se encuentra en los murciélagos y está restringido al continente Americano (Lima et al., 2012). *T. melophagium* no es patógeno, pero en ovejas posee una amplia distribución (Nalbantoğlu &

Karaer, 2008). *T. vivax* responsable de la enfermedad conocida como sequera en animales domésticos y silvestres (Jones & Alberto, 2001) . *T. simiae* causante de enfermedades en cerdos domésticos en África (Zweygarth et al., 1993).

Los especies de *Trypanosoma* que producen la tripanosomiasis son: *T. cruzi* causante de la enfermedad de Chagas (Miao & Ndao, 2014). *T. rangeli* infecta a humanos, aunque en países latinoamericanos se le considera no patógeno (Guhl & Vallejo, 2003). Los tripanosomatidos que afectan a los animales y a humanos son: *T. brucei* que se divide en dos subespecies *T. brucei gambiense* o *T. b. rhodesiense*, que afecta al ser humano y el causante de la enfermedad en animales (Gabriela Romero-Meza, Monica R. Mugnier, 2016). *T. evansi* se le asocia con el déficit de apolipoproteína L1 responsable de la surra en animales (Ereقات et al., 2020).

La distribución de estas enfermedades esta determinada por un conjunto de factores ecológicos, demográficos, medioambientales y sociales, convirtiéndose así en un problema de salud pública en países en vías de desarrollo en Asia, África, y en América (Infections & Management, 2014; World Health Organization, 2014). Entre seis y ocho millones de personas que son infectadas en el mundo con *Trypanosoma*, la principal concentración se encuentra en América Latina, con un aproximado de 25 millones de personas que viven en áreas de alto riesgo, tan sólo en el 2008 se reportaron 10.000 muertes relacionadas con tripanosomas (Gestal et al., 2015).

La ausencia de un “Gold Standard” para la detección e identificación de los diferentes tripanosomas, ha causado una falta de apoyo en la obtención de datos. Es por ello que se han desarrollado diferentes marcadores moleculares para así ser dirigidos hacia diferentes regiones de los genes en estos parásitos. Por ello, es importante obtener un código genético ideal para la utilización en el proceso de detección e identificación de los tripanosomas el cual debería poseer las siguientes características: : una longitud óptima, debe de ser conservadora, filogenéticamente, cebadores universales y debe de ser confiable (Hutchinson & Stevens, 2018).

Para un diagnóstico molecular de enfermedades causadas por tripanosomátidos, hoy en día, existen varios marcadores de ADN, los cuales nos ayudan a diferenciar la taxonomía y filogenia molecular de cada una de las especies de acuerdo con las regiones que expresan. De esta forma, tenemos al espaciador transcrito (ITS), un fragmento del genoma no codante situado en el ADNr y que se intercala entre los genes ARNr. Las regiones ITS son indispensables en la producción de moléculas de ARNr (Goertzen et al., 2003; Tippery & Les, 2008). Proteína de tipo catepsina L (CatL) es una proteasa de cisteína la cual desempeña un papel importante en el metabolismo, infectividad, diferenciación celular, inmunidad y patogenicidad de los tripanosomas (Cortez et al., 2009). La subunidad pequeña 18S rRNA, (ssrRNA) pertenece al ARN ribosómico, la “S” en el 18 S es representativa de las unidades Svedberg. Es un componente de la subunidad pequeña ribosomal 40S de los ribosomas citoplasmáticos de las eucariotas (Meyer et al., 2010). Nuestra hipótesis subyacente es que las plataformas de secuencias para análisis filogenéticos nos proporcionarán un mecanismo de diagnóstico de amplicones obtenidos en el laboratorio, provenientes de muestras de campo de *Trypanosoma* spp, así como también información diferencial dependiendo del grado de conservación y variabilidad de los tres marcadores.

El objetivo de este trabajo es mejorar y fortalecer las herramientas orientadas al diagnóstico de las infecciones por tripanosomas en el Ecuador, empleando plataformas de identificación basada en análisis filogenéticos. De esta manera, se busca conseguir un mejor control a las infecciones provocadas por estos parásitos y conseguir un impacto significativo en “One Health”, preservando la salud humana, animal y

ambiental. Con base en esta premisa, el objetivo de este trabajo de investigación fue establecer una matriz filogenética para la identificación de *Trypanosoma* spp mediante el uso de marcadores de ADN 18S rRNA, ITS y Cat L.

## 2. Materiales and Métodos

### Construcción de banco de datos

Todas las secuencias se obtuvieron de los genomas parciales disponibles para los genes 18S rRNA, ITS y Cat L de tripanosomas pertenecientes al grupo *Salivaria* (*T. brucei*, *T. equiperdum*, *T. vivax*, *T. congolense*, *T. avium*, *T. carassi*, *T. simiae*, *T. evansi*, *T. grayi*) y los *Stercolarias* (*T. cruzi*, *T. trinaperronei*, *T. lainsoni*, *T. godfrey*, *T. erney*, *T. dionisii*, *T. lewisi*, *T. megalophagium*, *T. rangeli*, *T. theileri*), en GenBank por el servidor NCBI del Centro Nacional de Información Biotecnológica (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se consideró en el muestreo de secuencias el tipo de hospedador, el marcador molecular que identifica y el país de origen. La diversidad de secuencias y utilización de las mismas especies estuvo limitado por la disponibilidad de secuencias para cada porción de genoma. Los códigos de acceso e información de las especies/secuencias utilizadas se muestran en Tabla 1, Tabla 2 y Tabla 3.

### Alineamiento

Se utilizó el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis versión 11) (Tamura et al., 2021) para el alineamiento posicional de las secuencias en la búsqueda del mayor grado de homología, con parámetros de alineamiento de GOP (gap opening penalty) de 30.0 y de GEP (gap extension penalty) de 15.0. De esta forma se construyó una matriz de alineamiento para cada porción del genoma (18S, ITS y CatL) de manera de obtener una plataforma filogenética de diagnóstico, las cuales fueron validadas con secuencias obtenidas de amplicones por PCR realizadas en el laboratorio Contención UISEK, provenientes de muestras de bovinos de Limoncocha, Sucumbios, y equino de Gonzalo Diaz de Pineda, Napo; ambos en Ecuador.

### Análisis filogenéticos

Se utilizaron secuencias de *Leishmania chagasi* como grupo de referencia o outgroup para enraizar los árboles y obtener la transformación y optimización de caracteres.

Se construyeron árboles filogenéticos con el método o algoritmo de optimización y búsqueda de árboles por Parsimonia Máxima (MP) para la construcción de soluciones óptimas mediante árboles de Wagner y un barrido de ramas con TBR (Tree Bisection and Reconnection) para la búsqueda de islas de árboles más parsimoniosos, utilizando 500 pseudorélicas por el método de remuestreo de matriz Bootstrap (Felsenstein 1995) para determinar el nivel de confianza y apoyo de clados o grupos mediante protocolo realizado previamente (Carrillo et al 2021, Cisneros 2022)

## 3. Resultados.

### *Análisis del gen 18S rRNA*

Este análisis involucró 38 secuencias de nucleótidos con una matriz final de 295 pb. Se obtuvo un árbol filogenético de secuencias del género *Trypanosoma*. Se muestra en la Figura 1, el árbol N°1 de los siete árboles más parsimoniosos con una longitud de L=387, un índice de consistencia IC=0,91, índice de retención de IR=0,98, y el índice compuesto de 0,90, lo que indica alta homología entre las secuencias (91-98%).



<i>Trypanosoma theileri</i>	AY773681.1	Brazil	Cattle
<i>Trypanosoma vivax</i>	MH184518.1	San Antonio	Bovine
<i>Trypanosoma avium</i>	KJ415280.1	Spain	Cyanistes caeruleus
<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>	AB301938.1	Japan	Cervus
<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>	KX007997.1	N/R	Homo sapiens
<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i> gene	AB301939.1	Japan	N/R
<i>Trypanosoma carassii</i>	AJ271903.1	N/R	N/R
<i>Trypanosoma carassii</i>	AJ271907.1	N/R	N/R
<i>Trypanosoma congolense</i>	KP307025.1	Central African Republic	Glossina fuscipes fuscipes
<i>Trypanosoma congolense</i>	U22318.1	N/R	N/R
<i>Trypanosoma cruzi</i>	KX007998.1	N/R	Homo sapiens
<i>Trypanosoma cruzi</i>	KX227594.1	USA	Nycticeius humeralis
<i>Trypanosoma equiperdum</i>	KY609968.1	N/R	N/R
<i>Trypanosoma evansi</i>	AB301940.1	Japan	N/R
<i>Trypanosoma evansi</i>	MG919963.1	Brazil	Canis lupus familiaris
<i>Trypanosoma rangeli</i>	KY649114.1	N/R	N/R
<i>Trypanosoma theileri</i>	KF765802.1	N/R	Bison bonasus bonasus
<i>Trypanosoma theileri</i>	AY773679.1	Brazil	Cattle
<i>Trypanosoma theileri</i>	HQ664902.1	Venezuela	Buffalo
<i>Trypanosoma theileri</i>	HQ664904.1	Venezuela	Buffalo
<i>Trypanosoma theileri</i>	KF765801.1	N/R	Bison bonasus bonasus
<i>Trypanosoma theileri</i>	KF805973.1	N/R	Cervus elaphus
<i>Trypanosoma theileri</i>	AJ009164.1	N/R	Cattle
<i>Trypanosoma theileri</i>	HQ664903.1	Venezuela	Buffalo
<i>Trypanosoma trinaperronei</i>	MN752212	Venezuela	Odocoileus virginianus
<i>Trypanosoma vivax</i>	AY363165.1	Brazil	Pocone
<i>Trypanosoma vivax</i>	MH184516.1	N/R	Bovine
<i>Trypanosoma vivax</i>	MH184517.1	Brazil	bovine
18SC1LM9	No enviado a NCBI	Limoncocha, Sucubios, Ecuador	bovine
18SC1LM7	No enviado a NCBI	Limoncocha, Sucubios, Ecuador	bovine
18SC12M9	No enviado a NCBI	Limoncocha, Sucubios, Ecuador	bovine

\* 18SC1LM9; 18SC1LM7; 18SC12M9 Fueron consideradas como secuencias problema a identificar en el análisis.

### Análisis de Catepsina L

Este análisis involucró 30 secuencias de nucleótidos basado en secuencias de la proteína tipo Catepsina L con una matriz final de 165 pb. Se muestra el árbol N°1 de los 7 árboles más parsimoniosos con una longitud L=491, un índice de consistencia de IC= 0,59, índice de retención IR= 0,85, y el índice compuesto de 0,50.



<i>Trypanosoma brucei</i>	MT673765.1	Zambia	<i>Bos taurus</i>
<i>Trypanosoma congolense</i>	MT673782.1	Zambia	<i>Glossina morsitans centralis</i>
<i>Trypanosoma congolense</i>	MT673781.1	Zambia	<i>Glossina morsitans centralis</i>
<i>Trypanosoma congolense</i>	MT673780.1	Zambia	<i>Glossina morsitans centralis</i>
<i>Trypanosoma congolense</i>	MT673773.1	Zambia	<i>Glossina morsitans centralis</i>
<i>Trypanosoma cruzi</i>	MK005291.1	Venezuela	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>Trypanosoma cruzi</i>	MK005290.1	Venezuela	<i>Xenopsylla cheopis</i>
<i>Trypanosoma godfreyi</i>	MT673757.1	Zambia	<i>Glossina morsitans centralis</i>
<i>Trypanosoma lainsoni</i>	MF433033.1	Brazil	<i>Orizomys ruscatus</i>
<i>Trypanosoma lewisi</i>	MF433032.1	Mozambique	<i>Gerbilliscus leucogaster</i>
<i>Trypanosoma lewisi</i>	MF433031.1	Mozambique	<i>Gerbilliscus leucogaster</i>
<i>Trypanosoma melophagium</i>	MN756797.1	Croatia	<i>Melophagus ovinus</i>
<i>Trypanosoma melophagium</i>	MN756796.1	Croatia	<i>Melophagus ovinus</i>
<i>Trypanosoma simiae</i>	MT673778.1	Zambia	<i>Glossina morsitans centralis</i>
<i>Trypanosoma simiae</i>	MT673770.1	Zambia	<i>Glossina morsitans centralis</i>
<i>Trypanosoma theileri</i>	HQ543075.1	Thailandia	Cattle
<i>Trypanosoma theileri</i>	HQ543074.1	Thailandia	Cattle
<i>Trypanosoma theileri</i>	HQ543073.1	Thailandia	Cattle
<i>Trypanosoma theileri</i>	HQ543072.1	Thailandia	Cattle
<i>Trypanosoma theileri</i>	HQ543071.1	Thailandia	Cattle
<i>Trypanosoma theileri</i>	HQ543070.1	Thailandia	Cattle
<i>Trypanosoma trinaperronei</i>	MN747155.1	Venezuela	<i>Lipoptena mazamae</i>
<i>Trypanosoma trinaperronei</i>	MN747154.1	Venezuela	<i>L. mazamae</i>
<i>Trypanosoma vivax</i>	MT673783.1	Zambia	<i>Glossina morsitans centralis</i>
<i>Trypanosoma vivax</i>	MT673777.1	Zambia	<i>G. morsitans centralis</i>
CatLC2LM12	No enviado a NCBI	Limoncocha, Ecuador	bovino
CatLC1LM12	No enviado a NCBI	Limoncocha, Ecuador	bovino
CatLC1LM9	No enviado a NCBI	Limoncocha, Ecuador	bovino
PVM178CatLtv	No enviado a NCBI	PV Maldonado, Ecuador	canino

\* PVM178CatLtv; CatLC1LM9; CatLC1LM12; CatLC2LM12 Fueron consideradas como secuencias problema a identificar en el análisis.

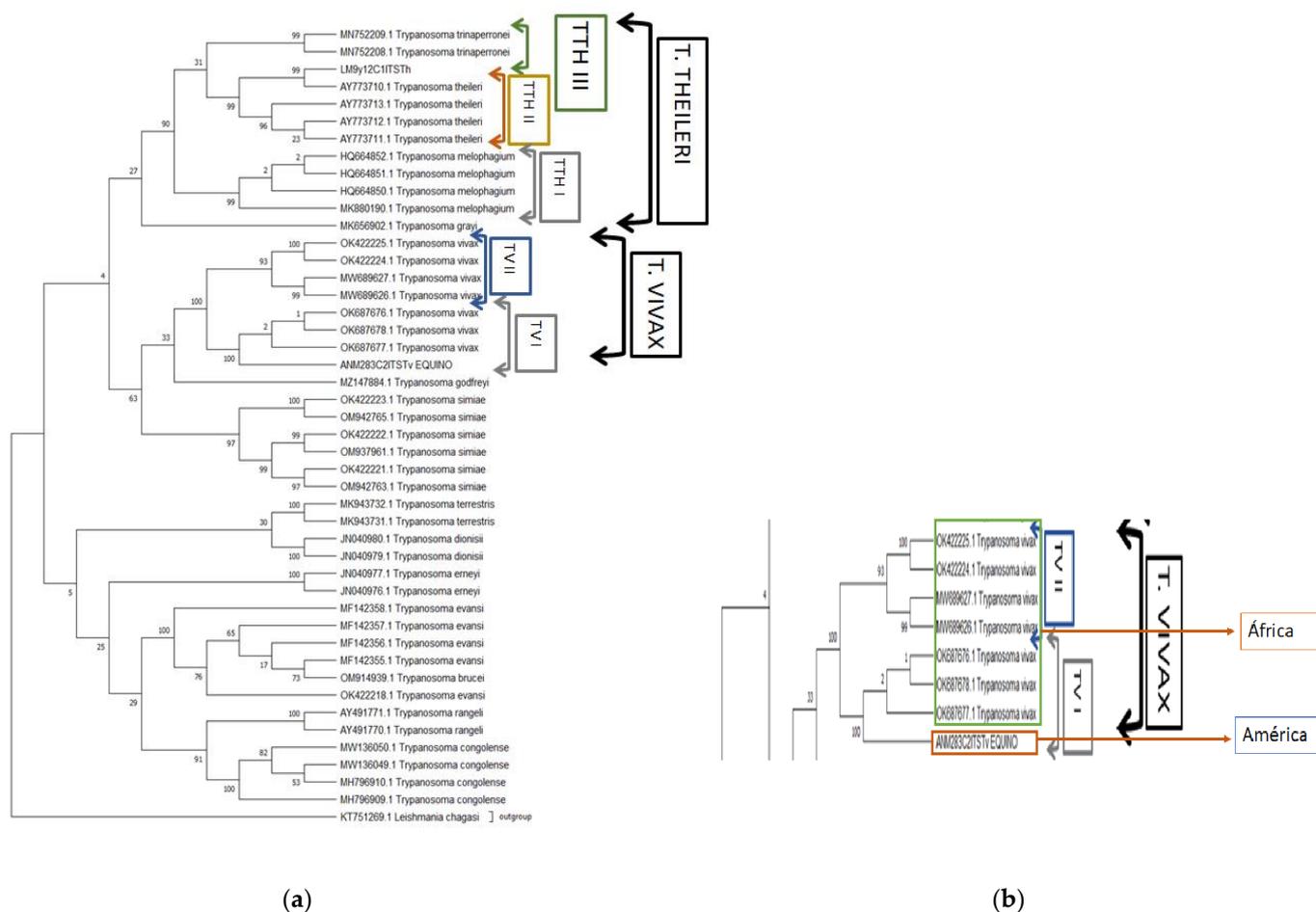
### Análisis de ITS ADNr

Este análisis involucró 46 secuencias de nucleótidos basado en secuencias del marcador ribosomal ITS con una matriz final de 149 pb. Se muestra el árbol N°1 de los 2 árboles más parsimoniosos con una longitud de  $L=847$ , un índice de consistencia de  $IC=0,44$ , el índice de retención de  $IR=0,81$  y el índice compuesto de  $IC=0,36$ .

La Figura 2, muestra la base del árbol filogenético de *Trypanosoma* spp como grupo externo a la *Leishmania chagasi* mostrando la monofilia de *Trypanosoma*.

La topología de ITS muestra un bajo apoyo basal de los clados (bootstrap menores a 50%), sugiriendo mayor variabilidad del marcador y menos capacidad de identificación de clados. Sin embargo se observa un apoyo interno de los clados *congolense* + *rangeli* y *evansi* + *brucei*. Igualmente sucede para los subclados internos de *simiae* (97%) y *vivax* (100%) incluyendo en éste último la muestra de laboratorio ANM283C2ITStv proveniente de un equino de Gonzalo Diaz de Pineda en Napo, Ecuador.

El clado mas interno de la topología muestra al Complejo Theileri con secuencias de Th3 basal y Th2 y Th1 mas internas. La secuencia LM9y12C1ITStH proveniente de bovino de Limoncocha se ubicó en el grupo de Th2 con un 99% de bootstrap.



**Figura 3.** (a) Árbol filogenético resultante por Parsimonia Máxima para *Trypanosoma* spp en conjunto con el marcador molecular ITS; (b) subclado a nivel geográfico

**Table 3.** Secuencias de *Trypanosoma* spp que se usaron para generar el alineamiento para el gen ITS

ESPECIE	Código de acceso GenBank	País	Hospedador
<i>Leishmania chagasi</i>	KT751269.1	Yemen	Homo sapien
<i>Trypanosoma trinaperronei</i>	MN752209.1	Venezuela	Odocoileus virgini- nianus
<i>Trypanosoma trinaperronei</i>	MN752208.1	Venezuela	Odocoileus virgini- nianus
<i>Trypanosoma terrestris</i>	MK943732.1	Brazil	Tapirus terrestris
<i>Trypanosoma terrestris</i>	MK943731.1	Brazil	Tapirus terrestris
<i>Trypanosoma dionisii</i>	JN040980.1	Brazil	Promops sp.
<i>Trypanosoma dionisii</i>	JN040979.1	Brazil	Molossus molos- sus
<i>Trypanosoma erneyi</i>	JN040977.1	Mozambique	Mops condylurus
<i>Trypanosoma erneyi</i>	JN040976.1	Mozambique	Mops condylurus
<i>Trypanosoma theileri</i>	AY773713.1	Brazil	Cattle
<i>Trypanosoma theileri</i>	AY773712.1	Brazil	Cattle
<i>Trypanosoma theileri</i>	AY773711.1	Brazil	Cattle
<i>Trypanosoma theileri</i>	AY773710.1	Brazil	Cattle
<i>Trypanosoma grayi</i>	MK656902.1	Cameroon	Cattle
<i>Trypanosoma evansi</i>	MF142358.1	Colombia	Cattle
<i>Trypanosoma evansi</i>	MF142357.1	Colombia	Cattle
<i>Trypanosoma evansi</i>	MF142356.1	Colombia	Cattle
<i>Trypanosoma evansi</i>	MF142355.1	Colombia	Tabanus sp
<i>Trypanosoma rangeli</i>	AY491771.1	N/R	Saimiri
<i>Trypanosoma rangeli</i>	AY491770.1	N/R	N/R
<i>Trypanosoma vivax</i>	OK422225.1	Rwanda	<i>Glossina morsitans</i> <i>centralis</i>
<i>Trypanosoma vivax</i>	OK422224.1	Rwanda	<i>Glossina pallidipes</i>
<i>Trypanosoma simiae</i>	OK422223.1	Rwanda	<i>G morsitans cen-</i> <i>tralis</i>
<i>Trypanosoma simiae</i>	OK422222.1	Rwanda	<i>G morsitans cen-</i> <i>tralis</i>
<i>Trypanosoma simiae</i>	OK422221.1	Rwanda	<i>Glossina pallidipes</i>
<i>Trypanosoma evansi</i>	OK422218.1	Rwanda	<i>G morsitans cen-</i> <i>tralis</i>
<i>Trypanosoma vivax</i>	MW689627.1	Kenya	<i>Glossina pallidipe</i>
<i>Trypanosoma vivax</i>	MW689626.1	Kenya	<i>Glossina pallidipes</i>
<i>Trypanosoma congolense</i>	MG255218.1	Cameroon	<i>G morsitans sub-</i> <i>morsitans</i>
<i>Trypanosoma melophagium</i>	HQ664852.1	Croatia	<i>Melophagus ovinus</i>
<i>Trypanosoma melophagium</i>	HQ664851.1	Croatia	<i>Melophagus ovinus</i>
<i>Trypanosoma melophagium</i>	HQ664850.1	Croatia	<i>Melophagus ovinus</i>
<i>Trypanosoma simiae</i>	OM942763.1	Kenya	<i>Glossina pallidipes</i>
<i>Trypanosoma simiae</i>	OM942765.1	Kenya	<i>Glossina pallidipes</i>
<i>Trypanosoma simiae</i>	OM937961.1	Kenya	<i>Glossina pallidipes</i>
<i>Trypanosoma brucei</i>	OM914939.1	Kenya	<i>Glossina pallidipes</i>
<i>Trypanosoma vivax</i>	OK687676.1	Nigeria	Cattle
<i>Trypanosoma vivax</i>	OK687677.1	Nigeria	Cattle
<i>Trypanosoma vivax</i>	OK687678.1	Nigeria	Cattle

<i>Trypanosoma godfreyi</i>	MZ147884.1	Chad	Tsetse
<i>Trypanosoma congolense</i>	MW136050.1	N/R	N/R
<i>Trypanosoma congolense</i>	MW136049.1	N/R	N/R
<i>Trypanosoma melophagium</i>	MK880190.1	Kenya	Hippobosca camelina
<i>Trypanosoma congolense</i>	MH796909.1	N/R	N/R
<i>Trypanosoma congolense</i>	MH796910.1	N/R	N/R
LM9y12C1ITSTh	No enviado a NCBI	Limoncocha, Ecuador	bovine
ANM283C2ITSTv	No enviado a NCBI	Napo, Ecuador	equine

\* ANM283C2ITSTv y LM9y12C1ITSTh Fueron consideradas como secuencias problema a identificar en el análisis.

#### 4. Discusión y conclusiones

Las tres topologías correspondientes a los marcadores moleculares analizados muestran una marcada estructura filogenética, con *Leishmania* como grupo externo y mostrando las especies de *Trypanosoma* como grupo interno monofilético. La estructura de clados es concordante con la clasificación conocida del género, lo que demuestra que son plataformas filogenéticas consistentes y para el uso de diagnóstico con información mas apoyada estadísticamente para 18S y CatL, ambos marcadores muestran ser mas conservados. ITS sugiere ser mas variable por la topología interna distinta y por tener un bajo apoyo de bootstrap en las ramas basales.

*T. cruzi* se muestra como la especie mas basal en 18S y CatL, mientras que se observa en las tres topología un clado concordante con el Complejo Theileri, con secuencias de *theileri*, *melophagium* y *trinaperronei* similar a los reportado por Brotánková et al., 2022. Esta clasificación de Th1, Th2 y Th3 deberá ser corroborada posteriormente con los trabajos de Garcia et al 2011 con CatL y Rodríguez et al 2005 con ITS.

Las muestras obtenidas en laboratorio de amplicones de *Trypanosoma* para los tres marcadores, validaron la plataforma filogenética al ubicarse en las topología con *T. theileri* y *T. vivax*, demostrando y comprobando su utilidad para el diagnóstico de diferentes especies, para lo cual se sugiere incrementar la diversidad en lo posible con mas secuencias depositadas en genbank.

Adicionalmente, estos resultados abren las puertas para un estudio detallado de la presencia de especies de trypanosomas en Ecuador bajo esta metodología y un análisis del estatus taxonómico del Complejo Theileri.

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

**Financiamiento/Fondos:** Esta investigación fue financiada por por la DII-UISEK-P011617\_2 (JCN y JRR), Proyecto Artropodos CIZ (Sandra Enríquez).

**Agradecimientos:** Al Centro Internacional de Zoonosis, CIZ de la Universidad Central del Ecuador y su Directora Maritza Celi; Sandra Enríquez de la Unidad de Entomología Aplicada del CIZ-UCE, quien formará parte de las coautorías de este artículo.

**Conflictos de Interés:** “Los autores declaran no tener conflicto de interés”.

## Referencias citadas

- Barros, J. H. da S., Roque, A. L. R., Xavier, S. C. D. C., Nascimento, K. C. S., Toma, H. K., & Madeira, M. de F. (2020). Biological and genetic heterogeneity in trypanosoma dionisii isolates from hematophagous and insectivorous bats. *Pathogens*, 9(9), 1–12. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090736>
- Brotánková, A., Fialová, M., Čepička, I., Brzoňová, J., & Svobodová, M. (2022). Trypanosomes of the *Trypanosoma theileri* Group: Phylogeny and New Potential Vectors. *Microorganisms*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020294>
- Calzolari, M., Rugna, G., Clementi, E., Carra, E., Pinna, M., Bergamini, F., Fabbi, M., Dottori, M., Sacchi, L., & Votýpka, J. (2018). Isolation of a trypanosome related to *trypanosoma theileri* (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) from *Phlebotomus perfiliewi* (Diptera: Psychodidae). *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/2597074>
- Cortez, A. P., Rodrigues, A. C., Garcia, H. A., Neves, L., Batista, J. S., Bengaly, Z., Paiva, F., & 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>
- 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)
- Desquesnes, Marc, Gonzatti, M., Sazmand, A., Thévenon, S., Bossard, G., Boulangé, A., Gimonneau, G., Truc, P., Herder, S., Ravel, S., Sereno, D., Jamonneau, V., Jittapalpong, S., Jacquiet, P., Solano, P., & Berthier, D. (2022). A review on the diagnosis of animal trypanosomoses. *Parasites & Vectors*, 15(1), 1–24. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05190-1>
- Desser, S. S., McIver, S. B., & Ryckman, A. (1973). *Culex territans* as a potential vector of *Trypanosoma rotatorium*. I. Development of the flagellate in the mosquito. *The Journal of Parasitology*, 59(2), 353–358. <https://doi.org/10.2307/3278833>
- Díaz, A. G., Ragone, P. G., Rusman, F., Florida-Yapur, N., Barquez, R. M., Díaz, M. M., Tomasini, N., & Diosque, P. (2020). A novel genotype and first record of *trypanosoma lainsoni* in Argentina. *Pathogens*, 9(9), 1–11. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090731>
- Erekat, S., Nasereddin, A., Al-Jawabreh, A., Al-Jawabreh, H., Al-Laham, N., & Abdeen, Z. (2020). Prevalence of *Trypanosoma evansi* in livestock in Palestine. *Parasites and Vectors*, 13(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3894-9>
- Gabriela Romero-Meza, Monica R. Mugnier. (2016). *Trypanosoma brucei*. HHS Public Access, 176(1), 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.10.007>. *Trypanosoma*
- Gestal, M. C., Holban, A. M., Escalante, S., & Cevallos, M. (2015). Epidemiology of Tropical Neglected Diseases in Ecuador in the Last 20 Years. 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138311>
- Gibson, W. (1999). MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF AFRICAN TRYPANOSOMIASIS: THE CONTRIBUTIONS OF DAVID GEORGE GODFREY OBE TO THE BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF TRYPANOSOMES. *International Review of Hydrobiology*, 84(6), 627–628.
- Gibson, W., Kay, C., & Peacock, L. (2017). *Trypanosoma congolense*: Molecular Toolkit and Resources for Studying a Major Livestock Pathogen and Model Trypanosome. *Advances in Parasitology*, 98, 283–309. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2017.03.002>
- Goertzen, L. R., Cannone, J. J., Gutell, R. R., & Jansen, R. K. (2003). ITS secondary structure derived from comparative analysis: Implications for sequence alignment and phylogeny of the Asteraceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(2), 216–234. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00094-0](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00094-0)
- Guhl, F., & Vallejo, G. A. (2003). *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920 - An Updated Review. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(4), 435–442. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000400001>
- Hutchinson, R., & Stevens, J. R. (2018). Barcoding in trypanosomes. *Parasitology*, 145(5), 563–573. <https://doi.org/10.1017/S0031182017002049>
- Hysek, J., & Zizka, Z. (1976). Transmission of *Trypanosoma rotatorium* from frogs to white mice. *Nature*, 260(5552), 608–609. <https://doi.org/10.1038/260608a0>
- Infecciones, F. P., & Management, T. (2014). INFECCIONES POR PARÁSITOS MÁS. 25(3), 485–528.
- Jones, T. W., & Alberto, M. R. D. (2001). Jones 2001 *Trypanosoma vivax*—out of Africa. 17(2), 2000–2002.
- Kelly, S., Ivens, A., Manna, P. T., Gibson, W., & Field, M. C. (2014). A draft genome for the African crocodylian trypanosome *Trypanosoma grayi*. *Scientific Data*, 1, 1–7. <https://doi.org/10.1038/sdata.2014.24>
- Li, S. J., Zhang, X., Lukeš, J., Li, B. Q., Wang, J. F., Qu, L. H., Hide, G., Lai, D. H., & Lun, Z. R. (2020). Novel organization of mitochondrial minicircles and guide RNAs in the zoonotic pathogen *Trypanosoma lewisi*. *Nucleic Acids Research*, 48(17), 9747–9761. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa700>

22. Lima, L., Silva, F. M. da, Neves, L., Attias, M., Takata, C. S. A., Campaner, M., de Souza, W., Hamilton, P. B., & Teixeira, M. M. G. (2012). Evolutionary Insights from Bat Trypanosomes: Morphological, Developmental and Phylogenetic Evidence of a New Species, *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *erneyi* sp. nov., in African Bats Closely Related to *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi* and Allied Species. *Protist*, 163(6), 856–872. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2011.12.003>
23. Luciani, M., Di Febo, T., Orsini, M., Krasteva, I., Cattaneo, A., Vulpiani, M. P., Di Pancrazio, C., Bachi, A., & Tittarelli, M. (2018). *Trypanosoma equiperdum* low molecular weight proteins as candidates for specific serological diagnosis of dourine. *Frontiers in Veterinary Science*, 5(MAR), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00040>
24. McAllister, M., Phillips, N., & Belosevic, M. (2019). *Trypanosoma carassii* infection in goldfish (*Carassius auratus* L.): changes in the expression of erythropoiesis and anemia regulatory genes. *Parasitology Research*, 118(4), 1147–1158. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06246-5>
25. Meyer, A., Todt, C., Mikkelsen, N. T., & Lieb, B. (2010). Fast evolving 18S rRNA sequences from Solenogastres (Mollusca) resist standard PCR amplification and give new insights into mollusk substitution rate heterogeneity. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-70>
26. Miao, Q., & Ndao, M. (2014). *Trypanosoma cruzi* Infection and Host Lipid Metabolism. *Mediators of Inflammation*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/902038>
27. Nalbantoğlu, S., & Karaer, Z. (2008). *Trypanosoma melophagium* in blood cell culture. *Ankara Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 55(3), 173–176. [https://doi.org/10.1501/vetfak\\_0000000325](https://doi.org/10.1501/vetfak_0000000325)
28. Organización Panamericana de la Salud. (2016). Enfermedades Infecciosas Desatendidas en las Américas: Historia de éxito e innovación para llegar a los más necesitados. In Washington, DC : OPS.
29. Pérez, S. D., Grummer, J. A., Fernandes-Santos, R. C., José, C. T., Medici, E. P., & Marcili, A. (2019). Phylogenetics, patterns of genetic variation and population dynamics of *Trypanosoma terrestris* support both coevolution and ecological host-fitting as processes driving trypanosome evolution. *Parasites and Vectors*, 12(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3726-y>
30. Rodrigues, C. M. F., Garcia, H. A., Rodrigues, A. C., Pereira, D. L., Pereira, C. L., Viola, L. B., Neves, L., Camargo, E. P., Gibson, W., & Teixeira, M. M. G. (2020). Expanding our knowledge on African trypanosomes of the subgenus *Pycnomonas*: A novel *Trypanosoma suis*-like in tsetse flies, livestock and wild ruminants sympatric with *Trypanosoma suis* in Mozambique. *Infection, Genetics and Evolution*, 78(September 2019), 104143. <https://doi.org/10.1016/j.mee-gid.2019.104143>
31. Schneider, M. C., Aguilera, X. P., da Silva Junior, J. B., Ault, S. K., Najera, P., Martinez, J., Requejo, R., Nicholls, R. S., Yadon, Z., Silva, J. C., Leanes, L. F., & Periago, M. R. (2011). Elimination of neglected diseases in Latin America and the Caribbean: A mapping of selected diseases. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000964>
32. Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
33. Tippery, N. P., & Les, D. H. (2008). Phylogenetic analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region in Menyanthaceae using predicted secondary structure. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49(2), 526–537. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.07.019>
34. Truc, P., Büscher, P., Cuny, G., Gonzatti, M. I., Jannin, J., Joshi, P., Juyal, P., Lun, Z. R., Mattioli, R., Pays, E., Simarro, P. P., Teixeira, M. M. G., Touratier, L., Vincendeau, P., & Desquesnes, M. (2013). Atypical Human Infections by Animal Trypanosomes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002256>
35. Varikuti, S., Jha, B. K., Volpedo, G., Ryan, N. M., Halsey, G., Hamza, O. M., McGwire, B. S., & Satoskar, A. R. (2018). Host-directed drug therapies for neglected tropical diseases caused by protozoan parasites. *Frontiers in Microbiology*, 9(NOV), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02655>
36. Votýpka, J., Oborník, M., Volf, P., Svobodová, M., & Lukeš, J. (2002). *Trypanosoma avium* of raptors (Falconiformes): Phylogeny and identification of vectors. *Parasitology*, 125(3), 253–263. <https://doi.org/10.1017/S0031182002002093>
37. World Health Organization. (2014). Información sobre las enfermedades transmitidas por vectores. Campañas Mundiales de Salud Pública de La OMS. <https://www.who.int/campaigns/world-health-day/2014/vector-borne-diseases/es/>
38. Zweggarth, E., Moloo, S. K., & Kaminsky, R. (1993). *Trypanosoma simiae*: In vitro studies on drug susceptibility. *Acta Tropica*, 54(3–4), 301–308. [https://doi.org/10.1016/0001-706X\(93\)90102-H](https://doi.org/10.1016/0001-706X(93)90102-H)