

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Caracterización preliminar de parásitos intestinales de  
*Cebuella pygmaea***

**Stefanie Uksmara Proaño Arias**

**Biología**

Trabajo de integración curricular presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Licenciada en Biología

Quito, 19 de diciembre de 2019

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ  
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y  
AMBIENTALES

**HOJA DE CALIFICACIÓN  
DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

**Caracterización preliminar de parásitos intestinales de *Cebuella  
pygmaea***

**Stefanie Uksmara Proaño Arias**

**Calificación:**

**Nombre del profesor, título académico**

**Stella de la Torre, Ph.D.**

**Firma del profesor:**

\_\_\_\_\_

Quito, 19 de diciembre de 2019

## Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: \_\_\_\_\_

Nombres y apellidos: Stefanie Uksmara Proaño Arias

Código: 00115040

Cédula de identidad: 1803644853

Lugar y fecha: Quito, 19 de diciembre de 2019

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por darme la fortaleza para seguir adelante y permitirme culminar una etapa más de mi vida.

A mi madre, Margoth, por ser mi mayor apoyo, por sus enseñanzas y su gran amor a lo largo de toda mi vida.

A mi hija, Isabella, por ser mi mayor motivación para luchar cada día y por ser el motivo de mi felicidad.

A Stella de la Torre, directora de mi trabajo de titulación, por su paciencia y enseñanzas impartidas durante el desarrollo de mi investigación.

A Sonia Zapata y Juan Mosquera, por su paciencia y conocimientos impartidos durante la fase de laboratorio de mi investigación.

Al Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito por permitirme el uso de sus instalaciones y recursos para el desarrollo de mi proyecto.

A Pablito y Doña Mari por darme su apoyo a lo largo de toda mi carrera.

## RESUMEN

El leoncillo, *Cebuella pygmaea*, es un pequeño primate que habita en bosques de galería de la Amazonía alta. Su alimentación es muy especializada, basada principalmente en exudados y en presas animales. Su estado de conservación en Ecuador es Vulnerable, siendo su principal amenaza la deforestación. La creciente presencia de los seres humanos en el hábitat del leoncillo genera un mayor riesgo de transmisión de enfermedades para esta especie. Es poca la información registrada sobre las patologías que afectan a las poblaciones silvestres de leoncillos, pero en grupos en cautiverio se han registrado parásitos como *Cryptosporidium* spp. y *Giardia duodenalis*. En el presente estudio se realizó una caracterización preliminar de los parásitos intestinales de un grupo silvestre de leoncillos que desapareció mientras estaba siendo estudiado en la Estación de Biodiversidad Tiputini. Para determinar la presencia de *Cryptosporidium* spp. y *G. duodenalis* se analizó el ADN extraído de muestras de heces. Para detectar *G. duodenalis* se amplificó el gen de la  $\beta$ -giardina, para *Cryptosporidium* spp. se amplificó la región 18S del ARN ribosomal; después de la amplificación se realizó electroforesis. Las muestras positivas fueron secuenciadas y comparadas con secuencias de referencia del GenBank. Todas las muestras fueron negativas para *G. duodenalis*, posiblemente porque la EBT no está muy afectada por actividades antropogénicas. El 29% de las muestras presentó una banda para *Cryptosporidium* spp. Sin embargo, los resultados de las secuencias indicaron la presencia de los hongos *Trechispora alnicola*, *Peniophora cinerea* y *Auricularia cornea*, que no habían sido reportados en leoncillos. Estos hongos, que se encuentran principalmente en madera, podrían haber sido ingeridos accidentalmente por los leoncillos al hacer los huecos en la corteza de los árboles para acceder a sus exudados. Si bien en este estudio preliminar no fue posible encontrar evidencia de que la desaparición del grupo de leoncillos se debió a parásitos, es importante continuar con este tipo de investigaciones para conocer en qué medida el parasitismo regula las poblaciones de este primate. Este estudio fue realizado bajo el Contrato Marco MAE\_DNB\_2015\_0019 para Stella de la Torre.

**Palabras clave:** *Cebuella pygmaea*, parásitos intestinales, leoncillos, PCR, hongos.

## ABSTRACT

The pygmy marmoset, *Cebuella pygmaea*, is a small primate that inhabits gallery forests in the upper Amazon basin. Its diet is very specialized, based mainly on exudates and animal prey. Its conservation status in Ecuador is Vulnerable, deforestation being its main threat. The increasing presence of humans in the habitat of the pygmy marmoset generates a greater risk of disease transmission for this species. There is little information about the pathologies that affect wild populations of pygmy marmosets, but in captive groups parasites such as *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* have been reported. In our study we carried out a preliminary characterization of the intestinal parasites of a wild group of pygmy marmosets that disappeared while it was studied at the Tiputini Biodiversity Station. To determine the presence of *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* we analyzed DNA extracted from fecal samples. To detect *G. duodenalis* the  $\beta$ -giardine gene was amplified, for *Cryptosporidium* spp. the 18S region of the ribosomal RNA was amplified; after amplification, electrophoresis was done. Positive samples were sequenced and compared with GenBank reference sequences. All samples were negative for *G. duodenalis*, possibly because EBT is not very affected by anthropogenic activities. Twenty nine percent of the samples presented a band for *Cryptosporidium* spp. However, the results of the sequences indicated the presence of the fungi *Trechispora alnicola*, *Peniophora cinerea* and *Auricularia cornea*, which have not been reported previously in pygmy marmosets. These fungi, which are mainly found in wood, could have been accidentally ingested by the pygmy marmosets by gauging holes in the bark of the trees to obtain their exudates. Although in this preliminary study it was not possible to find evidence that the disappearance of the group of pygmy marmosets was due to parasites, it is important to continue with this type of research to know to what extent parasitism regulates the populations of this primate. This study was conducted under the MAE\_DNB\_2015\_0019 Contract for Stella de la Torre.

**Keywords:** *Cebuella pygmaea*, intestinal parasites, pygmy marmoset, PCR, fungi.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>10</b>
1.1. Familia Callitrichidae.....	10
1.2. <i>Cebuella pygmaea</i> .....	10
1.3. Parasitismo.....	11
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
2.1. Objetivo principal .....	13
2.2. Objetivos específicos .....	13
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>14</b>
<b>4. ÁREA DE ESTUDIO .....</b>	<b>15</b>
<b>5. SUJETOS DE ESTUDIO.....</b>	<b>15</b>
<b>6. MATERIALES .....</b>	<b>15</b>
6.1. Extracción de ADN.....	15
6.2. Amplificación por PCR de la región 18S del ARN ribosomal mediante primers específicos para la detección de parásitos intestinales (Apicomplexa: <i>Cryptosporidium</i> spp.) 16	16
6.3. Electroforesis en gel de agarosa .....	16
6.4. Amplificación por PCR del gen de la $\beta$ -giardina .....	17
6.5. Electroforesis en gel de agarosa .....	18
<b>7. MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
7.1. Extracción de ADN.....	19
7.2. Amplificación por PCR de la región 18S del ARN ribosomal para la detección de parásitos intestinales del Filo Apicomplexa .....	19
7.3. Amplificación por PCR del gen de la $\beta$ -giardina .....	20
<b>8. RESULTADOS .....</b>	<b>21</b>
8.1. Amplificación por PCR de la región 18S del ARN ribosomal para la detección de parásitos intestinales del Filo Apicomplexa .....	21
8.2. Amplificación por PCR del gen de la $\beta$ -giardina .....	22
<b>9. DISCUSIÓN.....</b>	<b>22</b>
<b>10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>25</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>26</b>
<b>12. ANEXOS.....</b>	<b>31</b>
12.1. Anexo 1: Datos de las muestras recolectadas .....	31
12.2. Anexo 2: Protocolo de extracción de ADN PowerSoil DNA Isolation Kit .....	32
12.3. Anexo 3: Figuras.....	33

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Datos de las muestras de heces recolectadas .....	31
---	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Árbol filogenético de las secuencias .....	21
<b>Figura 2.</b> Gel de agarosa del Filo Apicomplexa .....	33
<b>Figura 3.</b> Gel de agarosa del Filo Apicomplexa .....	34

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Familia Callitrichidae

Los primates de la familia Callitrichidae son pequeños y arbóreos. Se distribuyen en los bosques de Sudamérica, en Colombia, Bolivia, Brasil, Perú y Ecuador. Frecuentemente se hallan en simpatria con otros monos del Nuevo Mundo (Erkenswick et al., 2018).

### 1.2. *Cebuella pygmaea*

El leoncillo o tití pigmeo, *Cebuella pygmaea*, es el miembro más pequeño de la familia Callitrichidae (Townsend, 2001). Habita en bosques de galería, cerca de riveras o zonas inundadas, entre 220 y 450 msnm en la Amazonía alta (de la Torre et al., 2013; IUCN, 2008).

Vive en grupos de 2 a 9 individuos, con una hembra y un macho adultos; la hembra puede parir gemelos dos veces al año. Las crías son cuidadas por los demás miembros del grupo en lo que se conoce como un sistema de reproducción cooperativo (de la Torre y Snowdon, 2009; IUCN, 2008).

El tití pigmeo es uno de los primates neotropicales con alimentación más especializada (Yépez et al., 2005), ya que su dieta se basa en un 60-80% en exudados de lianas y árboles, y el resto en presas animales, principalmente insectos (Soini, 1982; Yépez et al., 2005), con una mínima proporción de flores y frutas (Porcel et al., 2010). Debido a su alimentación de exudados, sus dientes incisivos inferiores son cinceles afilados que apuntan ligeramente hacia adelante y adentro, lo que les permite excavar en la corteza de las plantas; su bóveda palatina, además, permite una mejor succión de los exudados (Townsend, 2001). Entre las especies de plantas que usan como fuentes de exudados están *Inga marginata*, *Inga ruiziana*, *Sterculia apetala*, *Cedrela odorata*, y *Spondias mombin* (de la Torre et al., 2013). Entre sus presas animales están saltamontes

(Orthoptera), abejas nativas (Hymenoptera), polillas (Lepidoptera), a veces mariposas diurnas (Lepidoptera) y libélulas (Odonata) (Townsend, 2001).

Las actividades antropogénicas tales como la tala indiscriminada de bosques, explotación petrolera, erosión del suelo, contaminación, caza, entre otros, está ocasionando la fragmentación de los ecosistemas amazónicos y cambios en el comportamiento de los individuos y la dinámica de las poblaciones. En varias especies de primates que habitan en bosques fragmentados se han reportado cambios en su comportamiento, que afectan a sus relaciones sociales, reproducción, alimentación y exposición a parásitos (Catenacci et al., 2016; Brinkworth y Pechenkina, 2013). Según el Libro Rojo de los Mamíferos del Ecuador (Tirira, 2011), el leoncillo se encuentra en estado Vulnerable debido a la destrucción de sus hábitats y al tráfico ilegal para el mercado de mascotas. Se desconoce, sin embargo, en qué medida la fragmentación de los bosques donde habita esta especie afecta a su carga parasítica. Este fue el tema de mi estudio.

### **1.3. Parasitismo**

El parasitismo juega un rol importante en la naturaleza, brindando el equilibrio necesario para la persistencia de las especies, debido a la dinámica entre el crecimiento de las poblaciones y su regulación (Boundenga et al., 2018). Las infecciones naturales en la vida silvestre pueden tener efectos positivos en la salud del hospedero; por ejemplo, ciertas infecciones por helmintos disminuyen las reacciones alérgicas e inflamatorias (Erkenswick et al., 2018). Sin embargo, se debe tomar en cuenta que el parasitismo connota la adquisición de recursos como espacio o alimentos, por parte de un organismo a expensas de otro, y ciertos parásitos resultan perjudiciales en entornos complejos (Erkenswick et al., 2018).

Según estudios, el 90% de parásitos registrados en humanos se ha encontrado en otras especies de mamíferos, por lo que los primates no-humanos son susceptibles al contagio de esas infecciones parasíticas de humanos y otros animales, de manera directa, trófica o por vectores artrópodos, produciéndoles enfermedades que pueden ser difíciles de diagnosticar y tratar (Johnson-Delaney, 2009; Erkenwick et al., 2018; Boundenga et al., 2018). Por tal motivo es importante determinar los patógenos que circulan en la vida silvestre, principalmente en las especies que se han visto afectadas por actividades antropogénicas (Boundenga et al., 2018). Se ha descubierto que en los grupos de primates que están en menor contacto con humanos hay menor prevalencia de enfermedades parasitarias en relación a los primates que se encuentran en mayor contacto con los humanos; además el parasitismo puede variar según la edad, sexo, madurez sexual y dominancia, por ejemplo, suele ser más frecuente en machos que en hembras (Martin-Solano et al., 2017; Rushmore et al., 2017).

En los grupos de animales en cautiverio, la prevalencia de parásitos puede estar relacionada al agua contaminada y a la exposición a excrementos humanos; sin embargo, los primates en libertad también se ven afectados debido a la presencia de los habitantes locales y turistas (Martin-Solano et al., 2017).

Cordeiro et al. (2008) realizaron un estudio en Brasil con seis individuos adultos en cautiverio del tití común *Callithrix jacchus*, que tenían WMS, una enfermedad presente en las colonias de esta familia de primates que aumenta la incidencia de parasitismo; los individuos recibieron antiparasitarios y fueron monitoreados durante un año. Estos animales presentaron el nematodo *Trichospirura leptosoma* que causa pancreatitis crónica linfocítica, verminosa y fibrosa; esto provocó la muerte de tres individuos, los restantes fueron sacrificados.

Por otro lado, Dunn (1963) realizó un estudio en Perú con varios primates no humanos, entre los que se encontraban nueve individuos de *Cebuella pygmaea*, de los cuales cuatro presentaron el acantocéfalo *Prosthenorchis elegans*. Se conoce que *P. elegans* es común en los leoncillos y ocasiona graves daños como peritonitis, perforaciones intestinales y lesiones nodulares. Además, se han registrado enfermedades provocadas por helmintos, apicomplejos, *Giardia duodenalis*, *Toxoplasma gondii*, garrapatas y ácaros (Johnson-Delaney, 2009).

La información que se tiene sobre el parasitismo en poblaciones silvestres de leoncillos es mínima. Al ser este proyecto de investigación una caracterización preliminar, se buscaron solo los parásitos *Cryptosporidium* spp. y *Giardia duodenalis* que son parásitos de fácil dispersión, ubicuos en humanos, animales domésticos y otros vertebrados, entre los que se incluyen primates no humanos. Estos parásitos se transmiten por vía oral-fecal, por contacto directo o por la ingesta de agua y alimentos contaminados (Karim et al., 2014).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo principal**

Detectar la presencia de parásitos intestinales en muestras de heces de un grupo silvestre de leoncillos (*Cebuella pygmaea*) de la Estación de Biodiversidad Tiputini.

### **2.2. Objetivos específicos**

- 2.2.1. Validar técnicas de análisis molecular para la detección de distintos parásitos en muestras de heces de un grupo silvestre de leoncillos.
- 2.2.2. Caracterizar de manera preliminar la diversidad de parásitos intestinales presente en leoncillos en estado silvestre.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las poblaciones de *Cebuella pygmaea* se han visto afectadas por actividades antropogénicas, principalmente la fragmentación de su hábitat y la cacería para tráfico ilegal como mascotas. Su estado de conservación en Ecuador es Vulnerable y su especialización tanto en hábitat como en alimentación, hace que su población se vean aún más amenazada por las actividades humanas.

Por otro lado, ya que su hábitat es cada vez más invadido, son más propensos a contraer enfermedades de los humanos (Johnson-Delaney, 2009). Aunque es poca la información que se tiene sobre las enfermedades que los afectan, se conoce que algunas están presentes también en las personas, incrementando el riesgo de transmisión (Boundenga et al., 2018).

Los estudios moleculares sobre los parásitos que afectan a los leoncillos son limitados. La mayoría de estudios previos se basaron en disecciones de los individuos y estudios microscópicos para identificar a los parásitos. Sumado a esto, las investigaciones se realizaron con grupos en cautiverio, por lo que, al no estar en su hábitat natural, los resultados pueden verse influenciados por otros factores como el tipo de alimentación que les proporcionan los investigadores y un mayor contacto con humanos.

En este contexto, en mi investigación busqué, mediante análisis moleculares, contribuir al conocimiento de los parásitos que afectan a las poblaciones silvestres de *Cebuella pygmaea*. Mis resultados pueden ser utilizados como una línea base para continuar analizando otro tipo de parásitos, y para evaluar y, eventualmente, controlar las potenciales enfermedades a las que se ven expuestos los leoncillos.

#### **4. ÁREA DE ESTUDIO**

La investigación fue llevada a cabo en las instalaciones del Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito, en el Laboratorio de Vectores y Parasitología.

Las 17 muestras de heces fueron colectadas de un grupo de leoncillos en la Estación de Biodiversidad Tiputini.

#### **5. SUJETOS DE ESTUDIO**

El grupo de leoncillos estudiado estaba conformado por cuatro individuos: un macho adulto, una hembra adulta, un subadulto y un juvenil. Este grupo estuvo en estudio en la Estación de Biodiversidad Tiputini desde el año 2015, hasta que desapareció súbitamente en octubre del 2017. Las muestras fueron colectadas entre septiembre y octubre del 2017 (Anexo 1).

Las muestras fueron colectadas colocando una red debajo de los árboles de exudados del grupo. Para cada muestra se registró la fecha y hora de colección y, cuando fue posible, la edad y sexo del individuo. Se colocaron las muestras en tubos Eppendorf de 2mL con alcohol al 96% y se las guardó en condiciones de sombra hasta su transporte al Laboratorio de Biología de la USFQ.

#### **6. MATERIALES**

##### **6.1. Extracción de ADN**

- PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories Inc.)
- Tubos Eppendorf 1.5mL
- Microcentrífuga
- Micropipetas

- Puntas para micropipetas
- Vortex

## **6.2. Amplificación por PCR de la región 18S del ARN ribosomal mediante primers específicos para la detección de parásitos intestinales (Apicomplexa: *Cryptosporidium* spp.)**

- Kit para PCR Invitrogen
  - Buffer 10X
  - MgCl<sub>2</sub> 50mM
  - dNTPs 2mM
  - Primer 18S Forward 10μM
  - Primer 18S Reverse 10μM
  - Taq Polimerasa 5U/μL
- ADN extraído de cada muestra
- Termociclador
- Cámara de anticontaminación
- Micropipetas
- Puntas para micropipetas
- Tubos Eppendorf de 0.6mL
- Tubos Eppendorf de 0.2mL

## **6.3. Electroforesis en gel de agarosa**

- Agarosa
- TBE 1X
- Balanza
- Bromuro de etidio
- Probeta

- Frasco de vidrio
- Cámara de electroforesis
- Blue Juice Invitrogen
- Ladder 100bp Invitrogen
- Productos de PCR de las muestras
- Micropipetas
- Puntas para micropipetas
- Fotodocumentador BioRad Gel Doc XR

#### **6.4. Amplificación por PCR del gen de la $\beta$ -giardina**

- Kit para PCR 1 Invitrogen
  - Buffer 10X
  - $MgCl_2$  50mM
  - dNTPs 2mM
  - Primer G7 Forward 10 $\mu$ M
  - Primer G759 Reverse 10 $\mu$ M
  - Taq Polimerasa 5U/ $\mu$ L
- ADN extraído de cada muestra
- Termociclador
- Cámara de anticontaminación
- Micropipetas
- Puntas para micropipetas
- Tubos Eppendorf de 0.6mL
- Tubos Eppendorf de 0.2mL
- Kit para PCR 2 Invitrogen
  - Buffer 10X

- $\text{MgCl}_2$  50mM
- dNTPs 2mM
- Primer G99 Forward 10 $\mu\text{M}$
- Primer G609 Reverse 10 $\mu\text{M}$
- Taq Polimerasa 5U/ $\mu\text{L}$
- ADN extraído de cada muestra
- Termociclador
- Cámara de anticontaminación
- Micropipetas
- Puntas para micropipetas
- Tubos Eppendorf de 0.6mL
- Tubos Eppendorf de 0.2mL

#### **6.5. Electroforesis en gel de agarosa**

- Agarosa
- TBE 1X
- Balanza
- Bromuro de etidio
- Probeta
- Frasco de vidrio
- Cámara de electroforesis
- Blue Juice Invitrogen
- Ladder 100bp Invitrogen
- Productos de PCR 2 de las muestras
- Micropipetas
- Puntas para micropipetas

- Fotodocumentador BioRad Gel Doc XR

## 7. MÉTODOS

### 7.1. Extracción de ADN

Para extraer el ADN de las muestras de heces se utilizó el kit PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories Inc.), siguiendo su respectivo protocolo (Anexo 2).

### 7.2. Amplificación por PCR de la región 18S del ARN ribosomal para la detección de parásitos intestinales del Filo Apicomplexa

Se siguió un protocolo estandarizado con base en el protocolo expuesto en Yang et al. (2014). Se procesaron las muestras de la siguiente manera: 1 $\mu$ L de Buffer 10X, 0.4 $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> a 50mM, 1 $\mu$ L de dNTPs a 2mM, 0.5 $\mu$ L de primer F a 10mM, 0.5 $\mu$ L de primer R a 10mM, 0.2 $\mu$ L de Taq polimerasa a 5U/ $\mu$ L, 4.4 $\mu$ L de agua para PCR y 2 $\mu$ L de ADN, para un volumen final de 10 $\mu$ L. Los primers utilizados fueron 18S Forward y 18S Reverse presentados en Yang et al. (2014), que amplifican para *Cryptosporidium* spp.

En el termociclador se utilizó el siguiente programa: desnaturalización inicial a 96°C por 2 minutos; desnaturalización, annealing y extensión a 94°C, 60°C y 72°C respectivamente por 30 segundos por cada uno de los pasos, por 40 ciclos; y extensión final a 72°C por 7 minutos.

Tras la PCR, se realizó electroforesis en gel de agarosa para revelar los resultados. Se esperaban bandas de aproximadamente 300bp en las muestras positivas para apicomplejos. Las muestras positivas fueron liofilizadas y enviadas para secuenciamiento.

Las secuencias fueron curadas en el programa Gap 4.0, las secuencias consenso se las ingresó a Nucleotide BLAST del NCBI, de esa base de datos, se seleccionó a los

cinco organismos con mayor porcentaje de identidad de cada secuencia. Con todas esas secuencias se realizó un alineamiento y se construyó un árbol filogenético en el programa MEGA. Esto permitió definir a qué organismo correspondía cada muestra.

### **7.3. Amplificación por PCR del gen de la $\beta$ -giardina**

Se siguió el protocolo expuesto en Gil et al. (2017), donde se realiza una PCR anidada. El protocolo para la primera amplificación fue el siguiente: 1 $\mu$ L de BSA, 1 $\mu$ L de Buffer 10X, 0.35 $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> a 50mM, 0.6 $\mu$ L de dNTPs a 2mM, 0.8 $\mu$ L de primer F a 10mM, 0.8 $\mu$ L de primer R a 10mM, 0.2 $\mu$ L de Taq polimerasa a 5U/ $\mu$ L, 3.25 $\mu$ L de agua para PCR y 2 $\mu$ L de ADN, para un volumen final de 10 $\mu$ L. Los primers utilizados fueron G7 Forward y G759 Reverse expuestos en Gil et al. (2017).

En el termociclador se utilizó el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95°C por 7 minutos; desnaturalización, annealing y extensión a 95°C, 65°C y 72°C respectivamente por 30 segundos la desnaturalización y el annealing y 1 minuto la extensión, por 35 ciclos; y extensión final a 72°C por 7 minutos.

El protocolo para la segunda amplificación fue el siguiente: 1 $\mu$ L de BSA, 1 $\mu$ L de Buffer 10X, 0.35 $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> a 50mM, 0.6 $\mu$ L de dNTPs a 2mM, 0.8 $\mu$ L de primer F a 10mM, 0.8 $\mu$ L de primer R a 10mM, 0.2 $\mu$ L de Taq polimerasa a 5U/ $\mu$ L, 3.25 $\mu$ L de agua para PCR y 2 $\mu$ L del producto de la primera PCR diluido 1 en 100, para un volumen final de 10  $\mu$ L. Los primers utilizados fueron G99 Forward y G609 Reverse expuestos en Gil et al. (2017).

En el termociclador se utilizó el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95°C por 7 minutos; desnaturalización, annealing y extensión a 95°C, 55°C y 72°C respectivamente por 30 segundos la desnaturalización y el annealing y 1 minuto la extensión, por 35 ciclos; y extensión final a 72°C por 7 minutos.

Tras la PCR, se realizó electroforesis en gel de agarosa para revelar los resultados. Se esperaban bandas de aproximadamente 511bp en las muestras positivas para  $\beta$ -giardina.

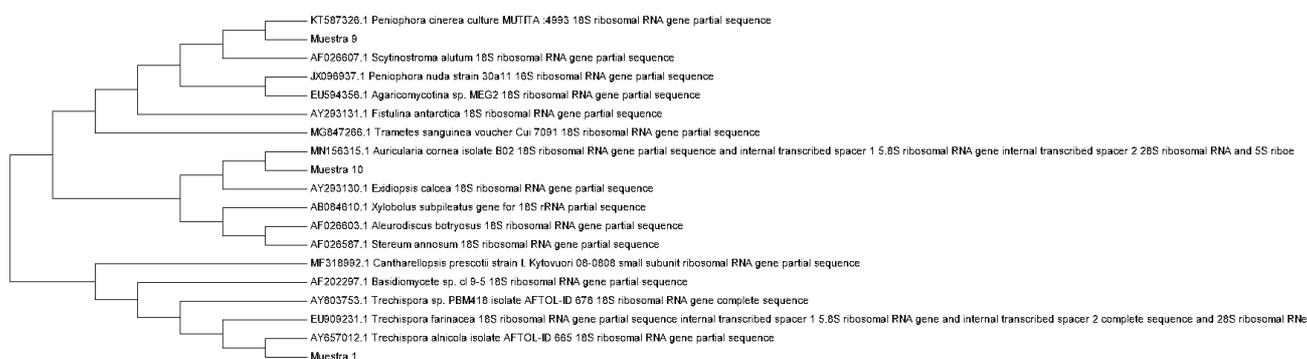
## 8. RESULTADOS

### 8.1. Amplificación por PCR de la región 18S del ARN ribosomal para la detección de parásitos intestinales del Filo Apicomplexa

Tras la amplificación de la región 18S de las 17 muestras, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. El 29% de las muestras fueron positivas pues en ellas se identificó la banda de aproximadamente 300 pares de bases. Dichas muestras fueron la 1 correspondiente a un adulto macho, la 2 correspondiente a un adulto, la 9 correspondiente a un individuo no identificado, la 10 correspondiente a un subadulto y la 11 correspondiente a un juvenil (Fig 1 y 2).

En la Figura 1 se observa la relación entre las secuencias de las muestras positivas y las secuencias de la base de datos del NCBI de los hongos identificados. La muestra 1 corresponde al hongo *Trechispora alnicola*, la muestra 9 corresponde al hongo *Peniophora cinerea* y la muestra 10 corresponde al hongo *Auricularia cornea*.

Respecto a las muestras 2 y 11, no fue posible obtener una secuencia consenso para ingresar en BLAST.



**Figura 1.** Árbol filogenético de las secuencias

## 8.2. Amplificación por PCR del gen de la $\beta$ -giardina

Tras la amplificación del gen de la  $\beta$ -giardina de las 17 muestras, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. En ninguna muestra se observó banda, lo que indica ausencia de *Giardia duodenalis*.

## 9. DISCUSIÓN

Los primates son animales únicos, presentan adaptaciones anatómicas, sistemas sociales y roles ecológicos importantes; pero así mismo, enfrentan varias amenazas principalmente debido a las actividades antropogénicas como la fragmentación e invasión de su hábitat o la cacería, siendo la primera, la amenaza más grande para la conservación de los primates (Cervera et al., 2017, de la Torre et al., 2013). *Cebuella pygmaea* es una especie altamente especializada tanto en hábitat como en alimentación, razón por la cual las actividades antropogénicas pueden resultarle aún más perjudiciales.

En estudios con primates, se ha comprobado que el parasitismo incrementa en hábitats alterados, ya que la disponibilidad de alimentos disminuye, con lo que se limita la ingesta de nutrientes, comprometiendo al sistema inmune (Behie y Pavelka, 2013). Tanto las enfermedades infecciosas como las parasitarias representan una amenaza para la conservación de las especies silvestres, esto sumado a la creciente invasión de las selvas tropicales y hábitats ribereños por parte del humano, incrementa la posibilidad de intercambio de hospederos de los parásitos, debido a las proximidades filogenéticas entre humanos y primates no humanos (Boundenga et al., 2018; de la Torre et al., 2013).

Se ha visto que los leoncillos son susceptibles a infecciones virales y bacterianas, por ejemplo aquellas causadas por paramixovirus, adenovirus, herpes simple, influenza, hepatitis, *Kleibsellia* sp., *Bordetella* sp. y *Streptococcus* sp. (Gál et al.,

2013). En un estudio realizado por Griner (1983), con 15 leoncillos disecados, se detectó que la causa más común de muerte es la enterocolitis e infecciones respiratorias, causadas principalmente por *Toxoplasma gondii* y rotavirus (Gál et al., 2013).

El tipo de alimentación de los títes puede ser una guía para comprender las rutas de infección de los parásitos, por ejemplo, al alimentarse de artrópodos, los cuales pueden ser hospederos intermediarios de helmintos (Tavela et al., 2013).

En cuanto a los resultados obtenidos en esta investigación, es notable que los ensayos para apicomplejos no fueron 100% eficientes debido a que se observaron dímeros de primer, poniendo en evidencia que las condiciones de amplificación no fueron del todo óptimas (Bustin y Huggett, 2017). Los primers utilizados para la amplificación del gen 18S fueron diseñados para PCR en tiempo real (qPCR) y, al ser utilizados en PCR convencional no resultan tan específicos. La qPCR fue desarrollada como un refinamiento de la PCR convencional, se basa en el uso de colorantes o sondas fluorescentes que permiten monitorear el producto amplificado (Paiva-Cavalcanti et al., 2010); los primers suelen ser específicos, pero lo que le provee más sensibilidad es la sonda ya que se la diseña para una secuencia target específica (Thornton y Basu, 2011).

El registro de hongos en las heces de leoncillos no se había reportado antes. Las tres especies reportadas corresponden a hongos basidiomicetos que se encuentran principalmente en la madera (Ellis y Ellis, 1990; Ordóñez, 2018)

En mamíferos, los hongos no poseen un modo único de transmisión, la mayoría presenta dificultades para superar las barreras como alta temperatura corporal, piel sana y sistema inmunitario; sin embargo al romper la piel o membranas mucosas, pueden causar enfermedades internas (Berbee, 2001).

Los basidiomicetos son hongos cuyas especies cumplen diversas funciones, de manera que, algunos forman ectomicorrizas, otros son comestibles y otros son

patógenos. Este filo incluye champiñones, hongos mutualistas, mohos y dos grupos de parásitos vegetales (Campbell y Reece, 2005). Los agaricales son el grupo más común de los Basidiomicetos (Curtis et al., 2008). En el grupo de basidiomicetos, *Malassezia*, está frecuentemente asociado a trastornos cutáneos en humanos, como dermatitis atópica; las enzimas que secreta este hongo son similares a las del ascomiceto *Candida albicans* (Heitman, 2011).

También en este filo existen hongos patógenos que atacan a los insectos. Hay estrechas relaciones filogenéticas entre parásitos de insectos y hongos (principalmente *Cordyceps*), sugiriendo que los hongos evolucionaron e irradiaron sobre los insectos hospedadores de esos parásitos (Berbee, 2001). Los tres hongos detectados pertenecen a la clase de los Agaricomycetes. *Trechispora alnicola* crece en madera húmeda, en especial en madera ya atacada por otros hongos o muerta; se lo encuentra durante todo el año, pero en mayor abundancia en los meses de julio a octubre (Ellis y Ellis, 1990). Causa la enfermedad del césped (Cannon y Kirk, 2007). *Peniophora cinerea* es un hongo patógeno del nogal negro. Habita en la madera muerta de árboles caducifolios y coníferas. *Auricularia cornea* crece en la madera muerta o en las partes muertas de los árboles vivos, en especial en temporada lluviosa; se trata de un hongo lignocelulolítico; se lo ha registrado en las provincias de Zamora Chinchipe y Guayas, en el Bosque Montano Oriental y el Bosque Húmedo Tropical del Chocó (Ordóñez, 2018). Al encontrarse estos hongos en la madera, los leoncillos pudieron haberlos ingerido de manera accidental. El efecto de estos hongos sobre estos primates es desconocido y debe ser estudiado a futuro.

En cuanto a la ausencia de *Giardia duodenalis*, puede deberse a que se trata de un patógeno frecuente en humanos y el área donde se encontraba este grupo de leoncillos, la Estación de Biodiversidad Tiputini, está mínimamente afectada por

actividades humana. En la estación hay un número limitado de personas y sus actividades, así como el manejo de sus desechos, están bien controlados (Swing, 2017). Esto reduciría la probabilidad de contagio entre los seres humanos y otros animales, incluyendo los leoncillos.

## **10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

- El estudio de los factores que puedan poner en riesgo las poblaciones de *Cebuella pygmaea* es importante para tomar acciones que permitan la conservación de este primate. Si bien la fragmentación de su hábitat es lo que más se ha estudiado, igualmente se debe considerar el estudio más profundo de las enfermedades que los afectan y que en ocasiones pueden darse justamente por las alteraciones que provocan los humanos.
- Con relación a lo encontrado en esta investigación, se concluye que, aunque no se detectaron en las muestras los parásitos para los que se realizaron los análisis moleculares, se deja una guía para que se continúe la búsqueda de otros grupos parasitarios, y no solo con estas muestras del grupo desaparecido, sino que se hagan estudios de otros grupos silvestres.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Behie, A. y Pavelka, M. (2013). Interacting Roles of Diet, Cortisol Levels, and Parasites in Determining Population Density of Belizean Howler Monkeys in a Hurricane Damaged Forest Fragment. *Primates in Fragments. Complexity and Resilience. Developments in Primatology: Progress and Prospects*. Springer, New York.
- Berbee, M. (2001). The phylogeny of plant and animal pathogens in the Ascomycota. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, Vol. 59, pp: 165-187.
- Boundenga, L., Moussadji, C., Mombo, I., Ngoubangoye, B., Lekana-Douki, J. y Hugot, J. (2018). Diversity and prevalence of gastrointestinal parasites in two wild *Galago* species in Gabon. *Infection, Genetics and Evolution*, Vol. 63, pp: 249-256.
- Brinkworth, J. y Pechenkina, K. (2013). *Primates, Pathogens, and Evolution*. Editorial Springer, pp: 1-9.
- Bustin, S. y Huggett, J. (2017). qPCR primer design revisited. *Biomolecular Detection and Quantification*, Vol. 14, pp: 19-28.
- Campbell, N. y Reece, J. (2005). *Biología*. 7º ed. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España.
- Cannon, P. y Kirk, P. (2007). *Fungal Families of the World*. CABI Publishing, Wallingford, Reino Unido.
- Catenacci, L., Colosio, A., Oliveira, L., De Vleeschouwer, K., Munhoz, A., Deem, S. y Pinto, J. (2016). Occurrence of *Prosthenorchis elegans* in Free-living Primates from the Atlantic Forest of Southern Bahia, Brazil. *Journal of Wildlife Diseases*, Vol. 52, Nº 2, pp: 364-368.
- Cervera, L., de la Torre, S., Jerusalinsky, L., Fuentes, N., Alfonso-Cortés, F., Morelos-Juárez, C., Vidal-García, F. Álvarez-Solas, S., Zapata-Ríos, G., Utreras y Tirira,

- D. (2017). Conservation Action Plan for Ecuadorian Primates: Process and Priorities. *Primate Conservation*, Vol. 31.
- Cordeiro, M., Castro, A., Vidal, J. y Oliveira, A. (2008). Histopathology findings in common marmosets (*Callithrix jacchus* Linnaeus, 1758) with chronic weight loss associated with bile tract obstruction by infestation with *Platynosomum* (Loos, 1907). *Primates*, Vol. 49, pp: 283-287.
- Curtis, H., Barnes, N., Schnek, A. y Massarini, A. (2008). *Biología*. 7º ed. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España.
- de la Torre, S., Yépez, P., Nieto, D. y Payaguaje, H. (2013) Preliminary Evaluation of the Effects of Habitat Fragmentation on Habitat Use and Genetic Diversity of Pygmy Marmosets in Ecuador. *Primates in Fragments. Complexity and Resilience. Developments in Primatology: Progress and Prospects*. Springer, New York.
- de la Torre, S. y Snowdon, C. (2009). Dialects in Pygmy Marmosets? Population Variation in Call Structure. *American Journal of Primatology*, Vol. 71, pp: 333-342.
- Dunn, F. (1963). Acanthocephalans and Cestodes of South American Monkeys and Marmosets. *American Society of Parasitologists*, Vol. 49, Nº 3, pp: 717-722.
- Ellis, M. y Ellis, P. (1990). *Fungi without Gills (Hymenomycetes and Gasteromycetes) An Identification Handbook*. Chapman and Hall, Londres, Reino Unido.
- Erkenswick, G., Watsa, M., Gozalo, A., Dudaie, S., Bailey, L., Kudakwashe, M., Kuziez, A. y Parker, P. (2018). A multi-year survey of helminthes from the gastrointestinal tract of wild saddleback (*Leontocebu sweddelli*) and emperor (*Saguinus imperator*) tamarins. *Bio Rvix Preprint*.

- Gál, J., Hornyák, A., Mándoki, M., Bakony, T., Balka, G., Szeredi, L., Marosán, M., Ludányi, T., Forgách, P., Sós, E., Demeter, Z. y Farkas, S. (2013). Novel mastadenovirus infection and clinical disease in a pygmy marmoset (*Callithrix [Cebuella] pygmaea*). *Veterinary Microbiology*, Vol. 167, pp: 695-699.
- Gil, H., Cano, L., de Lucio, A., Bailo, B., Hernández, M., Cardona, G., Fernández-Basterra, J., Aramburu-Aguirre, J., López-Molina, N. y Carmena, D. (2017). Detection and molecular diversity of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in sheltered dogs and cats in Northern Spain. *infection, Genetics and Evolution*, Vol. 50, pp: 62-69.
- Heitman, J. (2011). Microbial Pathogens in the Fungal Kingdom. *Fungal Biol Rev.*, Vol. 25, Nº 1, pp: 48-60.
- IUCN. (2008). Pygmy Marmoset *Cebuella pygmaea*. IUCN Red List.
- Johnson-Delaney, C. (2009). Parasites of Captive Nonhuman Primates. *Vet Clin Exot Anim*, Vol. 12, pp: 563-581.
- Karim, R., Zhang, S., Jian, F., Li, J., Zhou, C., Zhang, L., Sun, M., Yang, G., Zou, F., Dong, H., Li, J., Islam, F., Qi, M., Wang, R., Ning, C. y Xiao, L. (2014). Multilocus typing of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* from non-human primates in China. *International Journal for Parasitology*, Vol. 44, pp: 1039-1047.
- Libro Rojo de los Mamíferos del Ecuador. (2011). Leoncillo.
- Martin-Solano, S., Carrillo-Bilbao, G., Ramírez, W., Celi-Erazo, M., Huynen, M., Levecke, B., Benítez-Ortiz, W. Y Losson, B. (2017). Gastrointestinal parasites in captive and free-ranging *Cebus albifrons* in the Western Amazon, Ecuador. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. Vol. 6, Nº 3, pp: 209-218.

- Ordóñez, M. (2018). *Auricularia cornea*. Fungario QCAM, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Recuperado el 09 de diciembre de 2019 desde <https://bioweb.bio/fungiweb/FichaEspecie/Auricularia%20cornea>
- Paiva-Cavalcanti, M., Regis-Da-Silva, C. y Gomes, Y. (2010). Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection: a mini-review. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, Vol. 16, N° 4.
- Porcel, Z., López-Strauss, H., Martínez, J. y Wallace, R. (2010). *Callitrichidae*. Mamíferos grandes y medianos de Bolivia, pp: 235-262.
- Rushmore, J., Bisanzio, D. y Gillespie, T. (2017). Making new connections: Insights from Primate-Parasite networks. *Trends in Parasitology*, Vol. 33, N° 7, pp: 547-560.
- Soini, P. (1982). Ecology and Population Dynamics of the Pygmy Marmoset, *Cebuella pygmaea*. *Folia Primatologica*, Vol. 39, N° 1-2.
- Swing, K. (2017). Qué es y qué hace la Estación de Biodiversidad Tiputini? Los secretos del Yasuní, pp: 17-26.
- Tavela, A., Fuzessy, L., Dornelas, V., Rodrigues, F., Junior, M., Silva, I. y Souza, V. (2013). Helminths of wild hybrid marmosets (*Callithrix* sp.) living in an environment with high human activity. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, Jaboticabal, Vol. 22, N° 3, pp: 391-397.
- Thornton, B. y Basu, C. (2011). Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, Vol. 39, N° 2, pp: 145-154.
- Townsend, W. (2001). *Callithrix pygmaea*. *American Society of Mammalogists*, Vol. 665, pp: 1-6.

- Yang, R., Paparini, A., Monis, P. y Ryan, U. (2014). Comparison of next-generation droplet digital PCR (ddPCR) with quantitative PCR (qPCR) for enumeration of *Cryptosporidium* oocysts in faecal samples. *International Journal for Parasitology*, Vol. 44, N° 14, pp: 1105-1113.
- Yépez, P., de la Torre, S. y Snowdon, C. (2005). Interpopulation Differences in Exudate Feeding of Pygmy Marmosets in Ecuadorian Amazonia. *American Journal of Primatology*, Vol. 66, pp: 145-158.

## 12. ANEXOS

### 12.1. Anexo 1: Datos de las muestras recolectadas

**Tabla 1.** Datos de las muestras de heces recolectadas

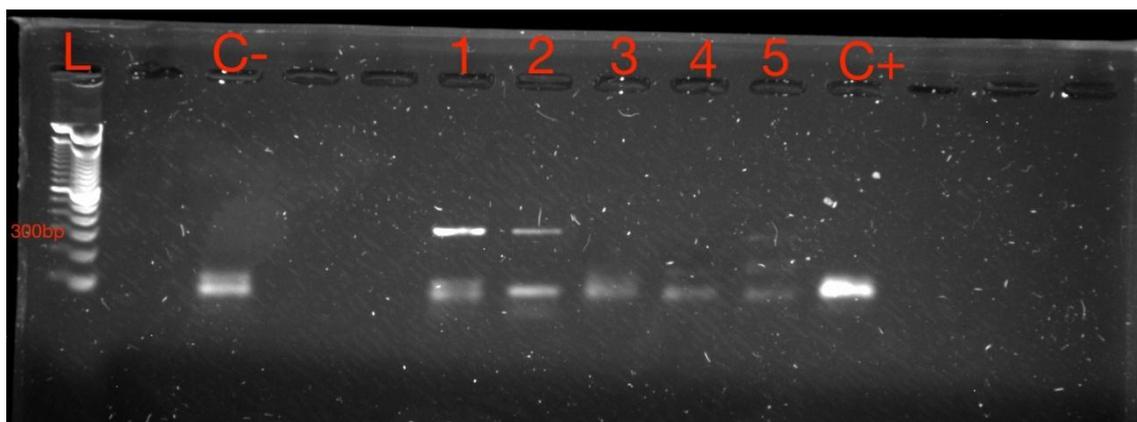
Lugar de recolección	Fecha de recolección	Número de muestra	Hora de recolección	Individuo
Tiputini	10/9/17	1	15:00-17:00	Adulto macho
Tiputini	11/9/17	2	06:40	Adulto
Tiputini	11/9/17	3	06:40-7:00	Subadulto
Tiputini	11/9/17	4	6:40-7:00	Juvenil
Tiputini	13/9/17	5	06:00-10:00	Subadulto
Tiputini	13/9/17	6	06:00-10:00	Adulto
Tiputini	13/9/17	7	06:00-10:00	Adulto
Tiputini	19/9/17	8	12:00-16:30	Adulto hembra
Tiputini	20/9/17	9	06:00-10:00	No identificado
Tiputini	20/9/17	10	06:00-10:00	Subadulto
Tiputini	20/9/17	11	06:00-10:00	Juvenil
Tiputini	29/9/17	12	06:00-10:00	Adulto
Tiputini	29/9/17	13	06:00-10:00	Adulto
Tiputini	29/9/17	14	06:00-10:00	Subadulto
Tiputini	29/9/17	15	06:00-10:00	Juvenil
Tiputini	29/9/17	16	06:00-10:00	Adulto
Tiputini	8/10/17	17	12:00-16:30	No identificado

**12.2. Anexo 2: Protocolo de extracción de ADN PowerSoil DNA Isolation****Kit**

1. Agregar 0.25g de la muestra a extraerse a los tubos PowerBead provistos en el kit, mezclar agitando suavemente.
2. Añadir 60 $\mu$ L de la solución C1 y agitar brevemente.
3. Tras asegurar los tubos, llevar al vortex a máxima velocidad por 10 minutos.
4. Centrifugar a 10000 revoluciones durante 30 segundos.
5. Transferir el sobrenadante a los tubos de colección limpios de 2mL provistos en el kit.
6. Agregar 250 $\mu$ L de la solución C2, llevar al vortex por 5 segundos. Incubar a 4°C durante 5 minutos.
7. Centrifugar a 10000 revoluciones durante 1 minuto.
8. Evitando el pellet, transferir 600 $\mu$ L del sobrenadante a tubos de colección limpios de 2mL provistos en el kit.
9. Añadir 200 $\mu$ L de la solución C3, agitar brevemente en el vortex. Incubar a 4°C durante 5 minutos.
10. Centrifugar a 10000 revoluciones durante 1 minuto.
11. Evitando el pellet, transferir 750 $\mu$ L de sobrenadante a los tubos de colección limpios de 2mL provistos en el kit.
12. Mezclar la solución C4 y añadir 1200 $\mu$ L al sobrenadante. Llevar al vortex por 5 segundos.
13. Cargar 675 $\mu$ L en los tubos MB Spin Column provistos en el kit y centrifugar a 10000 revoluciones durante 1 minuto. Descartar el líquido.
14. Repetir el paso 13 hasta que se procese toda la muestra.

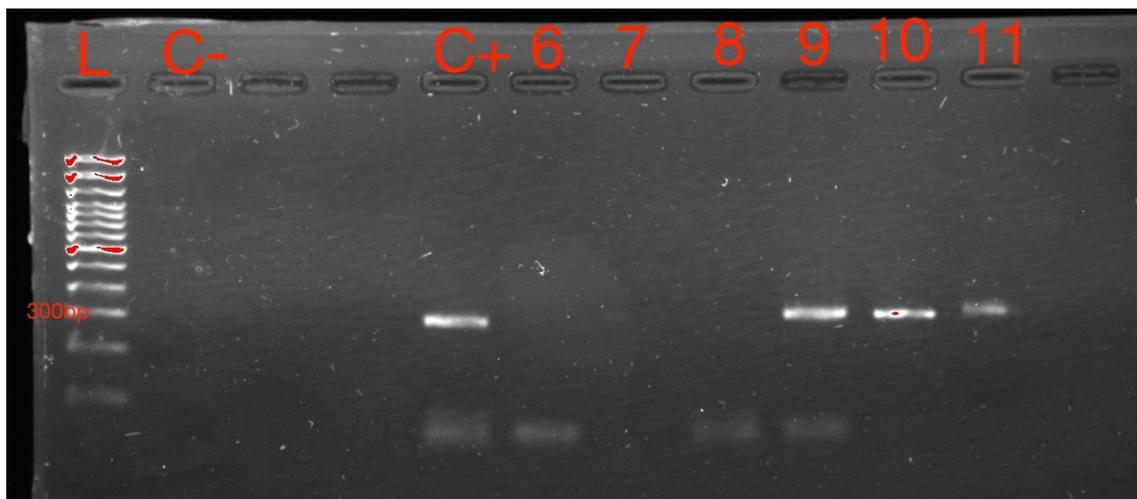
15. Añadir 500 $\mu$ L de la solución C5, centrifugar a 10000 revoluciones durante 30 segundos.
16. Desechar el líquido y centrifugar nuevamente a 10000 revoluciones durante 1 minuto.
17. Con cuidado, colocarlas MB Spin Column en los tubos de colección limpios de 2mL provistos en el kit, evitando salpicar la solución C5 a la columna.
18. Añadir 100 $\mu$ L de la solución C6 al centro del filtro de la membrana.
19. Centrifugar a 10000 revoluciones durante 30 segundos. Descartar la columna y se tiene listo el ADN.

### 12.3. Anexo 3: Figuras



**Figura 2.** Gel de agarosa del Filo Apicomplexa

En la Figura 2 se observa el resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los resultados obtenidos de la amplificación de la región 18S para *Cryptosporidium* (Filo Apicomplexa), a partir de muestras de heces de *Cebuella pygmaea*. L: ladder, C-: control negativo, 1 a 5: número de las muestras procesadas, C+: control positivo. Las muestras con resultado positivo son aquellas que presentan banda alrededor de 300bp.



**Figura 3.** Gel de agarosa del Filo Apicomplexa

En la Figura 3 se observa el resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los resultados obtenidos de la amplificación de la región 18S para *Cryptosporidium* (Filo Apicomplexa), a partir de muestras de heces de *Cebuella pygmaea*. L: ladder, C-: control negativo, C+: control positivo, 6 a 11: número de las muestras procesadas. Las muestras con resultado positivo son aquellas que presentan banda alrededor de 300bp.