



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Tripanosomas y leishmanias en monos aulladores (*Alouatta caraya*) en áreas silvestres y rurales del noreste argentino

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de
Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas.

Mariela Florencia Martínez

Director: Dr. O. Daniel Salomón

Director Adjunto: Dr. Martín Kowalewski

Consejera de Estudios: Dra. María Busch

Lugar de Trabajo: Instituto Nacional de Medicina Tropical (INMeT) -
Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud “Carlos G.
Malbrán” (ANLIS). Puerto Iguazú, Misiones.

Fecha de defensa: 20 de diciembre del 2024.

Buenos Aires, 2024

A Nilda y Jorge

Agradecimientos

A quienes lucharon y luchan por la educación pública y por la igualdad para que todas las personas tengan oportunidades de estudiar.

A Daniel Salomón y Martín Kowalewski por todo lo que me enseñaron, por acompañarme y seguir confiando cada vez.

A Alejandro Schijman, quien me guió y formó en gran parte de todo este proceso, muchas gracias.

A Gabriel Zunino, por estar muchas veces en el momento y tiempo necesarios, con los monos y también con las vinchucas!. Gracias por hacer más fácil y linda la estadía en la EBCo, comiditas, huerta, panes y pizzas al horno de barro y varias cosas más.

A los técnicos de campo de la Estación Biológica Corrientes: Miguel, Chupali, Ezequiel y Baroncho por su irreemplazable asistencia en los trabajos de campo, y por estar siempre atentos y presentes mientras estuve instalada en la EBCo, muy agradecida.

A todos los compañeros en la EBCo, Mamina, Marian, y muchos más que pasaron por allí esos años de muestreos, por tantos compartir, gracias!

A todas las familias que nos abrieron sus casas para poder hacer los muestreos que así lo requerían.

A Vani Fernández, amiga y compañera de aventuras en campo con los aulladores desde el inicio, gracias por haberme acercado a este mundo monero... que aún sigo caminando, por lo compartido y lo que seguiremos compartiendo.

A Sole Santini por tantos impulsos y trabajo conjunto, y sobre todo por hacerme reir tanto tanto en arduos momentos de trabajo.

A Leonardo Ceballos, infinito agradecimiento por todas sus enseñanzas vinchuqueras, y el acompañamiento incondicional en el trabajo de campo cuando realizamos el muestreo de triatominos.

A Federico Pontón por ser el súper veterinario que necesitamos y estuvo cada vez. También a Hernán Argibay y Ruth Pernighotti por sus imprescindibles asistencias y dedicaciones. A los tres por cuidar cada animal con tanta vocación y amor.

A Juan Rosa y Enrique Szelag, por sus enseñanzas en el xenodiagnóstico y sobre los triatominos, por brindarme su espacio y tiempo en el laboratorio. A Juan también por acompañarme en el trabajo de campo en la Isla Brasilera y hacernos reir mucho mucho.

A mis compañeros de la REDILA, por cada encuentro, incentivo y motivación, por enseñarme tanto de leishmanias y flebótomos, y principalmente sobre el trabajo en equipo, con mucho compromiso y cariño por sobre todo.

A Carolina Cura, Soraya Acardi y Magalí Giuliani, por enseñarme todo lo que sé del diagnóstico por biología molecular, eternamente agradecida.

Al plantel de amigas allá lejos pero cerca siempre, compañeras y amigas que me dió la biología, Noe Lonné, Isa La Rosa, Lau Geffner, Ana Navarro y Naty Andrada, las quiero y extraño.

A mis amigas, familia iguazuense y compañeras de cada día de estos últimos años, Dani Lamattina, Toya Vadell, Pau Díaz y Mara Urdapilleta, por estar ahí cada vez para que los brazos no caigan, gracias, las quiero mucho.

A Clau Giombini, amiga hermana, me acompañas tanto tanto cada día, te quiero.

Gracias a estas mujeres de mi vida por acompañarme y estar siempre. Y en especial a mis mujeritas hermanas que la vida me dió, Mica Martínez, Maca Martínez y Mile Martínez, las amo infinitamente.

A Juanjo Giombini y Ali Gómez, por estar siempre pendientes de mis sentires, y ser les mejores suegres que se pueden tener, gracias infinitas.

A mi compañero Marian Giombini, gracias por empujarme y escucharme tantas veces, en especial por todo tu apoyo en la carrera de grado para que llegue a ser una profesional, sin tu ayuda hubiese sido más difícil. Gracias por tus trepadas a los árboles para poner las trampas. Por hacerme parte de tus deseos aventureros, compartirme tu pasión por la naturaleza y la ciencia, y ayudarme a ser parte de todo eso a mi manera.

A mi mamá Nilda, por seguir cuidandome cada vez que podes y estar siempre. Por enseñarme tu fuerza y perseverancia, tu valor de ser auténtica y de concretar cosas ni imaginadas.

A mi papá Jorge por enseñarme con el ejemplo a seguir a pesar de las adversidades, la paciencia, la perseverancia, el valor, la bondad, la lucha, fuiste y sos mi referente en gran parte de mi camino. Te extraño mucho y lo que más me gustaría en la vida es que hoy pudieras estar para verme... soy mamá de dos nenas, bailarina, profe de yoga y doctora en biología ☺

A Serena y Bruna, que me envuelven y llenan de amor y mimos infinitos cada día desde hace siete años.

Publicaciones originadas de la tesis:

- Martínez, M.F., Kowalewski, M.M., Salomón, O.D., Schijman, A.G. (2016). Molecular characterization of trypanosomatid infections in wild howler monkeys (*Alouatta caraya*) in northeastern Argentina. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, Vol. 5, 198–206.
- Martínez, M.F., Santini, M.S., Kowalewski, M.M., Salomón, O.D. (2019). Phlebotominae in peri-domestic and forest environments inhabited by *Alouatta caraya* in northeastern Argentina. *Medical and Veterinary Entomology*, Vol. 33(3), 367-374.
- Martínez MF, Kowalewski M.M., Giuliani M.G., Acardi S.A., Salomón O.D. (2020). Molecular identification of *Leishmania* in free-ranging black and gold howler monkeys (*Alouatta caraya*) in northeastern Argentina. *Acta Tropica*, 210:105534.

Resumen

Los tripanosomátidos son microorganismos flagelados que parasitan a los principales grupos de organismos eucariotas. En este estudio evaluamos la infección por trypanosomátidos pertenecientes a los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania* en monos aulladores negros y dorados (*Alouatta caraya*) de vida libre, y la presencia de los respectivos insectos vectores (triatominos y flebótomos) en distintos ambientes en el noreste argentino, aportando conocimiento sobre los potenciales hospedadores de los parásitos mencionados en ambientes con distinto grado de intervención humana del noreste de nuestro país.

El estudio se llevó a cabo en San Cayetano (SC), en el Parque Provincial San Cayetano (PPSC) (noroeste de la provincia de Corrientes), y en Isla Brasilera (IB) e Isla del Cerrito (IC) (islas sobre el río Paraná, provincia de Chaco). En estos sitios *A. caraya* representa la mayor proporción en biomasa de los mamíferos arbóreos. Los sitios de estudio fueron clasificados de acuerdo al grado de contacto que los grupos de monos mantienen con el ambiente antropizado: remoto (IB), rural (PPSC), y rururbano (IC y SC). Para realizar los diagnósticos de infección, colectamos muestras biológicas mediante la captura de animales. Muestreamos un total de 109 monos (49 en el ambiente remoto, 39 en rural, 21 en rururbano) provenientes de 32 grupos distintos (15 en remoto, 10 en rural, y 7 en rururbano).

Hallamos infección por *T. cruzi* y *T. minasense* en los monos aulladores de los distintos ambientes estudiados. Se halló la Unidad Discreta de Tipificación (UDT) de *T. cruzi* coincidente con el grupo de TcII, V y VI en todos los ambientes evaluados, y la TcI solo en el ambiente remoto. Detectamos la presencia de *T. minasense* (o de una especie cercanamente relacionada) lo cual no había sido reportado previamente para monos aulladores en vida libre en Argentina. Por otro lado, registramos la presencia del triatominio hematófago *Psammolestes coreodes* en nidos de aves deshabitados hallados en los mismos árboles por los que circulan los monos, y hallamos tripanosomátidos flagelados en las heces de los mismos.

Hallamos infección natural por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (Leishmania) amazonensis* y *L. (L.) infantum*, en individuos capturados en los distintos ambientes relevados. Registramos por primera vez estos parásitos en *A. caraya* en vida libre, y

también se obtuvo el primer registro de *L. (L.) amazonensis* para la región noreste de la Argentina. El hallazgo de infección por *L. (L.) infantum* en los monos del ambiente rururbano (SC) y del ambiente remoto sugiere distintos escenarios epidemiológicos para la transmisión de este agente parasitario causante de la leishmaniasis visceral urbana. *Lutzomyia longipalpis*, el principal vector de *L. (L.) infantum*, solo fue detectada en el peridomicilio de las viviendas evaluadas. Detectamos la presencia de flebótomos vectores de *Leishmania* spp. (*Nyssomyia neivai*, *Ny. whitmani* y *Migonemyia migonei*) en los estratos alto y bajo de los árboles dormideros de los aulladores. Encontramos una asociación significativa entre el tipo de ambiente y las especies de flebótomos encontradas. Dado que los monos aulladores pueden habitar ambientes con distinto grado de disturbio, la interacción entre los flebótomos y los monos podría ser un factor clave en el ciclo de transmisión de *Leishmania* spp. en los paisajes rurales y silvestres.

Los resultados nos permitieron registrar y dar conocimiento sobre infección de monos aulladores por *Trypanosoma* spp. y *Leishmania* spp. tanto en el ambiente natural remoto como en los alrededores de las poblaciones humanas del noreste argentino. Esta evidencia empírica abre nuevas preguntas y alertas respecto a la vigilancia de la transmisión actual de estos parásitos.

Palabras claves: Zoonosis, reservorios silvestres, *Alouatta caraya*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania*.

Summary

Trypanosomes and leishmanias in howler monkeys (*Alouatta caraya*) in wild and rural areas of northeastern Argentina

Trypanosomatids are flagellated microorganisms that parasitize the main groups of eukaryotic organisms. We evaluated the infection by trypanosomatids belonging to the genera *Trypanosoma* and *Leishmania* in free-living black and gold howler monkeys (*Alouatta caraya*), and the presence of the respective vector insects (triatomines and sandflies) in different environments in northeastern Argentina. Our main objective was to provide knowledge on the potential hosts of the mentioned parasites in the wild environment of the northeast of our country.

The study was carried out in San Cayetano (SC), in the San Cayetano Provincial Park (PPSC) (northwest of the province of Corrientes), and Isla Brasilera (IB) and Isla del Cerrito (IC) (islands on the Paraná River in the province of Chaco). *Alouatta caraya* represents the highest biomass proportion of arboreal mammals in these sites. We classified the study areas according to the degree of contact that the groups of monkeys maintain with the anthropized environment: remote (IB), rural (PPSC), and rururban (IC and SC). In order to perform infection diagnosis, we collected biological samples by capturing animals. We sampled 109 howler monkeys (49 from remote site, 39 from rural site and 21 from rururban site) coming from 32 groups.

We found infection by *T. cruzi* and *T. minasense* in the howler monkeys inhabiting both study areas. The Discrete Typing Unit (UDT) of *T. cruzi* founded to coincide with the group of TcII, V and VI in all the environments evaluated, and the TcI only in the remote environment. We detected the presence of *T. minasense* (or a closely-related species), which was not previously reported for free-living *A. caraya* in Argentina. In addition, we detected the presence of the hematophagous triatomine *Psammolestes coreodes* inhabiting the same environments as *A. caraya*, as well as flagellate trypanosomatids in the feces of the triatomines.

We also found natural infection by *Leishmania braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* and *L. (L.) infantum*, in howlers captured in the different surveyed environments. We recorded these parasites for the first time in free-living *A. caraya*, and the first record of *L. (L.) amazonensis* for the northeast region of Argentina. The finding of infection by *L. (L.)*

infantum in monkeys from the rururban environment (SC) and the remote environment (IB) suggests different epidemiological scenarios for the transmission of this parasitic agent that causes urban visceral leishmaniasis. *Lutzomyia longipalpis*, the main vector of visceral leishmaniasis, was only detected in the peridomicile of surveyed houses. We detected the presence of *Leishmania* spp. vector sandflies (*Nyssomyia neivai*, *Ny. whitmani* and *Migonemyia migonei*) in the lower and upper strata of howlers' sleeping trees. We found a significant association between the type of environment and the species of sandflies. Since howler monkeys can inhabit environments with varying degrees of disturbance, the interaction between sandflies and monkeys could be a key factor in the transmission cycle of *Leishmania* spp. in rural and wild landscapes.

The results from the present study allowed us to record and provide knowledge on howler monkey infection by *Trypanosoma* spp. and *Leishmania* spp., in the natural remote environment as well as in the surroundings of human populations in northeastern Argentina. This empirical evidence opens new questions and alerts regarding the surveillance of the current transmission of these parasites.

Keywords: Zoonosis, wild reservoirs, *Alouatta caraya*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania*.

Índice

Capítulo 1. Trypanosomátidos y monos aulladores de vida libre	13
1.1. Introducción.....	13
1.1.1- Trypanosomátidos.....	13
1.1.2- Zoonosis y reservorios	14
1.1.3- Zoonosis en primates no humanos del nuevo mundo	16
1.1.4- Los monos aulladores negros y dorados (<i>Alouatta caraya</i>).....	17
1.2. Objetivos.....	20
Capítulo 2. Infección por <i>Trypanosoma cruzi</i> y otros tripanosomas en <i>Alouatta caraya</i>.....	21
2.1. Introducción.....	21
2.1.1- <i>Trypanosoma cruzi</i> y su ciclo de vida.....	22
2.1.2- Vías de transmisión de <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
2.1.3- Las distintas cepas de <i>T. cruzi</i> y su especificidad con el hospedador.....	27
2.1.4- Tripanosomas en primates no humanos platirrinos, y en <i>Alouatta caraya</i> en Argentina	28
2.1.5- Insectos vectores de <i>Trypanosoma</i> sp.: Triatominos.....	31
2.1.6- <i>Trypanosoma cruzi</i> en el Noreste argentino.....	33
2.1.7- Diagnóstico y caracterización molecular de <i>T. cruzi</i> y otras especies de tripanosomas.....	35
2.1.8- Objetivos e hipótesis	38
2.2. Metodología.....	39
2.2.1- Descripción de los sitios de estudio	39
2.2.2- Identificación y localización de los grupos de monos	42
2.2.3- Colecta de muestras para el diagnóstico de tripanosomátidos en los monos	42
- Captura de los animales.....	43
- Colecta de muestras biológicas para el diagnóstico de tripanosomas.....	46
2.2.4- Xenodiagnóstico.....	47
2.2.5- Caracterización molecular de la infección por tripanosomas en las muestras de sangre.....	49
- Extracción de ADN.....	49
- Reacciones de amplificación por PCR.....	49
- Análisis por secuenciación.....	53
2.2.6- Insectos vectores de <i>Trypanosoma</i> sp. en árboles dormideros de <i>Alouatta caraya</i>	53
- Muestreo con trampas adhesivas con cebo vivo	54

- Capturas por disección de nidos de aves.....	56
2.2.7- Análisis de datos.....	57
2.3. Resultados.....	58
2.3.1- Captura de los monos aulladores	58
2.3.2- Caracterización molecular de la infección por <i>Trypanosoma</i> en <i>Alouatta caraya</i> ...	61
2.3.3- Xenodiagnóstico	70
2.3.4- Insectos vectores de <i>Trypanosoma</i> sp. en árboles dormideros de <i>Alouatta caraya</i>	73
- Trampas con cebo vivo.....	73
- Capturas por disección de nidos de aves.....	75
2.4. Discusión y conclusiones.....	78
2.4.1- Infección por <i>T. cruzi</i> en <i>A. caraya</i>	78
2.4.2- Transmisión de <i>Trypanosoma cruzi</i> y la relación con variables biológicas y ambientales	82
2.4.3- Infección por <i>Trypanosoma minasense</i>	83
2.4.4- Insectos vectores de <i>T. cruzi</i> en árboles dormideros de <i>A. caraya</i>	85
2.4.5- Enfermedad de Chagas, monos aulladores y la interfase doméstica-silvestre.....	88
Capítulo 3. Infección por <i>Leishmania</i> en monos aulladores (<i>Alouatta caraya</i>) del Noreste Argentino	90
3.1. Introducción.....	90
3.1.1- Ciclo de vida de las leishmanias	90
3.1.2- Los vectores	91
3.1.3- Leishmaniasis en Argentina	94
3.1.4- <i>Leishmania</i> y primates no humanos	95
3.1.5- Objetivos e hipótesis.....	98
3.2. Metodología.....	99
3.2.1- Descripción de los sitios de estudio.....	99
3.2.2- Colecta de muestras biológicas para el diagnóstico de leishmanias en monos aulladores.....	99
3.2.3- Caracterización molecular de la infección por <i>Leishmania</i> en <i>Alouatta caraya</i>	100
- Extracción de ADN.....	100
- Reacciones de amplificación por PCR.....	100
3.2.4- Muestreo de flobótomos en árboles dormideros de <i>A. caraya</i> y en ambientes peridomésticos	101
3.2.5- Análisis de datos.....	103

3.3. Resultados.....	104
3.3.1- Caracterización molecular de la infección por <i>Leishmania</i> en <i>Alouatta caraya</i>	104
3.3.2- Flebótomos en árboles dormideros de <i>A. caraya</i> y en ambientes peridomésticos..	111
3.4. Discusión y conclusiones.....	116
3.4.1- Infección por <i>Leishmania</i> en <i>Alouatta caraya</i>	117
3.4.2- Flebótomos asociados a árboles dormideros de <i>Alouatta caraya</i> y ambientes peridomésticos ..	119
3.4.3- <i>Leishmania</i> , flebótomos y <i>Alouatta caraya</i>	122
Capítulo 4. Conclusiones finales e interrogantes que surgen del estudio	124
Interrogantes genreados a partir de los resultados.....	125
Referencias.....	127
Abreviaciones.....	151
Anexo 1: Aprobación comité de ética.....	152
Anexo 2: Planilla de datos de los monos capturados.....	153
Anexo 3: Planilla datos ambientales trampas de Noireau.....	156
Anexo 4: Planilla de datos ambientales de la captura de flebótomos.....	157

Capítulo 1 – Trypanosomátidos y monos aulladores de vida libre

1.1- Introducción

El conocimiento acerca de los procesos de transmisión de patógenos entre primates no humanos (PNH) en vida libre y poblaciones humanas y animales domésticos es escaso. Sobre los monos aulladores, se conoce que la mayoría son hospedadores de parásitos que pueden afectar la salud de los seres humanos y de animales domésticos (Stuart y col., 1998; Kowalewski y Gillespie, 2009). En esta tesis nos propusimos evaluar la frecuencia de infección causada por los trypanosomátidos pertenecientes a los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania* en los monos aulladores en vida libre del noreste argentino y estudiar la presencia de los respectivos insectos vectores en los ambientes donde habitan los monos.

Trypanosoma cruzi, *Leishmania braziliensis* y *L. (L.) infantum*, son los protozoos parásitos en los que basamos los objetivos de este trabajo. Dichos hemoparásitos causan morbilidad y mortalidad significativa en la población humana de nuestro país. Estudiar su prevalencia en los monos aulladores en vida libre, nos permite evaluar el rol de los mismos en el ciclo de transmisión silvestre de estos patógenos, y nos aporta conocimiento sobre el estado sanitario de estos primates en nuestro país y el riesgo que estas parasitosis pueden representar para su conservación.

1.1.1- Tripanosomátidos

Los tripanosomátidos son un grupo de microorganismos flagelados que parasitan a los principales grupos de organismos eucariotas (Molyneux y Ashford, 1983; Simpson, 1987). Pertenecen al orden protista *Kinetoplastida* (Honigberg, 1963), un grupo ampliamente distribuido de protozoos que poseen uno o dos flagelos. La característica morfológica que los distingue es una estructura prominente conocida como kinetoplasto, que se localiza cerca del cuerpo basal (región donde emerge el flagelo) en el interior de una única mitocondria que está ramificada por toda la célula (Figura 1.1); el kinetoplasto es una

condensación de ADN conformada por maxicírculos y minicírculos de ADN (Junqueira y col., 2005; Adl y col., 2012). Todos los tripanosomátidos son parásitos obligados.

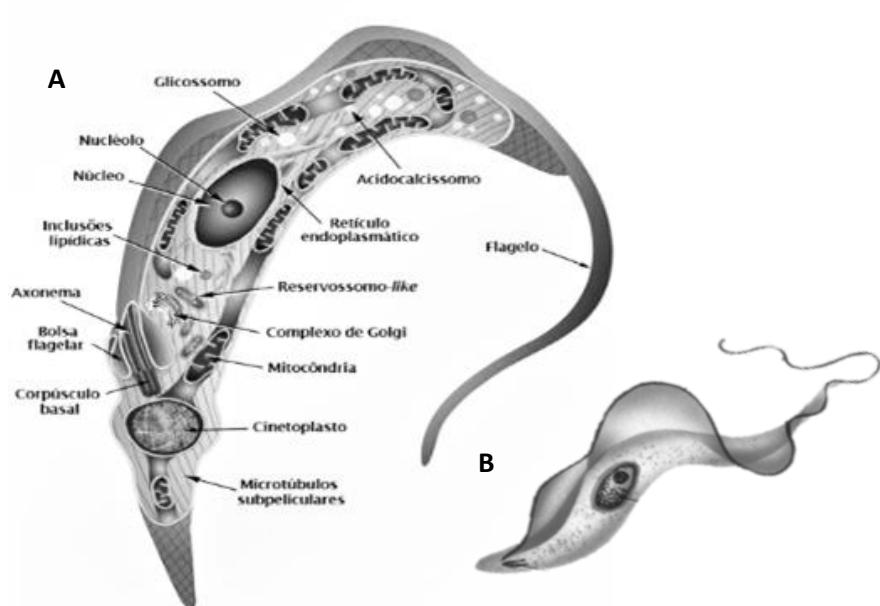


Figura 1.1- Morfología de un tripanosomático. A) Esquema donde se pueden observar las organelas, como el kinetoplasto, la mitocondria y el flagelo, entre otros, y su distribución. B) Esquema general de un tripanosomático. Ilustraciones adaptadas de imágenes halladas en internet de autor desconocido.

En el ciclo de vida de los tripanosomátidos, como los integrantes de los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania*, se requiere de un hospedador invertebrado representado por dípteros o hemípteros, y un hospedador vertebrado representado por mamíferos, reptiles o anfibios (Lake y col., 1988; Podlipaev, 2000). Los tripanosomátidos de los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania* son importantes patógenos de humanos y animales superiores, causantes de enfermedades como los distintos tipos de leishmaniasis y la enfermedad de Chagas en Latinoamérica.

1.1.2- Zoonosis y reservorios

La Organización Mundial de la Salud define a una enfermedad zoonótica como “cualquier enfermedad o infección que es transmitida naturalmente desde animales vertebrados a humanos” (WHO, 2010). Los animales juegan un rol esencial en el mantenimiento de las infecciones zoonóticas en la naturaleza. Según la bibliografía, de los patógenos humanos identificados el 58% son zoonóticos (Woolhouse y Gowtage-Sequeria, 2005).

Muchos patógenos zoonóticos se mantienen en ciclos silvestres independientemente de los ciclos domésticos, con los que pueden o no entrar en contacto. Estos focos naturales pueden permanecer no detectados hasta que personas susceptibles entran en contacto

con ellos, surgiendo así las enfermedades “emergentes” o “re-emergentes” que cada vez cobran mayor importancia para la salud humana (Ridel y col., 2004).

Dependiendo del ambiente donde ocurre la transferencia de patógenos: doméstico o silvestre, los animales vertebrados involucrados son domésticos (animales de compañía, de trabajo, para consumo, o animales en cautiverio) o animales silvestres de vida libre, respectivamente. Por otro lado, la dirección de la transferencia del patógeno puede ser la contraria, desde humanos a animales vertebrados, y se denomina antropozoonosis (Pujol, 2006).

Para que ocurra el ciclo de transmisión de un patógeno en un determinado espacio y tiempo es necesario que estén presentes todos los factores que lo componen. Noireau y col. (2009) definen a un reservorio como una especie o un conjunto de especies (o hábitats) responsables de la mantención a largo plazo de un parásito dado en la naturaleza, en un ambiente en particular, garantizando la circulación indefinida del mismo en un determinado recorte espacial y temporal. La importancia de un reservorio depende principalmente, en el caso de enfermedades de transmisión vectorial, de su prevalencia de infección, su capacidad para infectar al vector y su tasa de contacto con el vector (Cohen y Gürtler, 2001). Una alta capacidad de infectividad al vector demuestra una alta competencia como reservorio en comparación con las especies de hospedadores que solamente manifiestan la infección por la presencia de anticuerpos o que se detecta con otras técnicas más sensibles cuando la parasitemia es muy baja (e.g., PCR) (Ceballos, 2010).

Estudiar los factores que componen a los procesos de las zoonosis es de gran importancia en la actual situación de emergencia y re-emergencia de enfermedades como consecuencia de los cambios en el clima y de las transformaciones en los paisajes naturales y no naturales generadas por las actividades humanas. Las consecuencias biológicas producidas en las poblaciones de los vectores a causa de las modificaciones ambientales y climáticas afectan a los ciclos de transmisión de las enfermedades de transmisión vectorial, y por lo tanto su posibilidad de emergencia (Klepac y col., 2024).

1.1.3- Zoonosis en primates no humanos del nuevo mundo

La cercana relación filogenética entre humanos y PNH, junto a la expansión exponencial de la población humana y sus actividades en los hábitats de los monos, ha incrementado el potencial para el intercambio de patógenos (Gillespie y Chapman, 2008).

Estudios referidos a enfermedades en PNH, en general se enmarcan en dos direcciones: en el riesgo que las mismas representan para el estado de conservación de las poblaciones de primates amenazadas (Da Silva y col., 2008), y en el conocimiento que aportan sobre el rol de los primates como reservorios en el ambiente silvestre de patógenos de implicancia en salud pública. Ambas son importantes, tanto en la biología de la conservación de los primates como en la vigilancia de epizootias de importancia sanitaria para la población humana, donde los monos por ejemplo pueden ser centinelas en la emergencia de enfermedades como es el caso del virus de la fiebre amarilla (Butcher, 1991; Holzmann y col., 2010). El virus de la fiebre amarilla puede producir masivas mortandades de monos aulladores que proporcionan una alerta temprana a las autoridades de salud sobre la circulación viral y la necesidad de vacunar a la población humana (Bicca-Marques y col., 2010). En estos casos, los aulladores juegan un rol fundamental para la salud pública (Moreno y col., 2015).

Existen diversos factores de riesgo ecológicos y socio-ecológicos que favorecen la transmisión de patógenos entre los PNH neotropicales de vida libre, y también de forma zoonótica o antropozoonótica involucrando otras especies (Pedersen y Davies, 2009; Carrillo-Bilbao y col., 2021). En el norte de nuestro país la deforestación se ha incrementado en las últimas décadas (UMSEF, 2017), registrándose una gran pérdida del bosque nativo. Los monocultivos y el desmonte de fragmentos enteros con establecimiento de pastos exóticos para ganadería han cambiado profundamente la composición natural de los bosques y suelos (Zunino y Kowalewski, 2008). Los estudios en *A. caraya* indican que las modificaciones antropogénicas en bosques nativos y la deforestación de bosques ribereños, que viene ocurriendo en las últimas décadas y que son cada vez más frecuentes, limitan la dispersión de la especie y pueden llevar al aislamiento de las poblaciones (Oklander y col., 2019). Las poblaciones de *A. caraya* de Argentina habitan en el límite más austral del rango de distribución de la especie, tienen un tamaño efectivo reducido y pueden estar genéticamente limitadas para enfrentar

eventos como brotes de fiebre amarilla, que podrían afectar rápidamente a todos los individuos que habitan gran parte del área de distribución de la especie (Holzmann y col., 2010; Agostini y col., 2014; Oklander y col., 2017). Asimismo, el creciente proceso de urbanización, la pérdida y fragmentación del hábitat de los monos aulladores, incrementan las posibilidades de intercambio multidireccional de patógenos, generando desafíos para la conservación de la biodiversidad y la salud pública (Gillespie y Chapman, 2008).

Estudios que abarcan diferentes tipos de patógenos potencialmente zoonóticos fueron y son llevados a cabo en PNH neotropicales libres y en cautiverio, en general con el objetivo de evaluar su rol en el ciclo de transmisión de los mismos. En el trabajo de revisión de Carrillo-Bilbao y col. (2021) se registran gran parte de los trabajos de investigación de infección por patógenos zoonóticos (bacterias, virus, y protozoos) en PNH neotropicales libres y en cautiverio o semicautiverio realizados hasta la actualidad.

Asimismo, diversos estudios fueron realizados en poblaciones de PNH direccionados a la detección de infecciones causadas por tripanosomátidos, muchos de los cuales están dirigidos a la detección de *T. cruzi*, agente causante de la enfermedad de Chagas, y de *Leishmania* sp. como veremos en los siguientes capítulos. En Argentina los estudios de infección por estos patógenos en PNH son escasos; lo cual sumado a la emergencia de leishmaniasis y la todavía presente transmisión vectorial de Chagas en la región, nos motivó a llevar a cabo este estudio en el año 2010 en las poblaciones de *Alouatta caraya* (Primates: Atelidae) en una región del noreste de la Argentina.

1.1.4- Los monos aulladores negros y dorados (*Alouatta caraya*)

Los monos aulladores *A. caraya* (Figura 1.2) presentan una amplia distribución geográfica, que se extiende desde México hasta el sur de Brasil, y Noreste de Argentina donde habita las selvas de inundación, sobre el sistema de islas del río Paraná, y la selva en galería al este y oeste del río Paraná en el Chaco húmedo (Crockett y Eisenberg, 1987) (Zunino y Kowalewski, 2008). El norte de Argentina abarca el límite sur de la distribución de *A. caraya*, y estos representan la mayor proporción en biomasa de los mamíferos arbóreos en esa región (Brown y Zunino, 1994). Esta especie de primates es la única que habita en el sistema de islas del río Paraná (Kowalewski y Zunino, 2004; Kowalewski y col., 2019). La densidad ecológica de *A. caraya* en el área rural alrededor de la Estación

Biológica Corrientes es cercana a un individuo por hectárea (Zunino y col., 2007), mientras que en el sistema de islas del Río Paraná (selva inundada) es de casi tres individuos por hectárea (Kowalewski y Zunino, 2004, Kowalewski y col. 2019). Como otros aulladores, *A. caraya* en general tolera bien una deforestación moderada (Bicca-Marques, 2003; Zunino y col. 2007).



Figura 1.2. Mono aullador negro y dorado (*Alouatta caraya*). A y C) Individuos hembra y juveniles. B y D) Individuos machos adultos.

En todas las especies de aulladores los machos son por lo menos 25% más pesados que las hembras (dimórficos). *Alouatta caraya* a diferencia de otros aulladores, tiene un marcado dicromatismo sexual (Figura 1.2), los machos adultos son negros y las hembras rubias o doradas, machos y hembras nacen rubios y los machos se van oscureciendo a medida que maduran (Rumiz, 1990; Bicca-Marques y Calegaro- Marques, 1994). Viven en grupos sociales que pueden estar compuestos por 1 a 4 machos reproductivos, varias hembras y juveniles, alcanzando tamaños de grupos de hasta 15 individuos (Rumiz, 1990; Bravo y Sallenave, 2003; Kowalewski y Zunino, 2004; Kowalewski, 2007; Kowalewski y Garber, 2010; Di Fiore y col., 2011). Los grupos permanecen en un área de acción estable, de dimensión variable según el ambiente, en la que se alimentan, desplazan, duermen, etc. Los aulladores minimizan el tiempo de traslado y dedican gran parte del tiempo al reposo diario. Durante las noches se agrupan de forma cohesiva en los árboles dormideros.

Asimismo, los grupos de monos mantienen el uso de algunos árboles para dormir durante la noche (Kowalewski y Zunino, 2005; Brividoro y col., 2019).

En diversas localidades del noreste argentino es frecuente el contacto de poblaciones humanas con poblaciones de *A. caraya*, los cuales se acercan periódicamente a las viviendas que aún conservan fragmentos de bosque (Zunino y Kowalewski, 2008). Éstos pueden permanecer durante días en dichas áreas, y bajo estas circunstancias, la probabilidad de que la población humana y de monos compartan enfermedades infecciosas se ve incrementada (Kowalewski y Gillespie, 2009). Por lo tanto, esas áreas compartidas podrían ser un factor de importancia sanitaria en localidades rurales con áreas silvestres vecinas, representando un riesgo potencial de transmisión zoonótica y/o antropozoonótica de patógenos (Kowalewski y col., 2011; Kuthyar y col., 2022).

Dada la alta abundancia de esta especie de monos en la región y su cercanía con los ambientes peridomésticos como ocurre en muchos casos, consideramos que son un buen modelo para estudiar la presencia de tripanosomátidos como *T. cruzi*, *L. (L.) infantum* y *L. (V.) braziliensis* en el ambiente silvestre, parásitos que son de interés para la salud pública en nuestro país y en la región. Por otro lado, estos hemoparásitos podrían estar afectando la salud de estos primates, y también el estado de conservación de los mismos en sitios donde la población de aulladores en vida libre se encuentra amenazada, como es el caso de la población de *A. guariba* en la provincia de Misiones. Esta especie de primates quedó reducida a unos pocos individuos luego del brote de fiebre amarilla en el año 2008-2009 en la provincia de Misiones (Holzmann y col., 2010; Agostini y col., 2019). Asimismo, en esta provincia las leishmaniasis tienen un papel importante dentro de las parasitosis que pueden estar manteniendo su ciclo en el ambiente silvestre y que son de interés para la salud pública. Por ello, estudiar las infecciones que afectan a los primates en vida libre puede aportar importantes conocimientos sobre su estado sanitario, y también sobre el rol de los mismos en los ciclos de transmisión silvestre de patógenos de interés para la salud pública.

1.2- Objetivos

El objetivo general del estudio es evaluar la infección y los vectores implicados en el ciclo de transmisión silvestre de los hemoparásitos *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania braziliensis* y *L. (L.) infantum* en monos aulladores negros y dorados en vida libre, en ambientes con diferente grado de urbanización del noreste argentino. De esta manera, buscamos aportar al conocimiento sobre los potenciales hospedadores de los parásitos mencionados en el ambiente silvestre del noreste de nuestro país.

La tesis se estructura en cuatro capítulos donde se abarca el estudio de la infección por *Trypanosoma* y *Leishmania* en monos aulladores en vida libre, y los estudios de las poblaciones de insectos potencialmente vectores: triatomínos hematófagos y flebótomos, respectivamente.

Por otro lado, el estudio se realiza en sitios que presentan diferencias en cuanto a sus características ambientales, y en estos lugares los grupos de monos interaccionan con los ambientes domésticos en distinto grado, lo que nos permite evaluar si existe alguna asociación entre los sitios de estudio y la presencia y prevalencia de los patógenos en estudio, y también con las comunidades de insectos, potenciales vectores, que se registren en los sitios donde habitan los monos.

Objetivos específicos

- Detectar y tipificar por técnicas de diagnóstico molecular la infección por *T. cruzi* (capítulo 2), *L. (V.) braziliensis*, y *L. (L.) infantum* (capítulo 3) en monos aulladores negros y dorados del noreste argentino en sitios con diferente grado de urbanización, estimando las prevalencias en cada sitio de estudio.
- Estudiar la asociación entre las prevalencias de infección por *T. cruzi*, *L. (V.) braziliensis*, y *L. (L.) infantum* en monos aulladores, y el grado de urbanización de los sitios de estudio.
- Estudiar la distribución y abundancia de los respectivos insectos vectores, flebótomos y triatomíños, en las áreas de estudio, y su asociación con los distintos ambientes estudiados.
- Determinar la infección por tripanosomas en los triatomíños colectados.

Capítulo 2 – Infección por *Trypanosoma cruzi* y otros tripanosomas en *Alouatta caraya*

2.1- Introducción

El parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) es el causante de la enfermedad de Chagas en humanos. La enfermedad de Chagas es una enfermedad zoonótica parasitaria confinada principalmente al continente americano y representa uno de los problemas de salud pública más importantes en América Latina. Entre seis y siete millones de personas están infectadas en el mundo por este parásito, y la mayoría de los casos ocurren en Latinoamérica (OMS, 2024), asimismo se estima que en nuestro país existen entre 1,5 y 2 millones de personas infectadas (Sanmartino y col., 2015). En este capítulo describimos el trabajo realizado para estudiar la infección por *Trypanosoma* spp. en monos aulladores en vida libre, y evaluar la presencia de insectos vectores potenciales en el noreste de nuestro país.

En Argentina, el área endémica para la enfermedad de Chagas, está definida por la presencia de los insectos vectores triatomínos (vinchucas) y comprende a 19 provincias (Catamarca, Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, La Pampa, La Rioja, Mendoza, Misiones, Neuquén, Río Negro, Salta, San Juan, San Luis, Santa Fe, Santiago del Estero y Tucumán). No obstante, el perfil epidemiológico de la enfermedad de Chagas en Argentina en los últimos años se ha modificado y la transmisión congénita se convirtió en la vía que genera mayor número de casos nuevos por año (Sanmartino y col., 2015; MSAL, 2021).

La enfermedad de Chagas tiene dos fases en humanos: 1) la fase aguda, que dura unos dos meses después de contraer la infección, en la que circulan por el torrente sanguíneo una gran cantidad de parásitos, pero en la mayoría de los casos no hay síntomas o estos son leves y no específicos; 2) la fase crónica, en la que los parásitos permanecen ocultos principalmente en el músculo cardíaco y digestivo. Hasta un 30% de los pacientes sufren trastornos cardíacos y hasta un 10% presentan alteraciones digestivas, neurológicas o

mixtas. Con el paso de los años, la infección puede causar muerte súbita por arritmias cardíacas o insuficiencia cardíaca progresiva como consecuencia de la destrucción del músculo cardíaco y sus inervaciones (OMS, 2024).

2.1.1- *Trypanosoma cruzi* y su ciclo de vida

El *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Chagas, 1909) es un protozoo unicelular flagelado perteneciente al orden Kinetoplastida y a la familia Trypanosomatidae, con un ciclo de vida complejo que requiere de un hospedador invertebrado y de un hospedador vertebrado. El género *Trypanosoma* se divide en dos grupos dependiendo del desarrollo del parásito: Stercoraria y Salivaria. En el primer grupo los tripanosomas se desarrollan en el tubo digestivo del vector, con liberación de las formas infectivas en las heces, el tripanosoma más importante de este grupo para el ser humano es *T. cruzi*. En el segundo grupo los tripanosomas se desarrollan en el tubo digestivo y llegan a las glándulas salivales, donde son inoculadas mecánicamente con la saliva. Los tripanosomas de este grupo ocurren principalmente en África, y *T. brucei* es el integrante más importante por ser el parásito causante de la enfermedad del sueño en dicho continente (Hoare, 1972).

El ciclo de vida de *T. cruzi* transcurre entre un hospedador vertebrado y un insecto invertebrado generalmente de la familia Triatominae (Reduviidae: Triatominae). Su desarrollo tiene varias etapas de reproducción asexual, que ocurren en ambos tipos de hospedadores, pasando por tres estadios que se diferencian en su morfología celular y según el hospedador en el que se encuentran: epimastigotes (forma replicativa en el vector), tripomastigotes (forma infectiva), y amastigotes (forma replicativa en el mamífero) (Figura 2.1).

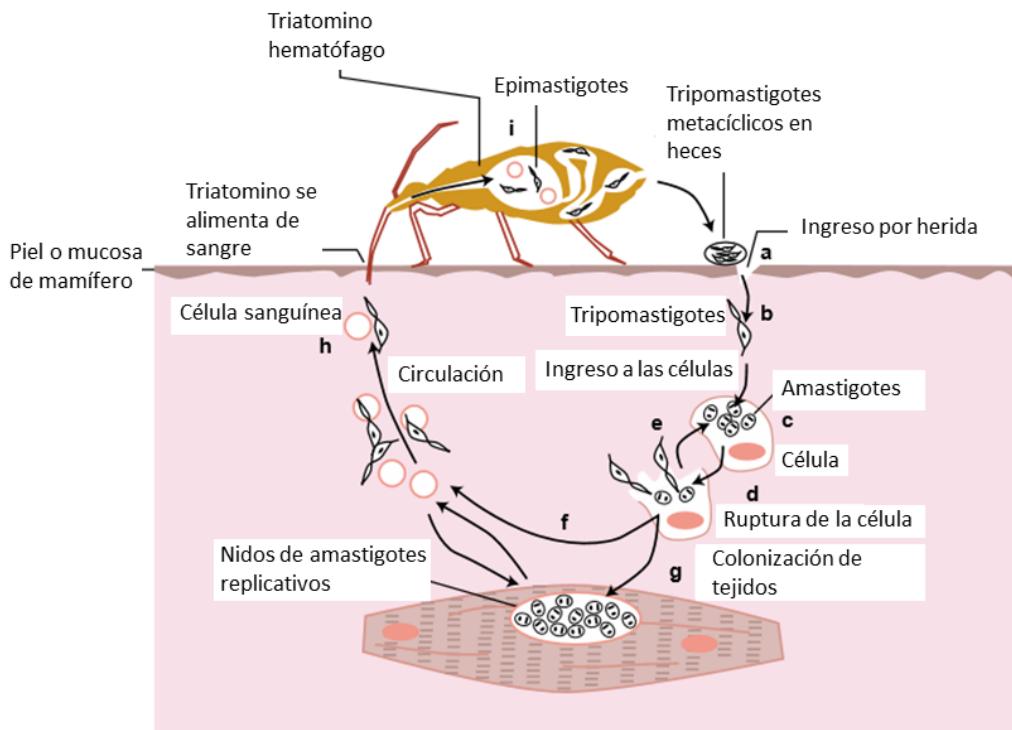


Figura 2.1. Descripción del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*: un insecto triatomino infectado se alimenta de sangre de un hospedador mamífero liberando sus heces conteniendo tripomastigotes metacíclicos al mismo tiempo; los tripomastigotes ingresan al hospedador por alguna herida, que puede ser consecuencia de la misma picadura, o por mucosas (a, b); e invaden las células cercanas donde se diferencian en amastigotes intracelulares (c); estos se multiplican por fisión binaria, y se diferencian en tripomastigotes que son liberados a la circulación sanguínea (d, e, f); los tripomastigotes pueden infectar células de distintos tejidos donde se transforman en amastigotes intracelulares generando nuevos sitios de infección (g); el ciclo de vida se cierra cuando un triatomino no infectado ingiere sangre de un hospedador con tripomastigotes circulantes (h), que se transformaran en epimastigotes en el intestino del insecto vector, donde se multiplicarán y diferenciarán en tripomastigotes metacíclicos infectivos (i). Adaptado de Macedo y col. (2002).

Entre los tripanosomátidos, *T. cruzi* abarca un rango de hospedadores mamíferos e insectos vectores muy amplio, siendo capaz de parásitar los más variados tejidos (Hoare, 1972). Estas capacidades permiten la existencia de al menos dos tipos ciclos de transmisión para este patógeno: silvestre y doméstico. Ambos ciclos pueden ocurrir simultánea o independientemente involucrando distintos vectores y reservorios (Diotaiuti y col., 1995) (Figura 2.3). El solapamiento entre los paisajes antrópicos y silvestres, permite la invasión de un actor del ciclo doméstico en el medio silvestre y viceversa. Estos solapamientos aumentan su probabilidad de ocurrencia en tanto el ser

humano avanza sobre las áreas naturales, y consecuentemente puedeemerger o re-emerger la enfermedad.

En el ambiente silvestre en general, la infección es sostenida por más de 160 especies de mamíferos pertenecientes a 25 familias en el continente americano, siendo los marsupiales, armadillos, roedores, carnívoros, murciélagos, y primates, los hospedadores selváticos más frecuentemente infectados (Barretto y col., 1979; Barretto, 1985; Zeledón, 1974; Miles y col., 2003; Noireau y col., 2009). En el Chaco húmedo argentino, las zarigüeyas *Didelphis albiventris* y los armadillos *Dasyurus novemcinctus* son los principales hospedadores de *T. cruzi*, y cada uno de estos grupos se halla infectado por una o más cepas del patógeno (Alvarado-Otegui y col., 2012; Orozco, 2012). A pesar de la gran lista de mamíferos silvestres que se registraron infectados naturalmente por *T. cruzi*, aún hay muchas incertidumbres respecto al rol que juegan estas especies en la mantención y/o la transmisión de *T. cruzi* en el ambiente silvestre (Noireau y col., 2009). Dada la heterogeneidad genética, y la plasticidad multi-hospedador que presenta *T. cruzi*, los actores involucrados en este ciclo serán diferentes según las características biológicas y ambientales particulares de cada región geográfica.

La mayoría de las especies de insectos triatominos (Reduviidae: Triatominae) conocidas son silvestres, y casi todas pueden ser infectadas natural o experimentalmente con *T. cruzi* y pueden estar implicadas en el ciclo de transmisión silvestre del mismo (Lent y Wygodzinsky, 1979; Noireau y col., 2009). Los triatominos en este ambiente, en general, se encuentran asociados a una amplia variedad de hospedadores vertebrados, particularmente mamíferos y aves que habitan en nidos y cuevas (Schofield y col., 1999). Una gran cantidad de estas especies silvestres ocasionalmente pueden invadir las viviendas humanas, y así contribuir en la transmisión de *T. cruzi* al hombre y en la introducción de *T. cruzi* desde el ciclo silvestre al doméstico o peridoméstico (Noireau y col., 2005; Schofield y col., 1999).

El ciclo doméstico involucra la circulación del parásito entre triatominos domiciliados, humanos, y animales domésticos y sinantrópicos. El escenario para la ocurrencia de este ciclo normalmente es de viviendas precarias rurales que se hallan infestadas con “vinchucas”, y en las que las personas viven en condiciones de necesidades básicas insatisfechas (Ceballos, 2010). Recientemente también se registran colonizaciones de triatominos en viviendas como consecuencia de las aglomeraciones urbanas (Carbajal y

col., 2022; Provecho y col., 2021). Así el Chagas urbano representa un nuevo desafío para el problema de la enfermedad de Chagas debido a las características particulares de los aglomerados urbanos (Carbalal y col., 2022).

2.1.2- Vías de transmisión de *Trypanosoma cruzi*

La transmisión de *T. cruzi* puede ocurrir por distintas vías; estas dependerán del nivel de endemidad de la infección y del tipo de control vectorial implementado en el sitio en cuestión. Las vías de transmisión posibles son: vectorial, vertical (congénita), por trasplante de órganos o transfusión de sangre (horizontal), y oral.

La principal y más conocida es la transmisión vectorial, sin embargo, la mejora en el control de vectores y también sobre la vía transfusional, ha reducido estas vías de transmisión (Días y col., 2002). Asimismo, se ha registrado un aumento en la incidencia de la transmisión congénita, lo cual puede estar asociado entre otros factores al aumento de cobertura de diagnóstico para *T. cruzi* en la mujer embarazada (Schofield y col., 2006; Gürtler, 2007; Danesi y col., 2019).

La **transmisión vectorial** ocurre a través del contacto de mamíferos con las heces de múltiples especies de insectos hematófagos de la familia Triatominae (Reduviidae: Triatominae). Cuando un triatominio infectado se alimenta de la sangre de un hospedador mamífero libera sus heces, que contienen tripomastigotes infectivos, los cuales ingresarán al hospedador por alguna herida, que puede ser consecuencia de la misma picadura, o a través de alguna mucosa (Figura 2.1). *Triatoma infestans* es el principal vector de *T. cruzi* en el ambiente doméstico del cono sur de América. Los insectos triatominos habitan en viviendas desde el sur de Estados Unidos hasta el sur de Argentina, ellos encuentran un hábitat favorable en las grietas de paredes y techos, y también en hábitats peridomésticos como corrales, gallineros, depósitos y otros. Las áreas rurales de bajos recursos son las más afectadas por la infestación de las viviendas con triatominos domésticos (Sanmartino y col., 2015).

La **transmisión vertical o congénita**, se refiere a la transmisión del parásito de una generación a la siguiente (Carlier y Truyens, 2010; Carlier y col. 2015). A raíz de la aplicación de planes de vigilancia vectorial y de los controles en los bancos de sangre, la transmisión vertical pasó a ser una de las vías más importantes para la persistencia de la infección en la población humana (Gürtler y col., 2003). La transmisión congénita es

escasamente estudiada en animales silvestres en vida libre, principalmente por las dificultades que representa manipular un animal recién nacido en estas condiciones (Jansen y col., 2015). Hasta la fecha, la única observación de transmisión congénita de *T. cruzi* en animales silvestres en vida libre fue reportada en murciélagos (Añez y col., 2009). En cambio, en condiciones experimentales hay abundantes artículos acerca de la transmisión congénita en diferentes especies de mamíferos (Alkmim-Oliveira y col., 2013). En un estudio en *Leontopithecus rosalia* en vida libre, una especie de primate platirrino en grave peligro de extinción, sugieren que la transmisión vertical es improbable dado que ninguno de los infantes examinados resultó positivo, y que probablemente la infección con *T. cruzi* ocurra por contaminación con las heces de triatominos infectados mediante su picadura o por transmisión oral al consumir alimento contaminado con heces infectadas (Lisboa y col., 2000; 2015).

La **transmisión oral**, por la ingesta de alimentos contaminados con el parásito (Nóbrega y col., 2009; Souza-Lima y col., 2013), parece ser un mecanismo muy importante en la dispersión de *T. cruzi* en mamíferos silvestres (Da Silva y col., 2008; Roque y col., 2008; Marcili y col., 2009a; Rocha y col., 2013; Lisboa y col., 2015; Santana y col., 2019). La eficiencia de esta vía de transmisión fue comprobada por varios estudios de infección experimental en roedores y zarigüeyas (Barreto y col., 1978; Calvo Mendez y col., 1992). También se observó que los jugos gástricos mejoran el potencial infectivo del parásito (Hoft y col., 1996; Cortez y col., 2006). La vía de transmisión oral puede explicar mejor la infección en grandes depredadores, que la vía vectorial la cual implica la contaminación con heces de triatominos infectados de la piel de estos animales, a menudo densamente pilosa (Roque y col., 2008; Rocha y col., 2013). También en sitios donde la transmisión vectorial en humanos no es frecuente, dado que no hay especies de triatominos que invadan las viviendas, y tampoco hay abundancia de viviendas, este mecanismo es considerado muy importante. Los antecedentes científicos han demostrado la aparición de numerosos casos humanos de infección con *T. cruzi* por vía oral debida a la contaminación de alimentos con heces de triatominos silvestres o con secreciones de reservorios, en regiones como el Amazonas y en áreas de diferentes países latinoamericanos (Marcili y col., 2009a; Shikanai-Yasuda y Carvalho, 2012; Rueda y col., 2014). Los casos fueron mayormente atribuidos al consumo de jugos, agua, frutas y otros alimentos infectados con *T. cruzi* (Shikanai-Yasuda and Carvalho, 2012).

2.1.3- Las distintas cepas de *T. cruzi* y su especificidad con el hospedador

La variedad de hospedadores reservorios y de insectos vectores que se encuentran implicados en la transmisión de *T. cruzi* puede explicar, en términos evolutivos, las variaciones entre las distintas cepas de *T. cruzi* (Zeledón, 1974). Las poblaciones naturales de *T. cruzi* están clasificadas en siete Unidades Discretas de Tipificación (UDTs), *T. cruzi* I – *T. cruzi* VI y *T. cruzi* Bat, que ha sido propuesto en último lugar, cercano filogenéticamente a TcI y prácticamente restringido a los murciélagos (Tibayrenc, 2003; Zingales y col., 2009; Marcili y col., 2009b; Zingales y col., 2012). Las UDTs son definidas como un conjunto de cepas que están genéticamente más relacionadas entre sí que con cualquier otra cepa, y se identifican mediante marcadores genéticos, moleculares o inmunológicos comunes (Tibayrenc, 1998).

Las UDTs de *T. cruzi* se distribuyen diferencialmente entre insectos triatominos, hospedadores vertebrados, hábitats, y en diferentes áreas geográficas (Higo y col., 2004; Maffey y col., 2012). Según la bibliografía *T. cruzi* I circula en los ciclos selváticos del continente americano, y en algunos ciclos domésticos, está asociado a mamíferos marsupiales del género *Didelphis* (zarigüeyas), los cuales habitan en ecosistemas arbóreos y terrestres, peridomésticos y selváticos (Bernabe y col., 2000; Diosque y col., 2003; Yeo y col., 2005; Ceballos y col., 2006; Alvarado-Otegui y col., 2012; Orozco y col., 2013; Enriquez y col., 2012). *Trypanosoma cruzi* II, V y VI se registra en ciclos domésticos, en Brasil y en países del cono sur del continente americano (Diosque y col., 2003; Yeo y col., 2005; Burgos y col., 2007; Noireau y col., 2009; Enriquez y col. 2012). *Trypanosoma cruzi* III se ha encontrado en armadillos (*Dasypus novemcinctus*) a través del continente americano (Yeo y col., 2005; Lewis y col., 2009; Alvarado-Otegui y col., 2012; Orozco y col., 2013; Cura, 2014), mientras que *T. cruzi* IV ha sido aislado mayormente de mamíferos silvestres en el norte de la cuenca del Amazonas y en Estados Unidos (Bernabe y col., 2000; Yeo y col., 2005; Llewellyn y col., 2009). Los primates no humanos en vida libre parecen estar naturalmente asociados con *T. cruzi* I, *T. cruzi* II y *T. cruzi* IV en la selva Atlántica y Amazónica (Lisboa y col., 2006; Da Silva y col., 2008; Marcili y col., 2009; Araújo y col., 2011; Lisboa y col., 2015).

En la Tabla 2.1 se expone el registro de las UDTs de *T. cruzi* que circulan en Argentina en distintos hospedadores silvestres y domésticos.

Hospedador	Provincia	Localidad	Linaje	Referencia
Zarigüeyas (<i>Didelphis albiventris</i>)	Chaco	Pampa del Indio	<i>T. cruzi</i> I	Alvarado-Otegui y col., 2012
		Chacabuco	<i>T. cruzi</i> I	Orozco y col., 2013
	Santiago del Estero	Amamá	<i>T. cruzi</i> I	Diosque y col., 2003
		Misiones	<i>T. cruzi</i> I	Ceballos y col., 2006
	Misiones	Capital	<i>T. cruzi</i> I	Argibay y col., 2016
Armadillo de nueve bandas (<i>Dasypus novemcinctus</i>)	Chaco	Pampa del Indio	<i>T. cruzi</i> III	Orozco y col., 2013
Piche llorón (<i>Chaetophractus vellerosus</i>)	Chaco	Pampa del Indio	<i>T. cruzi</i> III	Alvarado-Otegui y col., 2012
Tatú bola (<i>Tolypeutes matacus</i>)	Chaco	Pampa del Indio	<i>T. cruzi</i> III	Cura, 2014
Zorrino (<i>Conepatus chinga</i>)	Santiago del Estero	Amamá	<i>T. cruzi</i> III	Orozco y col., 2013
	Chaco	Pampa del Indio	<i>T. cruzi</i> III	Ceballos y col., 2006
Cuis (<i>Microcavia australis</i>)	Tucumán	Tafí del Valle	<i>T. cruzi</i> I	Argibay y col., 2016
Gato doméstico (<i>Felis catus</i>)	Chaco	Pampa del Indio	<i>T. cruzi</i> VI	Cécere y col., 2015
Perro doméstico (<i>Canis familiaris</i>)	Chaco	Chacabuco	<i>T. cruzi</i> V	Enriquez y col., 2013
			<i>T. cruzi</i> VI	Diosque y col., 2003
			<i>T. cruzi</i>	
Vampiro común (<i>Desmodus rotundus</i>)	Misiones	Candelaria	<i>T. cruzi</i> II	Argibay y col., 2016
Humanos (<i>Homo sapiens</i>)	Chaco	Chacabuco	<i>T. cruzi</i> V	Diosque y col., 2003
	Buenos Aires*	Buenos Aires*	<i>T. cruzi</i> V	Burgos y col., 2007

Tabla 2.1. Antecedentes de los distintos linajes de *T. cruzi* registrados en Argentina.

*Resultados de pacientes que viven en Buenos Aires pero provienen de localidades endémicas de Bolivia y Argentina.

2.1.4- Tripanosomas en primates no humanos platirrinos, y en *Alouatta caraya* en Argentina

Como mencionamos en la sección anterior, *T. cruzi* es un parásito que infecta a un gran número de especies de mamíferos silvestres participando de complejos ciclos de transmisión en el ambiente silvestre. *Trypanosoma cruzi* y otros tripanosomas se registraron infectando a un amplio rango de géneros de primates no humanos neotropicales en diversos trabajos de investigación, independientemente de su comportamiento social, o de su hábitat (e.g. Ziccardi y col., 2000; Da Silva y col., 2008;

Marcili y col., 2009a; Tenorio y col., 2014; Lisboa y col., 2015; Aysanoa y col., 2017; Carrillo Bilbao y col., 2021).

Las altas prevalencias registradas de *T. cruzi* en algunas especies de primates no humanos en vida libre y la estabilidad de las infecciones en el tiempo (Lisboa y col., 2015; Aysanoa y col., 2017), sugieren que estos juegan un rol importante en la mantención del parásito en la naturaleza, y también que los primates no humanos en vida libre se encuentran altamente expuestos a la infección por tripanosomas (Lisboa y col., 2006). Asimismo, en algunos trabajos demostraron una alta infectividad potencial para los primates no humanos junto con los órdenes Didelphimorphia y Carnivora Procyonidae, dados los resultados de hemocultivos positivos (indicador de alta parasitemia) registrados (Jansen y col., 2018).

En un estudio se registró la infección por *T. cruzi* en varias especies de las familias Cebidae y Callitrichidae que ocupan diferentes estratos del bosque y tienen diversos hábitos nutricionales que incluyen comportamientos de predación, sobre insectos o pequeños mamíferos, y hábitos vegetarianos (Da Silva y col., 2008). Estas características muestran que la infección por *T. cruzi* en primates en vida libre podría ser adquirida por distintos mecanismos de transmisión. La vía de transmisión oral, como ya hemos mencionado, es un eficiente mecanismo en los mamíferos silvestres, y en especial en los primates puede ser una vía importante para la transmisión de *T. cruzi*, dado que estos animales usualmente incluyen en sus dietas frutas y hojas de diferentes especies de palmeras que pueden ser microhabitats de varias especies de triatominos y pequeños mamíferos como marsupiales o roedores (Texeira y col., 2001; Da Silva y col., 2008). Excepto por *T. cruzi* y *T. rangeli*, las otras especies de tripanosomas registradas en monos, como *T. minasense*, no se reportaron infectando a humanos (Da Silva y col., 2008).

Como ya mencionamos los primates no humanos, pueden también infectarse con *T. (Megatrypanum) minasense* (e.g. Resende y col., 1994; Ziccardi y col., 2000; Sato y col., 2008; Tenório y col., 2014), el cual no es causante de enfermedad en humanos. Este tripanosoma fue detectado mediante técnicas de diagnóstico molecular por Sato y col. (2008) en primates de la especie *Saguinus midas* y *Saimiri sciureus* exportados a Japón como animales de laboratorio, y por Tenório y col. (2014) en un *A. caraya* en cautiverio. Asimismo, trypomastigotes de *T. minasense* han sido registrados por técnicas morfológicas en individuos en vida libre de *A. palliata* de Costa Rica (Chinchilla y col.,

2005). Sin embargo, se ha registrado que *T. minasense* es altamente pleiomórfico en sangre en circulación, por lo que requiere una identificación confiable de la especie, basada no solo en la morfología (Sato y col., 2008).

Si bien se han realizado algunos estudios experimentales de infección por *T. cruzi* en primates platirrinos y catarrinos (Falasca y col., 1991; Riarte y col., 1995; Espinola Carvalho y col., 2003), y también estudios de las consecuencias en la salud de monos en vida libre (Monteiro y col., 2006), el impacto de la infección por *T. cruzi*, o por otros tripanosomas, y el efecto en el estado de preservación en los primates silvestres aún no es claro. En los estudios realizados se observan anomalías cardíacas y otros síntomas similares a los producidos en humanos que padecen la enfermedad de Chagas (Falasca y col., 1991; Monteiro y col., 2006). Monteiro y col. (2006) observaron anomalías cardíacas en el 45% de los animales (*Leontopithecus rosalia*) positivos, sin embargo, no fueron lesiones capaces de causar insuficiencia cardíaca. A partir de estos resultados plantean dos hipótesis posibles: 1) que las lesiones causadas por *T. cruzi* en estos primates no son suficientemente severas como para causar enfermedad cardíaca; esto podría ser explicado por el tiempo evolutivo compartido entre el patógeno y los primates, lo que podría haber convertido la relación huésped-parásito en menos severa. Sin embargo, las anomalías graves ya descritas en otros primates neotropicales infectados experimentalmente (Falasca y col., 1991), hacen que esto no parezca probable. Y 2) los monos con lesiones graves no fueron capaces de sobrevivir, por lo que no llegaron a ser testeados. El aumento en la mortalidad en estos animales debilitados la explican, por ejemplo, por factores indirectos como la depredación.

Como venimos observando, en la bibliografía se registran las distintas especies de primates no humanos que son afectados por la infección por *T. cruzi*, sus UDTs específicas, y la amplia distribución por toda Latinoamérica de la infección en primates no humanos en vida libre. Sin embargo, no está claro aún cómo estas infecciones afectan a las poblaciones de primates silvestres, como tampoco el potencial rol que estos tienen en los ciclos de transmisión y mantención de este patógeno en los ambientes silvestres.

La información disponible sobre la infección por *T. cruzi* o por otros tripanosomas en *A. caraya* en Argentina y también en otros países es escasa. La especificidad y sensibilidad de las técnicas diagnósticas utilizadas en los estudios realizados en Argentina no permitieron hasta ahora definir con certeza la especie de los patógenos flagelados

detectados (Funayama and Barreto, 1970; Travi y col., 1982; Bar y col., 1999; Santa Cruz y col., 2000).

En los estudios realizados por Travi y col. (1982) se utilizaron muestras de animales que se encontraban en cautiverio y en vida libre, en el Centro Argentino de Primates (CAPRIM). El CAPRIM funcionó en lo que es actualmente la Estación Biológica Corrientes (EBCo-CECOAL-CONICET-UNNE), donde llevamos a cabo parte de este estudio. Los autores registraron infección natural por al menos dos especies de flagelados. Santa Cruz y col. (2000) realizó un estudio en Isla Brasilera (sitio implicado en esta tesis) detectando la presencia de flagelados por observación al microscopio óptico de extendidos sanguíneos, y los registraron como *Trypanosoma* sp. y *Plasmodium* sp.

En otras regiones de la Argentina habitadas por *A. caraya*, donde hay mayor riesgo de transmisión vectorial de *T. cruzi*, se han realizado estudios en otras especies de mamíferos en vida libre pero no hay registros en monos aulladores (e. g. Wisnivesky y col., 1992; Ceballos y col., 2006; Cardinal y col., 2008; Alvarado-Otegui y col., 2012; Orozco y col., 2013; Cécere y col., 2015; Argibay, 2018).

2.1.5- Insectos vectores de *Trypanosoma* sp.: Triatominos

Una de las principales vías de infección por *T. cruzi* es a través del contacto con las heces de insectos hematófagos de la familia Triatominae (Reduviidae: Triatominae), comúnmente llamadas vinchucas. En América Latina las especies de triatominos de interés en salud pública pertenecen a los géneros *Triatoma*, *Rhodnius*, y *Panstrongylus*; y *Triatoma infestans* (Klug, 1834), *Rhodnius prolixus* (Stål, 1859), *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) y *T. dimidiata* (Latreille, 1811) son las principales especies de triatominos implicadas en el ciclo doméstico (Minter, 1976; Sherlock, 2000; Noireau y col., 2009).

Todas las especies de triatominos fueron originalmente selváticas y, entre ellas, solo un pequeño número, fue exitoso en colonizar el ambiente doméstico, y así potencialmente llegar a implicarse en la transmisión de *T. cruzi* a humanos. Los cambios ambientales antropogénicos y los consiguientes daños a los biotopos naturales de los triatominos favorecen ese proceso sinantrópico (Noireau y col., 2009). En nuestro país *T. infestans* es la especie más importante en la transmisión vectorial doméstica (Gürtler y col., 2007).

Los triatomínos encuentran condiciones favorables para vivir en las grietas de paredes y techos, en el caso de las viviendas; en corrales, gallineros y otros en los patios de las casas; y en palmeras, nidos de aves, huecos de árboles, y cuevas de pequeños mamíferos, entre otros, en el ambiente silvestre (Bar and Wisnivesky-Colli, 2001; Damborsky y col., 2001; Noireau y col., 2002; Noireau y col., 2009; Bar y col., 2010). Algunos triatomínos mantienen especificidad en su hábitat, como especies del género *Rhodnius* asociadas primariamente a palmeras, las de *Panstrongylus* asociadas a cuevas y cavidades de árboles, y las pertenecientes a *Triatoma* que habitan huecos de árboles y hábitats rocosos (Carcavallo y col., 1998; Gaunt y Miles, 2000). Algunas especies presentan una asociación más estrecha con un tipo de hábitat, como por ejemplo especies del género *Psammolestes* que se asocian con nidos de Furnáridos, mientras otras especies como, *Panstrongylus megistus* y *Triatoma dimidiata*, se asocian a un amplio rango de ecotopos arbóreos y terrestres (Noireau y col., 2009).

Estudios en la provincia de Corrientes, registraron la presencia de triatomínos vectores de *T. cruzi*, como *T. infestans*, *T. sordida*, *T. platensis*, *T. rubrovaria*, *Panstrongylus megistus*, *Pa. geniculatus* y *Ps. coreodes* (Damborsky y col., 2001). Por otro lado, *Triatoma sordida*, *T. platensis*, *T. rubrovaria*, y *Ps. coreodes* fueron hallados en ecotopos silvestres (Bar y col., 1999b; Damborski y col., 2001; Bar y col., 2010) (Figura 2.2).

En este trabajo nos proponemos registrar los triatomínos que se encuentran compartiendo el hábitat con monos aulladores, y que podrían estar siendo parte del ciclo de transmisión de tripanosomas en estos ambientes rurales o silvestres en una región del noreste de nuestro país.

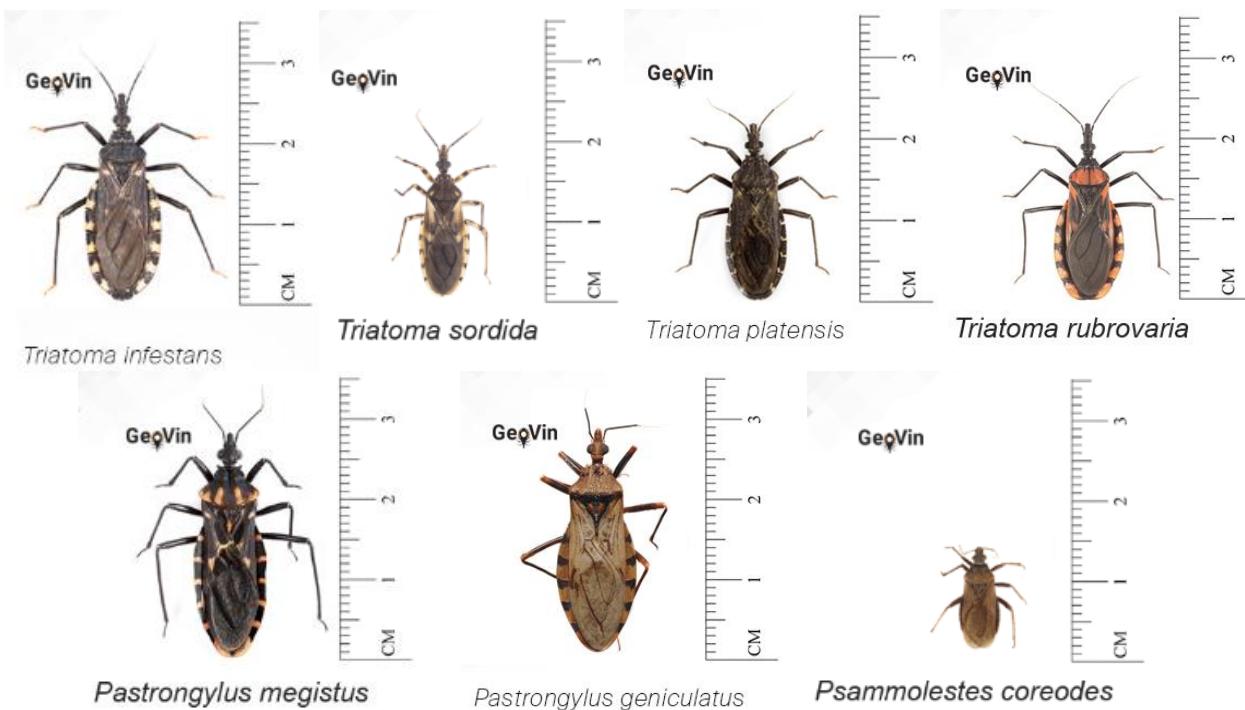


Figura 2.2. Imágenes y medidas de triatomíos hematófagos, potenciales vectores de *T. cruzi*, registrados en la provincia de Corrientes (imágenes extraídas de GeoVin, 2020 - Proyecto de Ciencia Participativa: <https://geovin.com.ar/>).

2.1.6- *Trypanosoma cruzi* en el Noreste argentino

La ecorregión del Gran Chaco incluye el norte de Argentina, Bolivia, Paraguay, y el suroeste de Brasil. Es una de las regiones más endémicas para la enfermedad de Chagas (Gürtler, 2009; Gürtler y col., 2007). El Gran Chaco se divide en Chaco húmedo y Chaco seco, y ambos ambientes se encuentran representados en Argentina (Figura 2.3). En esta región desde hace décadas se llevan a cabo investigaciones sobre la dinámica de transmisión de *T. cruzi* y sobre la caracterización de la infección en animales domésticos y silvestres, mamíferos y vectores (*e.g.* Wisnivesky y col., 1992; Bar y col., 1999a; Diosque y col., 2003; Ceballos y col., 2006; Cardinal y col., 2008; Alvarado-Otegui y col., 2012; Orozco y col., 2016). Sin embargo, los estudios en mamíferos silvestres, y en particular en primates no humanos en vida libre, en el extremo este del Gran Chaco de la Argentina son muy escasos (Santa Cruz, 2000; Travi y col., 1982).

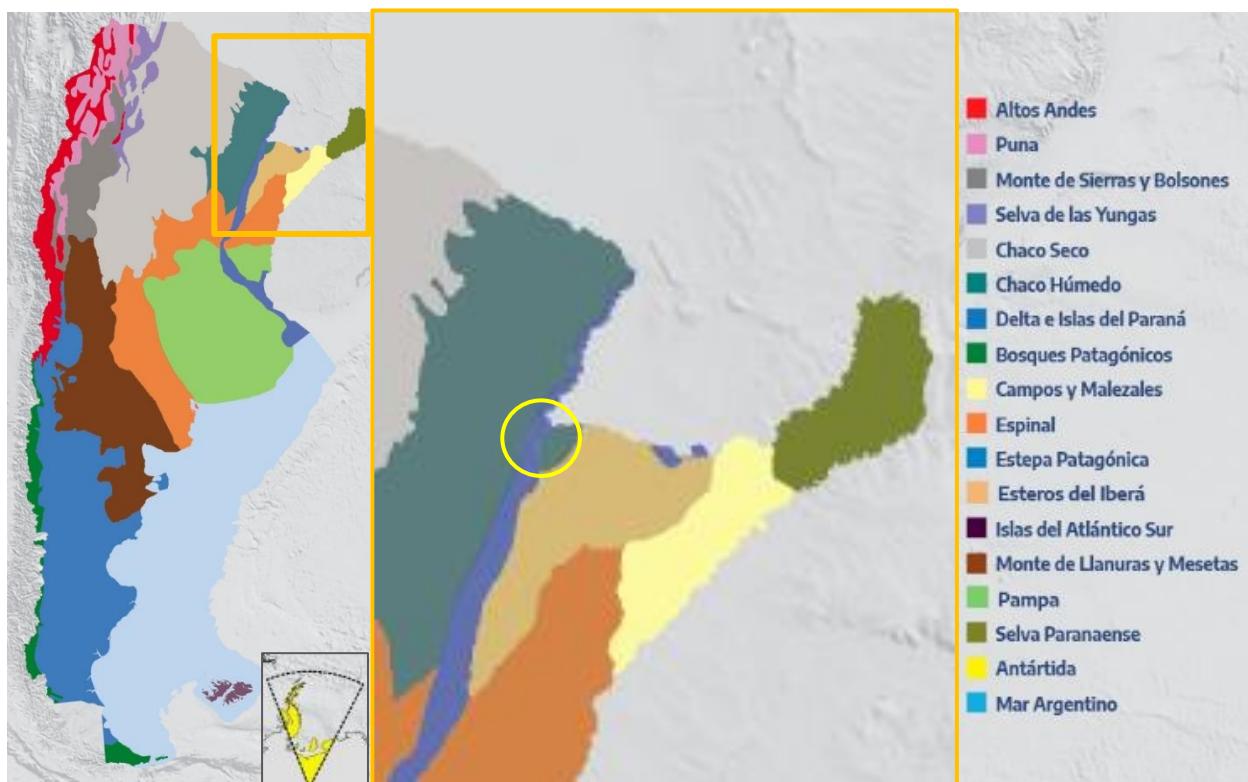


Figura 2.3. Mapa de las ecoregiones de Argentina, y ampliación del área geográfica que contiene el área de nuestro estudio (círculo amarillo). Imagen producida a partir de Mapa de Ecoregiones de Argentina en: <https://www.argentina.gob.ar/parquesnacionales/educacionambiental/ecorregiones>.

Como ya mencionamos, en la región del chaco húmedo habitan insectos triatomínos hematófagos silvestres, que son potenciales vectores de *T. cruzi*, como por ejemplo *T. sordida* y *Ps. coreodes*, las cuales colonizan biotopos silvestres como palmeras, huecos de árboles y nidos de aves (Bar y Wisnivesky-Colli, 2001; Bar y col., 2002; Damborsky y col., 2001; Bar y col., 2010). Asimismo, se hallaron especímenes de *T. sordida* infectados con *T. cruzi* en palmeras y nidos de aves, lo que evidencia su participación en la mantención del ciclo de transmisión silvestre de *T. cruzi* en la región (Bar and Wisnivesky-Colli, 2001).

Los datos de infección en la población humana de la provincia de Corrientes registraron seroprevalencias de hasta 46% en el Dpto. Ituzaingó (Bar y col., 1996; Bar y col., 2005; Bar y col., 2010). Por otro lado, Danesi y col. (2019) presentaron datos correspondientes al subsector público de salud, donde se observa que la Tasa de Infección Materna en humanos por *T. cruzi* ha disminuido satisfactoriamente en todas las provincias entre 2002 y 2014, excepto en Corrientes, y también que en 2014 Chaco fue la provincia con mayor tasa de infección materna. Asimismo, la transmisión vertical de madre a hijo es la mayor fuente de nuevos casos en Argentina en la actual etapa epidemiológica del Chagas (Lucero

en “Corrientes Hoy”, abril 2021). Por otro lado, en la provincia de Corrientes aún existe un gran número de viviendas vulnerables, tipo rancho, lo que favorece la posible recolonización y presencia de los insectos vectores (Figura 2.4) (Bar y col., 2010; Ulon y col., 2018).

En 2018 la provincia de Corrientes logró la Certificación OPS/OMS “Libre de Transmisión Vectorial Domiciliaria de la Enfermedad de Chagas”. Sin embargo, los antecedentes evidencian la necesidad de continuar con la vigilancia y estudios en la región, principalmente en los sitios de mayor vulnerabilidad, en donde las personas viven con prioridades cotidianas para resolver aún más importantes que la presencia o ausencia de las vinchucas en sus hogares.

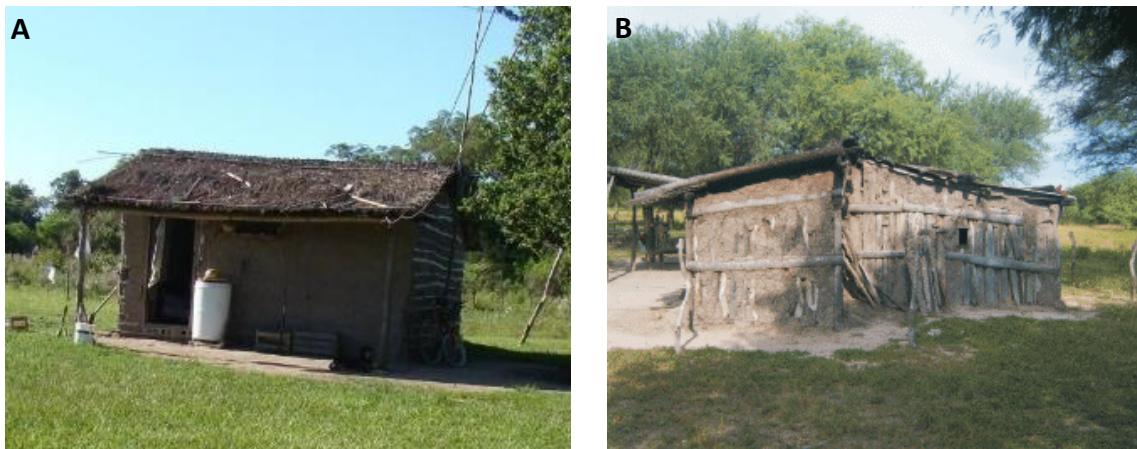


Figura 2.4. Viviendas vulnerables a la infestación por triatominos potenciales vectores de *T. cruzi* en la provincia de Corrientes: A) Vivienda ubicada en San Cayetano (fotografía tomada durante nuestro trabajo en territorio en el 2011); B) Vivienda en San Luis del Palmar (Bar y col., 2010).

2.1.7- Diagnóstico y caracterización molecular de *Trypanosoma cruzi* y otras especies del género

Hasta hace un tiempo, cuando un tripanosoma “cruzi-like” era detectado en un animal silvestre, el mismo se identificaba como *T. cruzi* cuando cumplía con determinadas características morfológicas, su capacidad de reproducirse en medios de cultivo específicos y en insectos triatominos, y su capacidad de infectar y de producir amastigotes en animales mamíferos de laboratorio (Zeledón, 1974). Hoy en día, el método más

comúnmente utilizado para el diagnóstico de enfermedades infecciosas se basa en la detección de ácidos nucleicos del agente infeccioso. La técnica más utilizada es la PCR, la cual se basa en el principio de amplificación exponencial de la secuencia de ADN específica a la que se dirige la reacción, lo que le confiere una elevada sensibilidad y especificidad analítica.

Frecuentemente, el ADN seleccionado como blanco para el diagnóstico del parásito es repetitivo, o de copia múltiple con extensiva variación intrínseca de la secuencia. Las ventajas radican en que es esencial tener un número grande de copias de la secuencia blanco para su amplificación, pues el ADN de copia única es más difícil de ser detectado especialmente cuando la parasitemia es baja. Por otro lado, las secuencias repetitivas son con frecuencia menos conservadas, por no tener función codificadora y, por lo tanto, su evolución da lugar a variación entre especies o grupos (Barker, 1990; Vallejo, 1998).

Como mencionamos en la sección 2.1.1 los protozoos pertenecientes al orden Kinetoplastida se diferencian por una estructura prominente y paraflagelar conocida como kinetoplasto. El ADN del kinetoplasto (ADN-k) está compuesto por redes de maxicírculos y minicírculos concatenados, que representan entre un 10 y 20% del ADN total del parásito (Simpson, 1987; Vallejo, 1998). El ADN-k es utilizado como blanco para el diagnóstico y la caracterización molecular de tripanosomátidos. Cada protozoo contiene entre 5.000 y 10.000 minicírculos y entre 25 y 50 maxicírculos, todos los minicírculos de ADN presentan por lo menos una región conservada que varía entre 100 y 200 pb. Cada especie de tripanosomático mantiene el mismo número de regiones conservadas, *T. cruzi* posee únicamente minicírculos con cuatro regiones conservadas, mientras que, por ejemplo, *T. rangeli* posee minicírculos con una, dos o cuatro regiones conservadas dentro de una misma cepa (Vallejo, 1998). Estos dos tripanosomas pueden infectar al hombre, y en países de América Central y del Sur, donde estos dos parásitos pueden infectar a las mismas especies de vertebrados y vectores (D'Alessandro, 1976; D'Alessandro & Saravia, 1992), el diagnóstico diferencial de los mismos se puede complicar. Las pequeñas diferencias observadas en el tamaño de los productos de PCR podrían dificultar el diagnóstico de infecciones mixtas entre estos dos parásitos (Vallejo y col. 1999, Cura 2014). Se han desarrollado estrategias de PCR capaces de distinguir ambas especies en base a diferencias de tamaño o de secuencia de los fragmentos de ADN-k amplificados (Vallejo y col., 1999; Vargas y col., 2000; Botero y col., 2010).

Una secuencia específica utilizada para el diagnóstico y caracterización molecular de *T. cruzi*, es la secuencia de ADN satélite (ADN-Sat) que presenta un gran número de repeticiones en el genoma nuclear, una secuencia específica conservada, organizada en serie, con unas 10^4 a 10^5 copias por genoma. El contenido de ADN satélite varía de 5 a 10 veces entre las Unidades Discretas de Tipificación (UDTs) de *T. cruzi* TcI/TcIV y las UDTs TcII/III/V/VI (Duffy y col., 2009).

2.1.8- Objetivos e hipótesis

Varias especies de primates no humanos del nuevo mundo se registraron infectadas con *T. cruzi*, sin embargo, no hay antecedentes precisos en monos aulladores silvestres de Argentina. Nos propusimos evaluar el rol potencial de *Alouatta caraya* en el ciclo de transmisión silvestre de *Trypanosoma cruzi* en ambientes antropizados del Noreste argentino. Investigamos la infección por *T. cruzi* y otras especies del genero en los aulladores, y la presencia de vectores triatomínos asociados a estas poblaciones de *A. caraya* en vida libre.

Objetivos específicos:

- Determinar la prevalencia de infección por *T. cruzi* y por otros tripanosomátidos en poblaciones de *A. caraya* en vida libre que habitan en lugares con diferente grado de urbanización del noreste argentino, a través de distintas técnicas diagnósticas.
- Caracterizar por métodos moleculares las UDTs de *T. cruzi* halladas en los monos aulladores.
- Estudiar la asociación entre las prevalencias estimadas y el grado de urbanización de los sitios de estudio.
- Identificar los potenciales triatomínos vectores, su abundancia y los ecotopos silvestres donde habitan.
- Determinar la infección por tripanosomas de los triatomínos hallados.

Hipótesis de trabajo:

Dado que la provincia de Corrientes es considerada endémica para la enfermedad de Chagas, con prevalencias en humanos considerables (Bar y col., 1996; Bar y col., 2005; Bar y col., 2010; Danesi y col., 2019), y que en el ambiente silvestre los estudios de seroprevalencia en mamíferos son escasos o nulos, nos planteamos las siguientes hipótesis: 1) Los monos aulladores en vida libre del noreste argentino albergan a *T. cruzi*, incluso en zonas donde la transmisión vectorial en humanos ha sido interrumpida. 2) En los bosques del noreste de la Argentina la presencia conjunta de monos aulladores infectados y triatomínos hematófagos posibilita la permanencia del ciclo de transmisión silvestre de *T. cruzi* en la región.

2.2- Metodología

2.2.1- Descripción de los sitios de estudio.

El estudio se llevó a cabo en dos localidades del noreste de Argentina: Isla del Cerrito en la provincia de Chaco, y San Cayetano en la provincia de Corrientes. Ambas localidades se encuentran inmersas en un ambiente rural, rodeadas de ríos, lagunas, y fragmentos de bosque habitados por *A. caraya*. Entre ambas localidades, se definieron cuatro sitios de estudio con diferente grado de urbanización y por lo tanto de contacto de los monos que allí habitan con el ambiente antrópico: Isla del Cerrito (**IC**) ($27^{\circ} 18' S - 58^{\circ} 37' O$) y San Cayetano (**SC**) ($27^{\circ} 34' S, 58^{\circ} 42' O$) como ambiente “**rururbano**”, Isla Brasilera (**IB**) ($27^{\circ} 20' S - 58^{\circ} 40' O$) como ambiente “**remoto**”, y Parque Provincial San Cayetano (**PPSC**) ($27^{\circ} 30' S, 58^{\circ} 41' O$) como ambiente “**rural**” (Figura 2.5).

La localidad de **IC** se encuentra en el noreste de la provincia de Chaco en la confluencia del río Paraná y el río Paraguay (Figura 2.5), siendo uno de los principales puntos turísticos de la provincia. Según los datos registrados hasta el momento, Isla del Cerrito cuenta con 1.758 habitantes (INDEC, 2010). El clima es subtropical templado, con una media anual de entre 1.000 y 1.200 mm de precipitaciones y $22^{\circ}C$ de temperatura, propios del Chaco Oriental. Existen pobladores dispersos en diversos puntos de la isla, pero la gran mayoría se concentra en el único centro urbano de la misma. El municipio se extiende por toda la isla y abarca también las islas Guáscara, Brasilera y Bosnia sobre el río Paraná, y las islas Mborebí y Carpincho sobre el riacho Ancho. Dos grupos de aulladores habitan en el casco urbano de esta localidad y circulan frecuentemente por árboles de los patios o predios de las viviendas de IC (Kowalewski & Garber, 2010).

La **IB** se encuentra a 1,5 km del casco urbano de IC, y a 20 km al norte del PPSC. La isla tiene un área de 292 ha sin asentamientos humanos permanentes, aunque ocasionalmente es visitada por pescadores artesanales o turistas que acampan en la zona de la costa. La isla forma parte del municipio de IC y del grupo de islas del río Paraná. Según Cabrera (1976), la isla pertenece a la provincia fitogeográfica Paranaense, siendo parte de las selvas marginales que se extienden formando angostas galerías a lo largo de los ríos Paraná y Uruguay. Para los trabajos de primatología (Rumiz y col., 1986; Brown y Zunino, 1994; Zunino, 1996; Bravo, 2003) las islas del río Paraná representan un ambiente distingible de las selvas que se encuentran en tierra firme, refiriéndose a ellas

como "selva de inundación". El clima de la IB es subtropical templado con una temperatura anual promedio de 21,6 °C y un promedio anual de lluvias de 1200 mm. El 54% de la superficie de la isla está cubierta por bosques inundables continuos y el 46% restante por lagunas y pastizales (Bravo, 2003). La superficie cubierta por bosques se divide en dos tipos de comunidades, bosque alto localizado principalmente en el centro de la isla, y bosque bajo localizado en las áreas marginales de la isla. Ambos tipos de bosque son habitados por *A. caraya*. Entre 32 y 35 grupos de monos viven en la isla (Kowalewski & Garber, 2010); y la densidad ecológica de monos es de al menos tres individuos por hectárea (Kowalewski & Zunino, 2004; Kowalewski y col., 2019).

La localidad de **SC**, a 18 km de la ciudad de Corrientes, se encuentra sobre el río Riachuelo, el cual desemboca en el río Paraná (Figura 2.5). La temperatura anual promedio es de 21,7 °C y un promedio de lluvias anual de 1230 mm. Los alrededores del casco urbano de SC, están compuestos por un ambiente de pastizales, selva en galería, y fragmentos de bosque semideciduo degradado, los cuales fueron y continúan siendo modificados por la deforestación, los incendios, la extracción de madera, y la presencia de ganado (Zunino y col., 2007; Zunino & Kowalewski, 2008). Estos bosques constituyen el hábitat de monos aulladores negros y dorados. Entre 7 y 8 grupos de estos monos habitan próximos a viviendas del pueblo de San Cayetano en árboles que se encuentran contiguos con árboles de los fragmentos de bosque vecinos (Kowalewski & Garber, 2010).

A 3 km del casco urbano de SC, se encuentra el **PPSC**, donde se ubica la Estación Biológica Corrientes (EBCo) (Figura 2.5). En el PPSC y sus alrededores se registraron unos 34 grupos de monos aulladores (Zunino y col., 2007), que junto con humanos y animales domésticos comparten estas áreas con características rurales y que aún conservan características del ambiente silvestre que allí existía. La densidad ecológica reportada de monos aulladores en el PPSC es de aproximadamente un individuo por hectárea (Zunino y col., 2007).

La categorización de los grupos respecto al paisaje se realizó teniendo en cuenta su cercanía al casco urbano de SC e IC. Si se encuentran inmersos o lindan con el casco urbano, se los incluyó en la categoría "Rururbano", a los grupos ubicados en el PPSC y sus alrededores se los incluyó en la categoría "Rural", y los grupos que habitan en la IB se los incluyó en la categoría "Remoto".

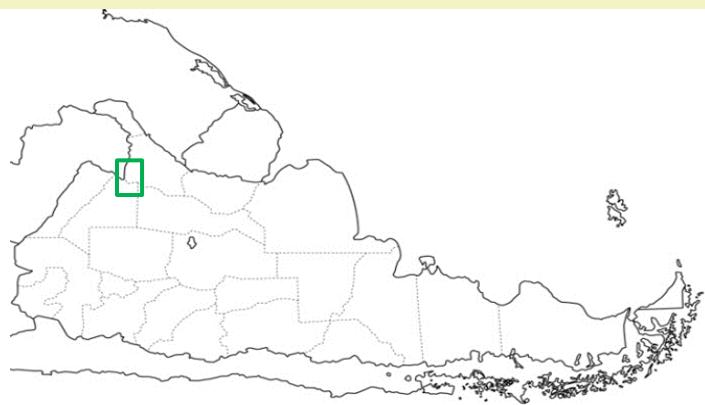
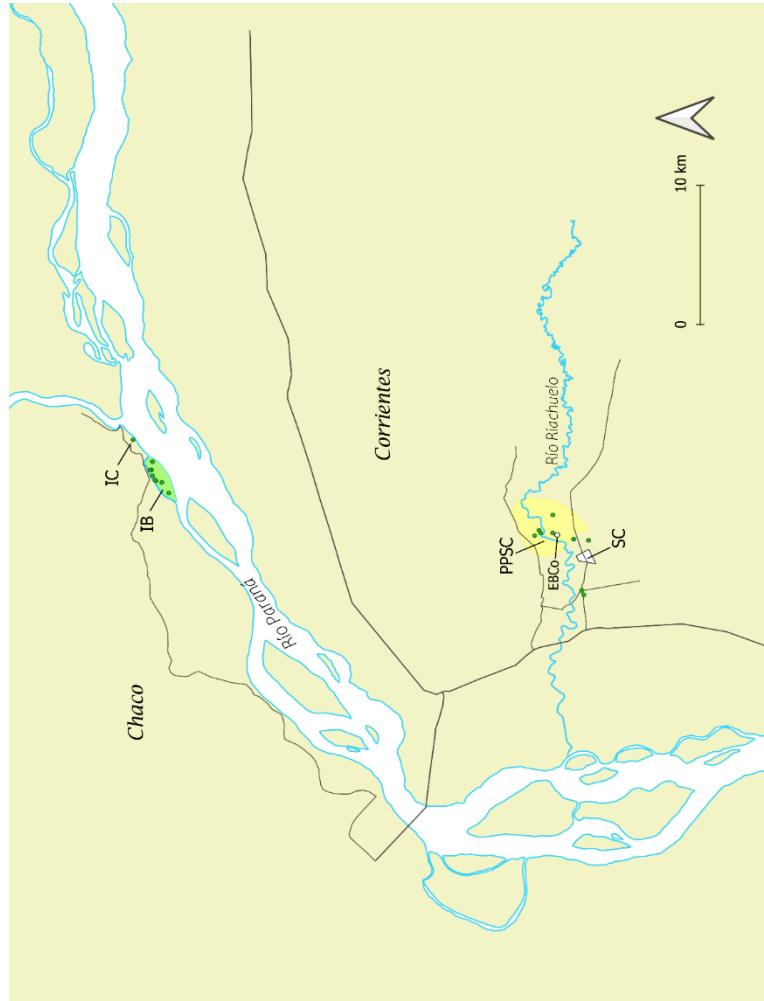


Figura 2.5 – Ubicación de las áreas de estudio: Isla del Cerrito (IC), Isla Brasilera (IB), San Cayetano (SC), y Parque Provincial San Cayetano (PPSC). Puntos verdes: grupos de monos aulladores estudiados.

2.2.2- Identificación y localización de los grupos de monos.

En la IB y el PPSC se llevan a cabo investigaciones de largo plazo en ecología y comportamiento de primates no humanos desde la década del 80 (Zunino y Rumiz, 1986; Zunino y Kowalewski, 2008; Kowalewski y col., 2019), lo que nos permitió la localización e identificación de los grupos de aulladores y su área de acción aproximada. Los *A. caraya* son primates sociales de hábitos arbóreos que durante la noche se agrupan de forma cohesiva en los árboles dormideros. Dentro del área de cada grupo localizamos árboles que por su forma y tamaño podrían ser seleccionados por los monos para dormir. Según algunos estudios, esta selección está asociada a reducir el riesgo de depredación y a aumentar los beneficios de la vida social al facilitar el agrupamiento nocturno (Kowalewski y Zunino, 2005; Brividoro y col., 2019). De los posibles árboles dormideros para cada grupo seleccionamos uno, el cual fue el punto de coordenadas geográfico para la ubicación espacial de cada grupo de monos estudiado. A estos árboles los llamaremos de aquí en más “árbol dormidero” (AD).

2.2.3- Colecta de muestras para el diagnóstico de tripanosomátidos en los monos.

La obtención de las muestras requirió la captura y posterior liberación de los animales. Las actividades de campo y tareas de logística necesarias las realizamos en el marco del proyecto “Actividad del virus de la fiebre amarilla y otros arbovirus de importancia sanitaria en primates no humanos, roedores y mosquitos en el noreste de Argentina”, el cual se planteó en paralelo a este proyecto, en colaboración con un grupo de trabajo del Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas “Dr. Julio I. Maiztegui”. Teniendo en cuenta la complejidad de la logística que estos procedimientos implican, tanto de recursos humanos como económicos, además del posible impacto que dichas actividades pueden causar en la población de monos aulladores estudiada, procuramos sumar recursos y capacidades trabajando además en colaboración con otros grupos de investigación interesados en muestras biológicas con procedimientos de colecta de complejidad similar. De esta manera, se buscó aprovechar el material biológico y disminuir el impacto en la población de aulladores por capturas sucesivas.

- Captura de los animales:

El sitio base para el procesamiento de la colecta de muestras de cada día de muestreo, se instaló de acuerdo con la localización de los grupos de aulladores, teniendo en cuenta la cercanía de los grupos objetivo para ese momento. Una vez terminado el muestreo de esos grupos se procedió a instalar una nueva base de trabajo en otro punto asociado a otros grupos, y así sucesivamente avanzando con la captura de los distintos grupos (Figura 2.6).

Para todo el procedimiento de captura y toma de muestras se contó con el apoyo continuo de al menos dos veterinarios. Los animales se capturaron e inmovilizaron con dardos anestésicos (tipo P Pneu-dart de 1 cc) mediante el uso de un rifle de aire comprimido (Figura 2.7). La vía de administración de la anestesia fue la intramuscular, con dardos anestésicos en primera instancia, y luego con jeringas en los casos que fue necesario suministrar una dosis extra. Las drogas anestésicas utilizadas fueron clorhidrato de xilazina (Xilacina 20®, Richmond Vet Pharma, Buenos Aires, Argentina) (20 mg/ml; 1,3-3,5mg/kg), combinado con midazolam (Midazolam®, Richmond Vet Pharma) (5 mg/ml; 0,5mg/kg), y ketamina (5,5-18mg/kg) (Ketonal 100®, Richmond Vet Pharma) (100 mg/ml), a la mínima dosis apropiada para esta especie y según el peso de cada animal en particular (Kreeger y col., 2023). Dado que, al momento de la administración de la anestesia con los dardos, no contamos con el dato del peso exacto del animal, se utilizó la dosis mínima apropiada para la especie y el peso aproximado según el grupo etario al que correspondía el animal a capturar (juvenil, subadulto o adulto), y en los casos que fue necesario se aplicó posteriormente una dosis extra durante los procedimientos de toma de muestras biológicas.

En el Anexo 2 se encuentran adjuntas las planillas de datos utilizadas durante la captura de los animales: ficha de contención química, medidas morfométricas, y ficha de identificación del individuo.



Figura 2.6. Base de procesamiento para la colecta de muestras biológicas de los monos aulladores. A) Caminata en la IB hasta el sitio donde se armará la base de procesamiento para ese día de muestreo; a la isla accedíamos con una pequeña embarcación. B) Base de procesamiento de un día en el PPSC, donde teníamos la posibilidad de acceder con vehículo a los sitios.

Los individuos fueron clasificados en categorías de sexo (macho o hembra) y edad (adulto, subadulto, juvenil, o infante) de acuerdo con la clasificación propuesta por Rumiz (1990) con modificaciones realizadas por Kowalewski (2007) a partir de características morfológicas y comportamentales: 1) infantes (0 a 1 año); 2) juveniles (cuando comienza a disminuir el cuidado maternal, de 1 a 3 años en las hembras y de 1 a 4 años en los machos); 3) subadultos (desde los 3 hasta 4-5 años en las hembras y desde los 4 hasta los 5 en los machos); 4) adultos (hembras a partir del primer parto, alrededor de los 4-5 años, y los machos a partir de los 5 años de edad).

Al momento de la captura se priorizó a los animales adultos y subadultos, y en última instancia a juveniles avanzados. Asimismo, se tuvo en cuenta que las hembras no estuvieran preñadas, y que tanto hembras como machos no estén transportando una cría.

Los animales fueron capturados aproximadamente entre las 10:00 y 12:00 hs y entre las 14:00 y 16:00 hs. En esta franja horaria los monos aulladores están más activos, se encuentran a alturas relativamente bajas en el dosel, y la temperatura ambiental es más cálida. Al recibir el impacto del dardo los animales se encuentran en el dosel del árbol, por lo que se procuró estar preparados para amortiguar su caída con redes confeccionadas para este fin evitando golpes o lesiones durante la caída (Figura 2.7). Asimismo, teniendo en cuenta las bajas temperaturas invernales, y que un animal bajo anestesia experimenta una disminución en la temperatura corporal, pudiendo desencadenar otros efectos

fisiológicos adversos (Kreeger y col., 2023; Fowler, 2008), se mantuvo a los animales con calor, utilizando mantas y bolsas de agua caliente, y ambientando el espacio con una fogata controlada en el área de procesamiento (Figura 2.7).

A cada animal se lo pesó, se le realizó una marca mediante el uso de caravanas para su reconocimiento en caso de ser necesaria su recaptura, y se examinó su estado de salud general, monitoreando su estado constantemente hasta el momento de su liberación (Figura 2.7).

En los alrededores de SC y en el PPSC (ambiente “rururbano” y “rural”, respectivamente), las capturas se llevaron a cabo durante el mes de julio de 2010, y en IB (ambiente “remoto”) e IC (ambiente “rururbano”) la captura se realizó durante el mes de agosto de 2010.



Figura 2.7- A) Dardos anestésicos tipo P Pneu-dart de 1 cc.; B) disparo y descarga de los dardos anestésicos mediante el uso de rifle de aire comprimido; C) utilización de redes para amortiguar la caída de los animales luego de ser anestesiados; D) monitoreo de un individuo bajo el efecto de la anestesia utilizando bolsas de agua caliente y abrigos; E) mantención de temperatura y recuperación de la anestesia; F) individuo liberado en su lugar de captura, post recuperación de la anestesia.

- Colecta de muestras biológicas para el diagnóstico de tripanosomas:

A cada animal se le tomaron tres tipos de muestras: 1) Muestra de sangre: se le extrajo aproximadamente 1,5 ml de sangre de la vena femoral que fue conservada en EDTA 0,5M (1:1) conservada en frío en campo, y luego en freezer a -20°C hasta su posterior diagnóstico por técnicas de biología molecular; 2) una muestra de xenodiagnóstico, cuyo procedimiento describiré más adelante; y 3) se extrajo una pieza de aproximadamente 2

mm por 2 mm de tejido del borde del pabellón auricular externo para el diagnóstico de leishmaniasis (que describiremos en el Capítulo 3).

Para otros estudios de investigación en colaboración se extrajeron las siguientes muestras: suero; ectoparásitos; pelos para estudios genéticos; registro fotográfico de cara y dentadura; e hisopado de mucosa genital.

Al finalizar con la toma de muestras, los animales fueron mantenidos en un lugar adecuado hasta su recuperación de la anestesia, luego fueron liberados en la base del árbol en el que fueron capturados, monitoreando su capacidad para moverse en los árboles el tiempo necesario con el apoyo constante del equipo veterinario. Los procedimientos utilizados para la captura y liberación de los animales han sido utilizados con éxito anteriormente en otras investigaciones (Schmidt y col., 2007; Kowalewski, 2007; Oklander, 2007). Por otro lado, nuestros protocolos de captura fueron aprobados por el Comité de Evaluación Ética de Investigaciones Biomédicas del Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas “Dr. Julio I. Maiztegui” (Anexo 1), y cumplieron con el Código de buenas prácticas para la primatología de campo (*International Primatological Society*), y con las pautas para el tratamiento ético de los primates (protocolo del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, IACUC, protocolo nro. 09267).

2.2.4- Xenodiagnóstico.

Esta metodología requiere al menos de 20 minutos en los que el animal debe permanecer quieto y con temperatura adecuada, por lo que en muchos casos fue necesario aumentar levemente la dosis de anestesia durante el procedimiento para poder llevarlo a cabo. En cada animal se utilizaron 2 pequeñas cajas cilíndricas de madera tapadas con tela voile y una bandita elástica, con 8 ninfas de *Triatoma infestans* de tercer y/o cuarto estadio en su interior (Figura 2.8). Los insectos fueron provistos por el insectario de la Coordinación Nacional de Control de Vectores de Santa María de Punilla, Córdoba. Los mismos estaban libres de infección por *T. cruzi* u otros tripanosomátidos, y mantenidos sin alimentación durante las 3 semanas previas a su utilización. Durante el trabajo de campo las cajas conteniendo las ninfas fueron trasladadas en cajas conservadoras mantenidas a una temperatura aproximada de 25°C. A cada animal se le aplicaron dos cajas con triatomíos en su abdomen durante 20 minutos, de manera que los insectos puedan alimentarse lo suficiente (Cerisola y col., 1974; Schenone, 1999). Las cajas con los triatomíos

alimentados fueron mantenidas en laboratorio a temperatura ambiente estable aproximadamente entre 24-26°C, cuidando que no ocurran cambios abruptos en las condiciones de temperatura y humedad.

La primera parte del diagnóstico de infección se llevó a cabo en el área de entomología del Instituto de Medicina Regional de la UNNE. Las observaciones se realizaron a los 30, y 60 días post-exposición, manteniendo a los insectos en ayuno prolongado.

La muestra para cada individuo fue obtenida por expresión abdominal, agrupando el contenido rectal de 4 vinchucas alimentadas de cada cajita de diagnóstico. Las cuatro alícuotas se colocaron en una gota de solución fisiológica, y se procedió al examen del preparado al microscopio óptico con una ampliación de 400x.



Figura 2.8. Imágenes del procedimiento del diagnóstico de tripanosomas por el método del xenodiagnóstico. A) Exposición de los triatominos a alimentarse de una mona adulta *A. caraya*. B) Cajas cilíndricas de madera tapadas con tela voile y una bandita elástica, con 8 ninfas de tercer o cuarto estadío en su interior listas para ser utilizadas. C) Interior de caja de madera conteniendo las ninfas de *Triatoma infestans* una semana después de la colecta de muestras. D) Ninfas de *T. infestans* alimentadas pertenecientes a una misma caja en el momento previo a ser evaluadas. E) Preparado de pool de heces en una gota de solución fisiológica para ser observado al microscopio óptico.

Por otro lado, con el objetivo de evaluar la calidad del método en los monos aulladores, se evaluó la alimentación y sobrevida de los triatomínos, para lo cual se contabilizaron el número de ninfas vivas por caja y se clasificaron según su estado nutricional cualitativo según Ceballos y col. (2005). Estas observaciones se realizaron a la semana de colectada la muestra, a los 30, y a los 60 días post exposición. Además, se tuvieron en cuenta las variables: peso del mono y temperatura diaria media, para evaluar una posible asociación con la calidad del método.

2.2.5- Caracterización molecular de la infección por *Tripanosoma sp.* en las muestras de sangre

Las muestras de sangre conservadas en solución de EDTA 0,5M, fueron procesadas extrayendo el ADN y aplicando protocolos de PCR específicos para *T. cruzi*. Los fragmentos de ADN compatibles con *T. cruzi* fueron secuenciados y analizados para la confirmación de los resultados.

- Extracción de ADN: La extracción de ADN se realizó a partir de 200 µl de muestra (sangre + EDTA) con columnas de extracción comerciales (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Diagnostic Corp., Indiana, USA), siguiendo las instrucciones sugeridas por el fabricante. Previo a la extracción, a cada muestra se le adhirió 200 pg de plásmido linearizado p-ZErO, para ser utilizado como un control interno de amplificación (IAC), el mismo contiene una secuencia de *Arabidopsis thaliana*, una acuaporina específica del polen que no tiene semejanza con ninguna proteína de mamíferos, insectos o tripanosomatídos (Soto y col., 2008; Duffy y col., 2009). Este plásmido es amplificado en una reacción de qPCR (“quantitative” o “real time”) con una sonda TaqMan®, desarrollada en el laboratorio del INGEBI (Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular), sitio donde llevamos a cabo estos análisis (Duffy y col., 2009; Duffy y col., 2013).

- Reacciones de amplificación por PCR: se utilizaron distintos procedimientos de amplificación para la detección específica de *T. cruzi* que se presentan en la Tabla 2.2. Después de algunos resultados, y dado que estos protocolos no habían sido utilizados con muestras de primates no humanos, se definió el siguiente algoritmo de aplicación de los mismos sobre las muestras (Figura 2.9): en primer lugar, se utilizó la PCR convencional dirigida a amplificar la región variable de 330 pares de bases (pb) del genoma de los

minicírculos del kinetoplasto (ADN-k) de *T. cruzi*, utilizando los oligonucleótidos iniciadores “121” y “122” (Tabla 2.2), y las condiciones de ciclado según Burgos y col. (2007). Esta reacción se aplicó por duplicado a cada muestra. Las muestras que presentaron fragmentos de ADN-k de tamaño compatible con *T. cruzi* (330 pb), se las analizó a continuación con la qPCR de ADN-Sat (Tabla 2.2), utilizando un equipo de PCR en tiempo real Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science, QIAGEN). Esta reacción está dirigida a amplificar un fragmento de 166 pb de secuencias satélite específicas de *T. cruzi*, utilizando los iniciadores “cruzi 1” y “cruzi 2”, y la sonda TaqMan® “cruzi 3” marcada con 5_FAM (6-carboxyfluorescein) y 3_MGB (*minor groove binder*), siguiendo las condiciones de ciclado reportadas por Schijman y col. (2011). Esta reacción se aplicó por duplicado a cada muestra, y las muestras positivas a la qPCR ADN-Sat se analizaron a continuación por PCR convencional con los mismos iniciadores (“cruzi 1” y “cruzi 2”), y los fragmentos obtenidos fueron secuenciados (Figura 2.9). En paralelo las muestras fueron analizadas por una PCR convencional dirigida al dominio D7 del gen de ADN ribosomal (ADN-Rib) 24S α de tripanosomátidos, el cual presenta dimorfismo en la secuencia entre tripanosomátidos, incluso entre los linajes de *T. cruzi*, por lo que es utilizado como blanco para la detección diferencial entre tripanosomátidos (Souto y col., 1999). Esta reacción utiliza los oligonucleótidos “D75” y “D76” y aplicamos las condiciones de ciclado según Schijman y col. (2006) (Tabla 2.2). En principio este protocolo estaba destinado a la caracterización molecular diferencial de tripanosomátidos en las muestras positivas a la PCR ADN-k, sin embargo, los resultados obtenidos luego de aplicar este procedimiento redireccionaron los objetivos, y se continuó aplicando a todas las muestras para la detección de *T. minasense*, una especie de tripanosoma que no esperábamos hallar (ver en sección de resultados) (Figura 2.9).

La reacción para el control interno (ADN-IAC) ha sido utilizada en su protocolo simple de qPCR (Duffy y col. 2009), y en su protocolo multiplex, en el que se cuantifica tanto el ADN del IAC como el de *T. cruzi* en una misma reacción (Duffy y col. 2013).

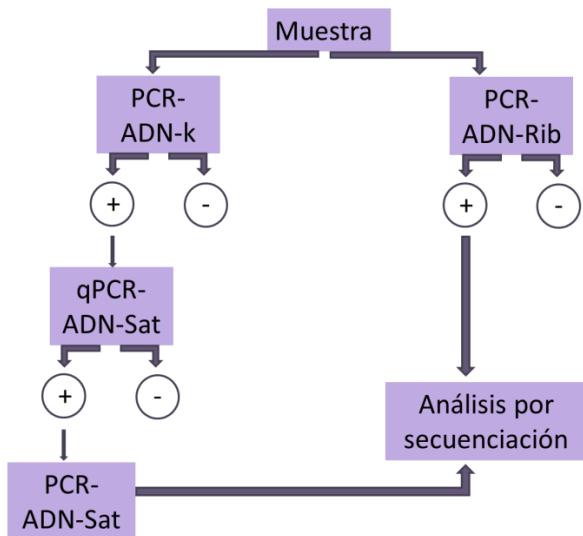


Figura 2.9: Algoritmo utilizado para el diagnóstico y caracterización de *Tripanosoma sp.*

Cada reacción de PCR incluyó una reacción de amplificación sin ADN como control negativo, y una reacción de amplificación con el ADN total de una cepa de referencia de *T. cruzi* (*T. cruzi* VI CL-Brener), y/o de una cepa de *T. rangeli* proveniente de Brasil (Cuba Cuba, comunicación personal; Gurgel-Gonçalves y col., 2012), como controles positivos. Los fragmentos amplificados por ensayos de PCR convencional fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa 2% con BrEt, a partir de una alícuota de 10 µl del producto de reacción. Se utilizó un marcador de peso molecular (1 Kb), y los fragmentos de ADN se visualizaron en un transiluminador de emisión UV.

Protocolo	ADN blanco	Tipo de PCR	Oligonucleótidos		Especie y/o genotipo	Amplicón (pb)	Referencia
			Nombre	Secuencia (5'-3')			
ADN-k	Minicírculos del kinetoplasto	Convenional	121	AAATAATTACGGG(T/G)GAGATGCATGA	<i>T. cruzi</i>	330	Schijman y col. 2003, Burgos y col. 2007, Botero y col. 2010
			122	GTCGATTGGGGTTGGTAAATA	<i>T. rangeli</i>	330-380	
ADN-Sat	ADN satélite (sonda TaqMan)	Cuantitativa y Convenional	cruz1	A\$TCGGCTGATCGTTTCGAA	<i>T. cruzi</i>	166	Piron y col. 2007, Schijman y col. 2011, Duffy y col. 2013
			cruz2	AATTCCCAAGCAGCGGGATA			
ADN-Rib	ADN ribosomal	Convenional	cruz3	Fam-CACACACTGGACACCAA-NFQ-MGB	<i>T. cruzi</i> <i>T. rangeli</i> <i>T. minasense</i>	270	Souto y col. 1999, Schijman y col. 2006, Burgos y col. 2007, Martinez y col. 2016
			D75	GCAGATCTTGTTGGCGTAG			
ADN-IAC	plásmido control interno	Convenional	D76	GGTTCTCTGTGCCCTTT	IAC	181	Duffy y col. 2009, Duffy y col. 2013
			Cuantitativa (sonda TaqMan)	IAC Fw ACCGTCATGGAACAGCACGTA IAC Rv CTCCGCAACAAACCTATAAAAT IAC Tq VIC-AGCATCTGTTCTTGAAGGT-NFQ-MGB			

Tabla 2.2. Resumen de los protocolos de PCR utilizados para la detección molecular de tripanosomas.

- Análisis por secuenciación: Los fragmentos de ADN obtenidos de las reacciones ADN-Sat y ADN-Rib fueron analizados por análisis de secuenciación, según las instrucciones del sitio de procesamiento. El análisis de las secuencias de ADN satélite obtenidas permitió la caracterización de las UDTs de *T. cruzi*, pudiendo distinguir entre las UDTs I, III, IV y el grupo II, V y VI, entre los cuales no es posible diferenciar con este marcador molecular. Para esto los productos de PCR a analizar fueron purificados utilizando las columnas comerciales del *QIA quick® PCR Purification Kit* (QIAGEN) siguiendo las indicaciones del fabricante para la purificación. En los casos en los que se obtuvieron fragmentos inespecíficos, los fragmentos de interés fueron separados cortando el gel bajo visualización con luz UV, y cada fragmento inmerso en agarosa fue purificado utilizando las columnas comerciales del *QIA quick® Gel Extraction Kit* (QIAGEN) siguiendo las indicaciones del fabricante.

La secuenciación se realizó en forma bidireccional sobre ambas hebras de ADN, utilizando cada oligonucleótido cebador de la reacción de PCR en cuestión. Se utilizó el servicio de secuenciación brindado por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA, Hurlingham, Buenos Aires).

Los electroferogramas de las secuencias obtenidas se analizaron utilizando el programa CodonCode Aligner © versión 8.0.2 y el programa BioEdit Sequence Alignment Editor © versión 7.2.6 (Hall, 1999). Para el alineamiento de las secuencias se utilizó el algoritmo ClustalW (Thompson y col., 1994) del programa MEGA 10.0.5 (Kumar y col., 2018) y del programa BioEdit. Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias disponibles en la base de datos *GenBank* utilizando el análisis con el programa "BLAST" del sitio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

2.2.6- Insectos vectores de *Trypanosoma* en árboles dormideros de *Alouatta caraya*

Con el objetivo de evaluar la presencia de triatominos silvestres asociados a los monos aulladores, se realizaron muestreos utilizando trampas con cebo vivo tipo *Noireau* (Noireau y col. 1999, Noireau y col. 2002), y también mediante la disección de nidos de aves deshabitados.

- Muestreo con trampas adhesivas con cebo vivo:

Las trampas tipo *Noireau* son trampas adhesivas con cebo vivo que fueron modificándose para que su uso fuera exitoso en la captura de triatominos en el ambiente silvestre (Noireau y col., 1999). Este sistema de captura ha sido puesto a prueba exitosamente en varios tipos de ecosistemas (Chaco, Caatinga, Cuenca del Amazonas, y bosques húmedos subtropicales) y en distintos tipos de micro-hábitats (huecos de árboles, copas de palmeras, entre rocas y rajaduras en riscos) (Noireau y col., 1999; 2000; 2002; Ceballos y col., 2009; Ceballos, 2010). La efectividad de estas trampas evita una meticulosa disección del hábitat para la captura de triatominos, lo cual a veces es muy difícil y destructivo.

La trampa consistió de un pequeño frasco de plástico de 500 cm³ con una tapa a rosca con una abertura cubierta con una malla de alambre galvanizado de cuadrícula de 1 mm (malla mosquitera) que permite el intercambio gaseoso con el exterior, el borde de la tapa se cubrió parcialmente con una cinta adhesiva doble faz de 5 cm de espesor (Dancan®, Argentina) (Figura 2.10). La superficie del frasco se lijó suavemente para que su superficie sea rugosa y los triatominos puedan trepar por ella hasta la cinta adhesiva donde quedarían pegados. En la base del frasco se realizó un pequeño orificio para drenaje en caso de entrada de agua por lluvia. En el interior se colocó un ratón de laboratorio como fuente de atractantes (lores, CO₂ y calor) junto con una pequeña cantidad de viruta de madera como “cama”, y comida que constó de un pellet de alimento balanceado y un trozo de manzana como fuente de agua y azúcares. Cuando la trampa fue colocada en forma colgante (como ocurre en huecos profundos) se le agregó un hilo que sirve para sostenerla a la altura adecuada (Figura 2.10). Se contó con dos grupos de ratones de manera que podíamos alternarlos para que no estén dos noches seguidas en las trampas. Los ratones fueron provistos por el bioterio del Instituto Nacional de Parasitología, “Dr. Mario Fatala Chaben”, y al finalizar el muestreo fueron destinados al serpentario CEPSAN (Centro Productor de Suero Antiofídico) ubicado en ese momento en la ciudad de Corrientes, para la alimentación de serpientes.



Figura 2.10. Trampas adhesivas con cebo vivo. A) Frascos acondicionados para le estadía de los ratones, con viruta de madera, pellet de alimento balanceado y porción de fruta. B) Montaje de la cinta doble faz e hilo en el borde superior del frasco. C) Traslado de trampas para ser colocadas y activadas en los micrositios previamente seleccionados. D) Jaulas contenedoras de los grupos de ratones utilizados como cebo vivo. E) Trampa activa en el hueco de un árbol. F) Trampa completa al retirarla a la mañana siguiente de una noche de muestreo.

Antes de comenzar con el muestreo pusimos a punto las trampas haciendo una prueba piloto y realizando algunos ajustes: probamos el pegamento de la cinta adhesiva exponiéndolo a vinchucas de laboratorio, y colocamos doble malla mosquitera para que los ratones no se escapen o no sean removidos por otros animales.

Los muestreos se llevaron a cabo durante el mes de marzo de 2012, colocando las trampas en los AD seleccionados de los distintos grupos de monos estudiados (como se mencionó en la sección 2.2.2) abarcando las tres categorías ambientales definidas: “**remoto**”, “**rural**” y “**rururbano**”. Las trampas fueron colocadas en un área aproximada de 1000 m², quedando el AD ubicado aproximadamente en el centro de dicha superficie. En esa área se clasificaron y eligieron los distintos microhábitats (ecotopos) para ubicar las trampas, teniendo en cuenta que el espacio de instalación fuera suficientemente ancho y profundo para poder introducirla, y que tuviera condiciones apropiadas (ambientales y de cobijo) como para ser refugio de algún animal, potencial alimento para los triatominos. En

general fueron huecos en árboles vivos o muertos, refugio de algún animal (cueva) en la base de los árboles, o entre acumulaciones de ramas (Figura 2.11).

Las trampas se colocaron durante una noche en cada AD, se instalaron aproximadamente entre las 17 y las 19hs y fueron retiradas a primera hora del día siguiente. En todo momento procuramos mantener a los ratones en las mejores condiciones posibles (Figura 2.10). Durante la colocación de las trampas se utilizó una planilla de registro de datos ambientales que se encuentra adjunta en el Anexo 3.



Figura 2.11. Ejemplos de microhábitats hallados en los distintos sitios. A) Trampa colgada en el hueco de un árbol procurando que el frasco toque las paredes. B) Trampa apoyada en hueco de árbol muerto. C) Trampa en hueco en base de un árbol, que podría servir de refugio de algún animal. D) Trampa sostenida por una rama entre las grietas de un ficus. E) Trampa en hueco en base de un árbol. F) Trampa en un hueco de un árbol en altura. En todos los casos se tuvo en cuenta que alguna sección del frasco toque las paredes del microhábitat, de manera de facilitar el acceso de los insectos.

- Capturas por disección de nidos de aves:

La selección de nidos de aves para su disección estuvo sujeta a su localización (cercana a algún AD), a que el nido se encuentre deshabitado en el momento de su colecta, y a la posibilidad de acceso a los mismos (acceso con escalera). Cada nido colectado fue colocado en una bolsa o tela contenedora para ser trasladado al lugar donde iba a ser disectado (Figura 2.12). Cada nido fue exhaustivamente examinado, los triatominos

capturados fueron conservados en recipientes acondicionados con papel plegado en su interior y fueron llevados al laboratorio para su identificación y procesamiento. Los insectos colectados se identificaron por especie y estadio siguiendo las claves de Lent y Wygodzinsky (1979), y fueron examinados para infección por tripanosomas observando su contenido rectal al microscopio óptico (MO) con una ampliación de 400x.



Figura 2.12 – Colecta de nidos de aves deshabitados. A) Nido colgante característico de aves de la familia Furnariidae. B) Colecta de nido colgante. C) Disección del nido examinando la presencia de triatominos.

2.2.7- Análisis de datos

A partir de los procedimientos de diagnóstico por PCR se estimó la prevalencia de infección con intervalos de confianza del 95 % (IC) para cada protocolo. A partir de estas estimaciones se analizó la asociación entre las prevalencias de infección y las variables de sexo, grupo etario y grado de antropización del ambiente mediante la prueba de independencia de Chi Cuadrado (χ^2), asumiendo como significativo un *p*-valor menor a 0,05.

Los datos fueron analizados utilizando los programas Quantitative Parasitology (QP3.0) (Rozsa y col., 2000) e InfoStat 2014 (Di Rienzo y col., 2014).

2.3- Resultados

2.3.1- Captura de los monos aulladores.

Se capturaron un total de 109 animales durante los meses de julio y agosto del 2010. Durante ocho días corridos en SC y en el PPSC (del 12 al 20 de julio de 2010, con un día de lluvia en el medio); y durante siete días corridos en IC e IB (del 9 al 15 de agosto). En IC se capturaron 2 animales pertenecientes a un grupo de monos, en IB 49 monos de 15 grupos, en SC 19 animales de 6 grupos, y en el PPSC 39 monos aulladores pertenecientes a 10 grupos de monos. En el mapa de la Figura 2.13 se puede observar la ubicación de los grupos que fueron muestreados y en la Tabla 2.3 los datos de los animales de cada grupo muestreado.

Se capturaron significativamente más machos que hembras ($X^2_{(0,05; 1)} = 4,85$, $p\text{-valor} = 0,028$), y más animales del grupo etario “adulto” ($X^2_{(0,05; 1)} = 21,71$, $p\text{-valor} < 0,0001$), como se esperaba dada la preferencia planeada al momento de la captura. En la Figura 2.14 se muestran los valores del peso de los individuos capturados según el sexo y el grupo etario. Durante los días de captura en San Cayetano y EBCo, la temperatura mínima media fue de 4,5°C, la temperatura media 8,7 °C, y la temperatura máxima media 15,3°C; y durante los días de trabajo en la Isla Brasilera y la Isla del Cerrito la temperatura mínima media fue de 6,1°C, la temperatura media 12,4°C, y la temperatura máxima media 19,9°C.

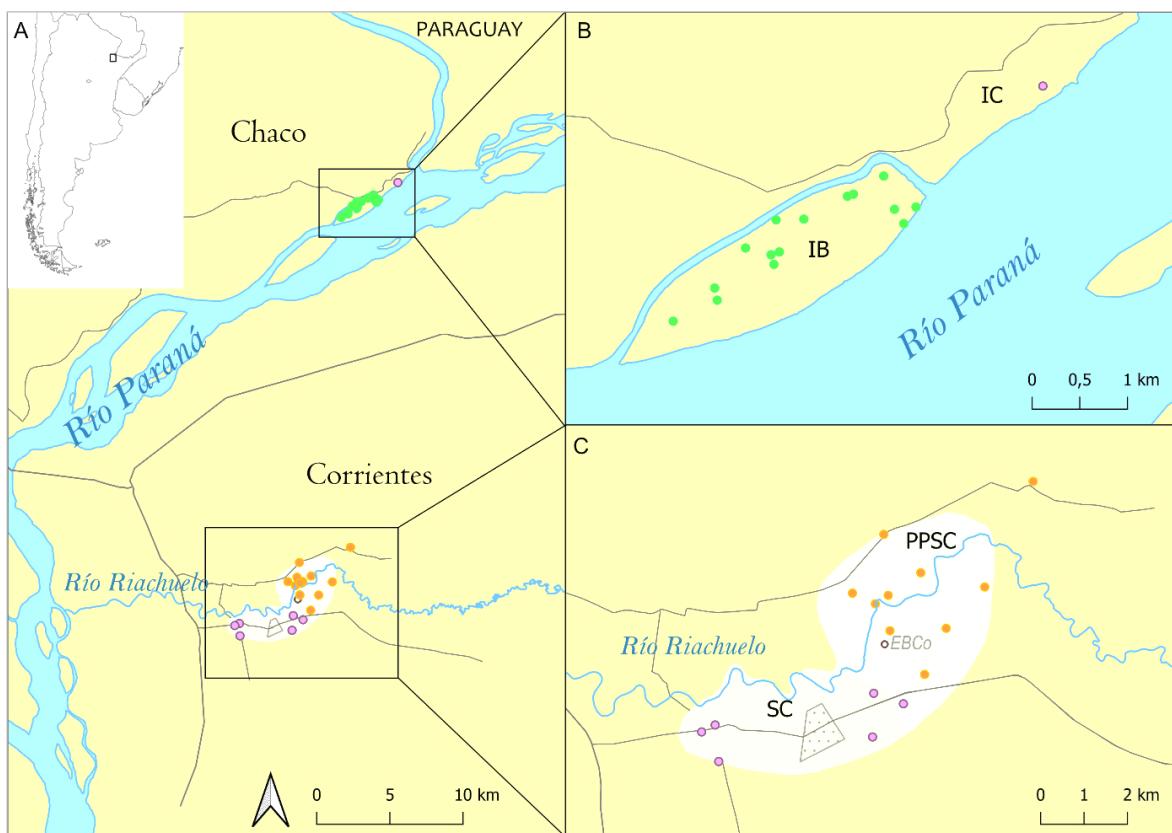


Figura 2.13 - A) Ubicación de los sitios de estudio y de los grupos de monos muestreados. B) Ubicación espacial de los grupos en la Isla Brasilera (IB)/ambiente remoto (puntos verdes) e Isla del Cerrito (IC)/rururbano (puntos violetas). C) Ubicación espacial de los AD de los grupos estudiados en San Cayetano (SC)/rururbano (puntos violetas) y en el Parque Provincial San Cayetano (PPSC)/rural (puntos naranjas).

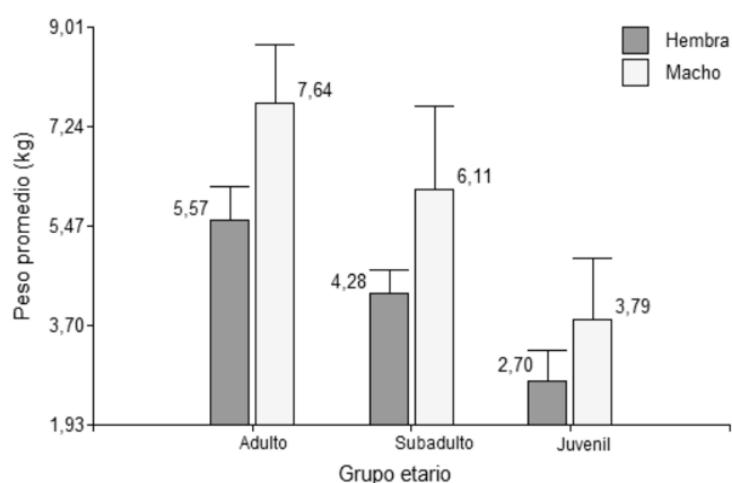


Figura 2.14. Gráfico de barras donde se observa el peso promedio de los animales capturados, representados por sexo y grupo etario. Las barras de error corresponden al desvío estándar.

Fecha de muestreo	Grupo	Sitio	Nro. individuos muestreados	Razón de sexos (macho/hembra)	Nro. de individuos por categoría de edad		
					adulto	subadulto	juvenil
15/8/2010	Sechep	IC	2	1	2	0	0
9/8/2010	Huerta isla	IB	5	4	1	3	1
10/8/2010	Enfermitos	IB	2	1	1	1	0
10/8/2010	Orejones	IB	2	1	2	0	0
10/8/2010	Gringos	IB	3	2	1	1	1
11/8/2010	Xeneises	IB	7	6	5	0	2
11/8/2010	Gritones	IB	2	2	0	0	2
11/8/2010	Marley	IB	2	2	1	0	1
12/8/2010	Casa Quebracho	IB	5	2	1	4	0
12/8/2010	Maminos	IB	3	0,5	2	0	1
13/8/2010	Escuela	IB	6	2	5	1	0
13/8/2010	Banara Grande	IB	3	0,5	3	0	0
13/8/2010	X7	IB	3	0,5	3	0	0
14/8/2010	10 Mangos	IB	2	1	2	0	0
14/8/2010	Punta Norte	IB	2	1	2	0	0
14/8/2010	Sambón	IB	2	1	1	0	1
12/7/2010	Inchi Norte	SC	5	1,5	3	2	0
12/7/2010	Gómez	SC	3	2	2	1	0
16/7/2010	Musculoso	SC	4	3	2	1	1
16/7/2010	Otero	SC	2	1	2	0	0
17/7/2010	Bety	SC	3	0,5	3	0	0
20/7/2010	Médico	SC	2	2	1	1	0
13/7/2010	Corral Viejo	PPSC	3	2	0	1	2
13/7/2010	Hembra Negra	PPSC	5	0,67	1	4	0
14/7/2010	Tacuaral	PPSC	2	1	2	0	0
14/7/2010	Alicia	PPSC	4	3	1	0	3
15/7/2010	Quitilina	PPSC	7	2,5	2	2	3
15/7/2010	Azula	PPSC	5	1,5	3	1	1
17/7/2010	Chupali	PPSC	2	2	1	1	0
19/7/2010	Zacarías	PPSC	2	1	2	0	0
19/7/2010	Media Luna 1	PPSC	2	2	1	0	1
20/7/2010	Huerta	PPSC	7	0,4	1	4	2

Tabla 2.3. Datos de los grupos de *Alouatta caraya* muestreados en los distintos sitios de estudio.

2.3.2- Caracterización molecular de la infección por *Trypanosoma* en *Alouatta caraya*

En la Tabla 2.4 se muestran los resultados para los distintos protocolos de PCR en cada sitio estudiado, y en la Figura 2.15 la distribución espacial de los grupos y la clasificación de cada grupo dependiendo de los resultados obtenidos a los protocolos de PCR aplicados (algoritmo de diagnóstico en Figura 2.9).

Ambiente - Protocolo PCR	Nro. grupos + / Nro. grupos examinados	Nro. monos + / Nro. monos examinados	Prevalencia (%) [IC 95%]
Rururbano_IC			
ADN-k	1/1	1/2	-
ADN-Rib	1/1	2/2	-
ADN-Sat	0/1	0/1	-
Remoto_IB			
ADN-k	14/15	19/49	38,8 [27 - 55,8]
ADN-Rib	15/15	48/49	98 [89,1 - 99,95]
ADN-Sat	3/14	3/19	6,1 [1,3 - 16,9]*
Rururbano_SC			
ADN-k	5/6	9/19	47,4 [24,4 - 71,1]
ADN-Rib	6/6	18/19	94,7 [74 - 99,9]
ADN-Sat	1/5	1/9	5,3 [0,1 - 26]*
Rural_PPSC			
ADN-k	7/10	19/39	48,7 [32,4 - 65,2]
ADN-Rib	10/10	37/39	94,9 [82,7 - 99,4]
ADN-Sat	3/7	4/19	10,3 [2,9 - 24,2]*
Total			
ADN-k	27/32	48/109	44 [35,6 - 54,3]
ADN-Rib	32/32	105/109	96,3 [90,9 - 99]
ADN-Sat	7/27	8/51	7,3 [2,4 - 12,2]*

* Estimación sobre el total de monos evaluados.

Tabla 2.4. Prevalencias de infección obtenidas a partir de muestras de sangre, con los procedimientos de diagnóstico ADN-k, ADN-Rib y ADN-Sat PCR, en los cuatro ambientes estudiados. Las prevalencias son expresadas como porcentajes, con un intervalo de confianza del 95%.

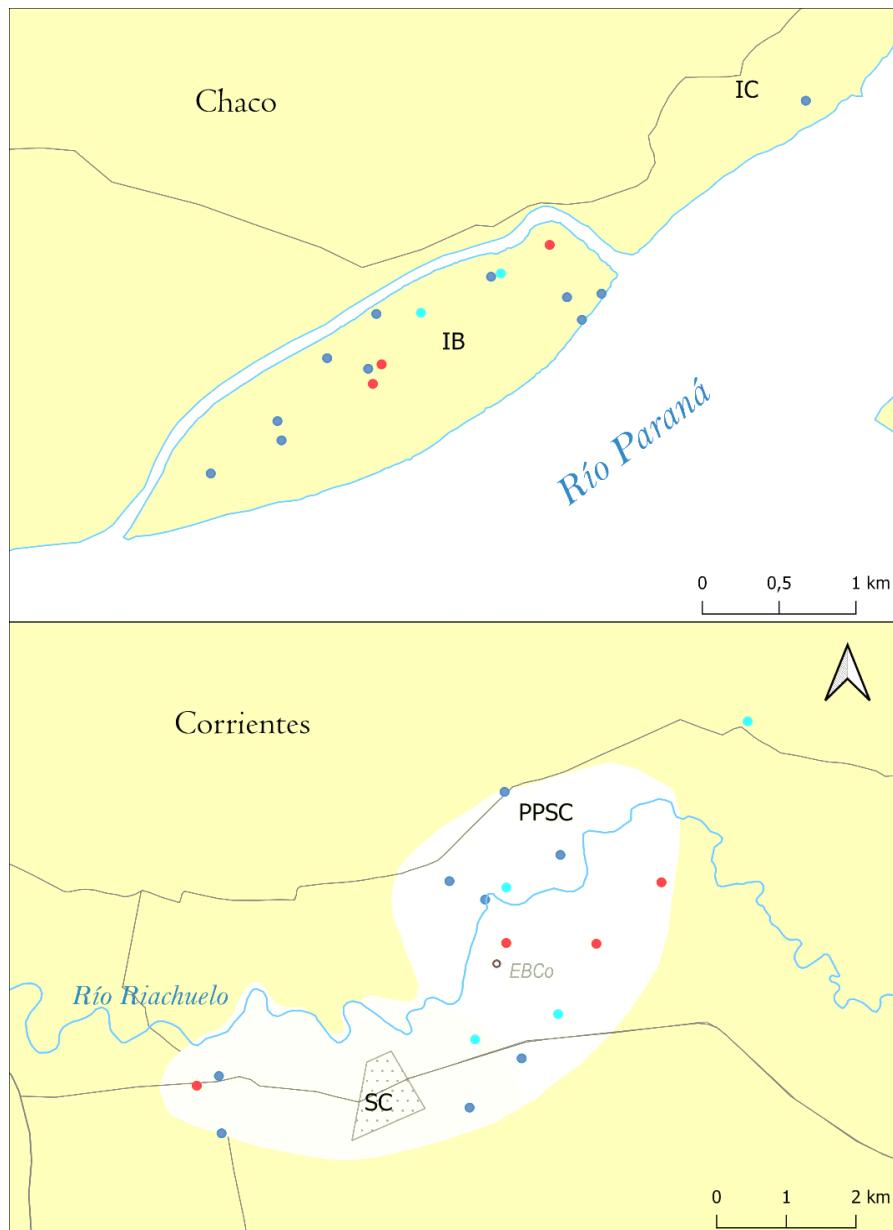


Figura 2.15. Resultados del diagnóstico para los grupos de monos (con al menos un individuo con resultado positivo): solo la PCR ADN-Rib positiva (círculo celeste); resultado de ADN-Rib y ADN-k positivas (círculos azules); resultado de ADN-Rib, ADN-k y ADN-Sat positivas (círculos rojos).

El 44% de las muestras de sangre resultaron positivas a la PCR de ADN-k, con fragmentos de ADN similares al esperado para *T. cruzi* (330 pb) con productos entre 300 y 340 pb aproximadamente (Figura 2.16). Se puede observar que algunas de las muestras, en las que luego se confirmó la infección por *T. cruzi* con la PCR de ADN-Sat, presentaron pequeñas variaciones en el tamaño de los productos de ADN-k (Figura 2.16 A y B). Por otro lado, en la Figura 2.16 B, donde algunos de los productos fueron expuestos a mayor tiempo de corrida durante la electroforesis, se puede observar que algunas muestras

correspondientes al mismo sitio de estudio presentaron fragmentos de ADN de igual tamaño (como en el caso de M9, M27 y M55 que pertenecen a la categoría “rural”). Asimismo, estos resultados también podrían deberse a infecciones causadas por *T. rangeli*, como a infecciones mixtas entre ambos parásitos.

Al analizar la asociación entre la prevalencia de animales positivos a ADN-k y el grado de antropización del ambiente no hallamos relación entre ambas variables ($X^2= 0,62$, gl= 2, *p*-valor= 0,7325).

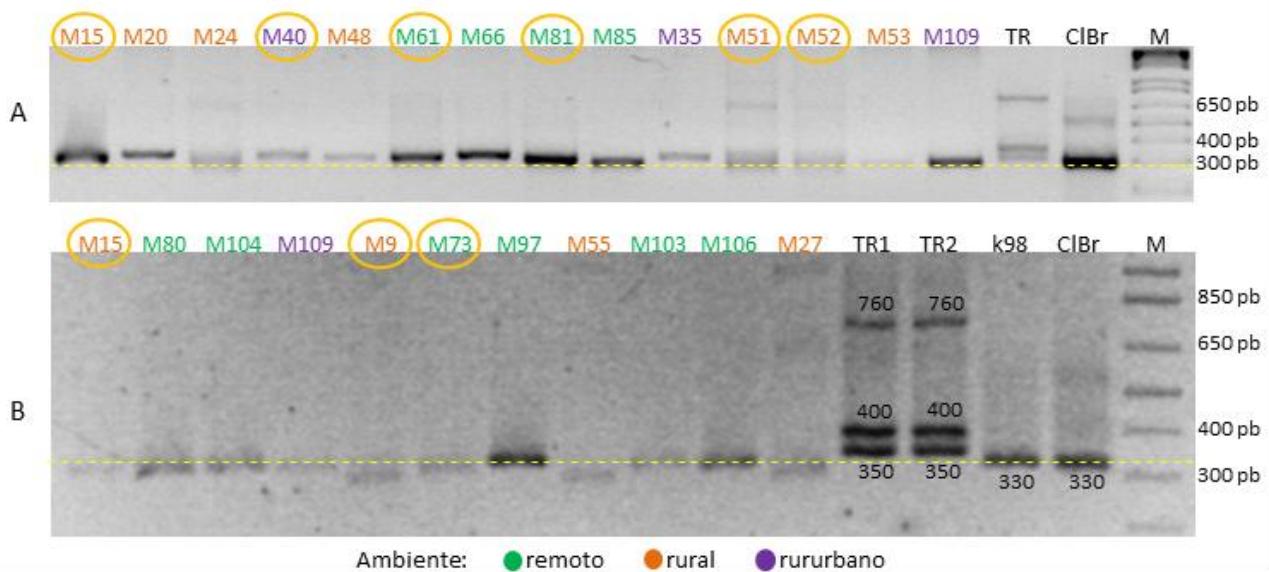


Figura 2.16. A) Gel de agarosa (2%) en el que se observan los productos obtenidos de la PCR ADN-k con los oligonucleótidos iniciadores 121 y 122. B) Gel de agarosa (2%) que corresponde al resultado de exponer los fragmentos de ADN-k a una electroforesis de mayor tiempo de corrida. El tamaño de los fragmentos es indicado a la derecha de las figuras y debajo y arriba de los fragmentos de los controles de referencia. La línea punteada amarilla señala el tamaño del fragmento para la cepa de referencia de *T. cruzi*. Los círculos naranjas señalan las muestras en las que luego se confirmó la presencia de *T. cruzi* por la qPCR ADN-Sat y análisis de secuencias. Los códigos de identificación de las muestras están indicados en la parte superior de la figura. Entre ambos geles se muestra el resultado de 23 muestras positivas. Cepas de referencia utilizadas como controles: TR, TR1 y TR2: *T. rangeli*, k98: *T. cruzi* I, ClBr: *T. cruzi* VI (Cl Brener). M: marcador de peso molecular de ADN 1 kb.

Siguiendo con el algoritmo de diagnóstico, las muestras positivas a la PCR de ADN-k fueron analizadas por el protocolo de ADN-Sat. Ocho muestras (3 de animales del ambiente “remoto”, 4 del ambiente “rural”, y uno del ambiente “rururbano”) de las 49 positivas a ADN-k resultaron positivas al análisis por PCR cuantitativa con sondas TaqMan

ADN-Sat, lo que confirmó la infección por *T. cruzi* en esos individuos (Tabla 2.5). En la Figura 2.16 se pueden observar los fragmentos obtenidos de ADN-k para estas 8 muestras positivas a ADN-Sat (macadas con un círculo naranja). La prueba exacta de Fisher presentó un *p*-valor= 0,7131, indicando que no habría asociación entre el número de muestras positivas a *T. cruzi* y el grado de antropización del ambiente.

Logramos analizar las secuencias de 5 de las 8 muestras positivas, y los resultados confirmaron la presencia de *T. cruzi* en todas ellas (Tabla 2.5). En las 3 muestras que no pudimos secuenciar no fue posible amplificar suficiente cantidad de ADN para ser purificado y secuenciado.

La caracterización molecular de las secuencias se obtuvo mediante el alineamiento con las secuencias homólogas de cepas de referencia representativas de las diferentes UDTs de *T. cruzi* (Figura 2.17). Las secuencias que obtuvimos están disponibles en la base de datos de GenBank bajo los números de acceso: KT369011 a KT369015. Como se puede ver en la Tabla 2.5, cuatro de las muestras analizadas presentan 99 o 100% de identidad con las secuencias reportadas para las UDTs del grupo II, V y VI para este marcador molecular; estas UDTs están asociadas con el ciclo de transmisión doméstico de *T. cruzi*. En cambio, la quinta secuencia (individuo de la IB) (M81), presentó mayor identidad con la UDT I, la cual se relaciona con el ciclo de transmisión silvestre, y con *Didelphis* sp. como el principal hospedador mamífero (Diosque y col., 2003; Yeo y col., 2005; Enriquez y col., 2013).

ID	Ambiente	Nombre del grupo	Sexo-edad	Ct	Especie (% de identidad)	UDT	Nro. de acceso en GenBank
M9	Rural	Corral Viejo	♂ subadulto	34,2	-	-	
M15	Rural	Hembra Negra	♀ adulta	33,16	<i>T. cruzi</i> (99%)	II, V, VI	KT369011
M40	Rururbano	Otero	♂ adulto	34,82	<i>T. cruzi</i> (99%)	II, V, VI	KT369012
M51	Rural	Huerta	♂ adulto	37,86	-	-	
M52	Rural	Huerta	♀ subadulta	37,2	<i>T. cruzi</i> (99%)	II, V, VI	KT369015
M61	Remoto	Huerta Isla	♂ juvenil	36,47	<i>T. cruzi</i> (100%)	II, V, VI	KT369013
M73	Remoto	Xeneizes	♀ adulta	33,84	-	-	
M81	Remoto	Marley	♂ adulto	30,74	<i>T. cruzi</i> (99%)	I	KT369014
Control +	<i>T. cruzi</i> Cl Brener (20fg/μl)			20.66			
Control +	<i>T. cruzi</i> Cl Brener (400fg/μl)			10.62			

Tabla 2.5- Resultados del análisis de qPCR ADN-Sat y de la caracterización molecular por secuenciación. Valores de Ct (ciclo umbral) obtenidos de la PCR en tiempo real y porcentajes de identidad obtenidos del análisis de comparación con las secuencias disponibles en GenBank utilizando el análisis por “BLAST”.

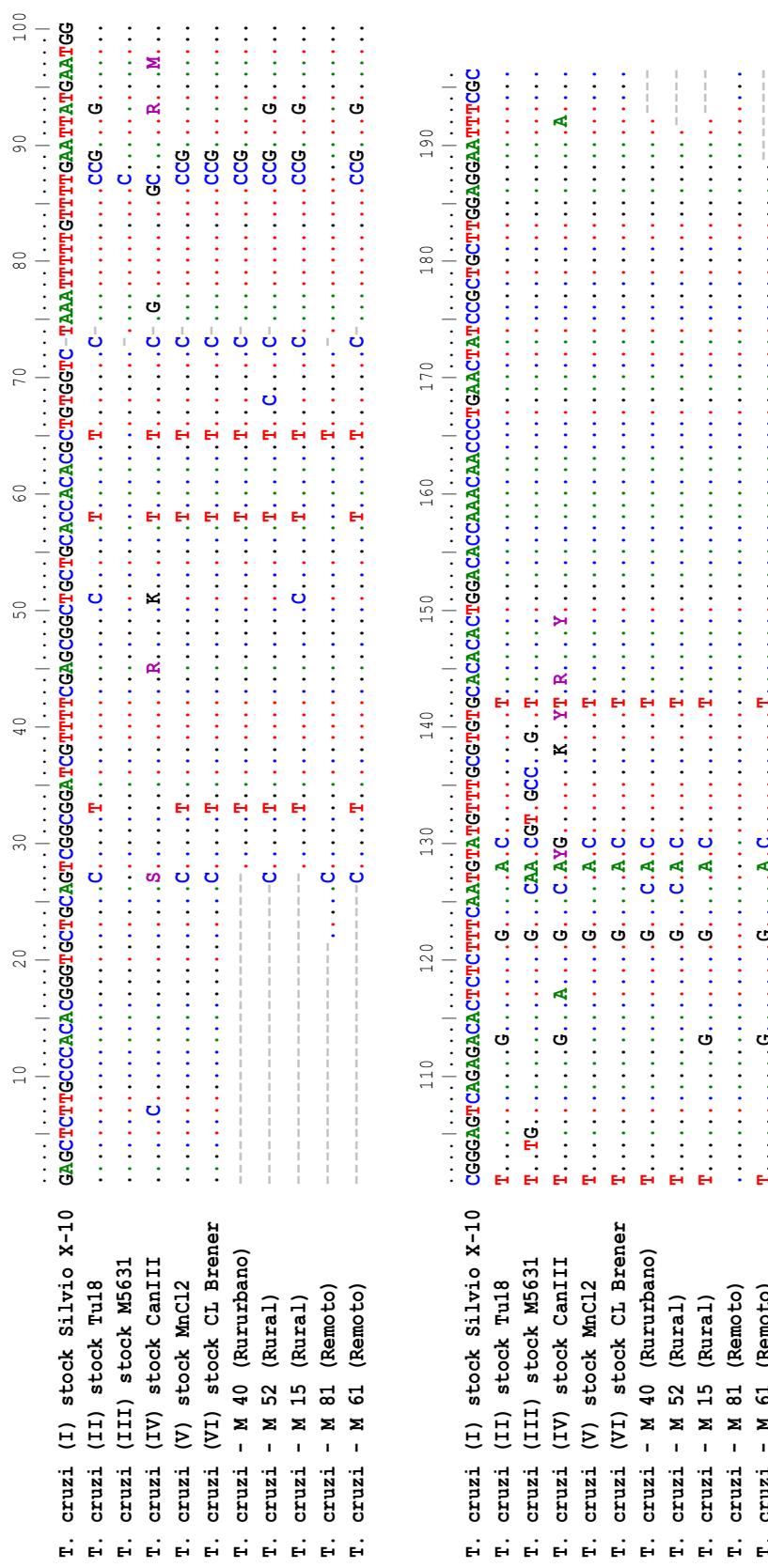


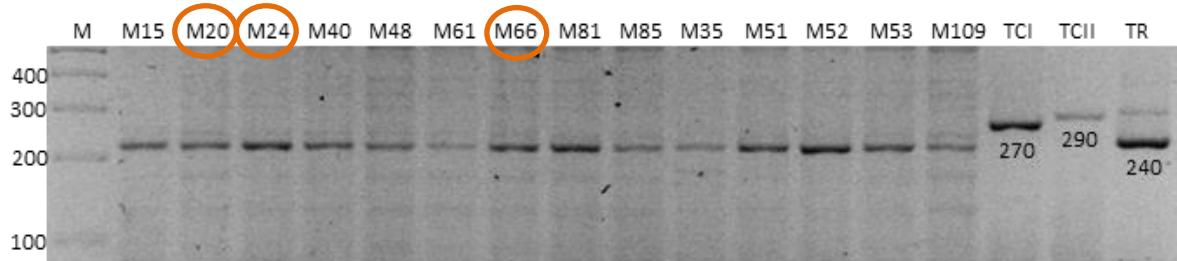
Figura 2.17- Alineamiento de las secuencias repetitivas de ADN satélite obtenidas de las cinco muestras analizadas por secuenciación (Nro. de acceso en GenBank: KT369011 a KT369015) con las regiones equivalentes de cepas de referencia representativas de las seis UDTs (*T. cruzi* I – *T. cruzi* VI) obtenidas desde la base de datos GenBank.

De los 109 individuos el 96,3% resultaron positivos a la PCR ADN-Rib, y los fragmentos de ADN ribosomal obtenidos por este procedimiento (de aproximadamente 230 pb) fueron, a simple vista, todos idénticos en las corridas electroforéticas (Figura 2.18 A). Los fragmentos pertenecientes a 9 muestras elegidas al azar (5 del ambiente “rural” y 4 del ambiente “remoto”) fueron analizados por secuenciación, resultando todas con un 99,5% de identidad nucleotídica con la secuencia correspondiente al gen homólogo de *T. minasense* publicado por Sato y col. (2008) (Nro. de acceso en GenBank: AB362411) (Figura 2.18 B). Las secuencias obtenidas de las nueve muestras resultaron entre 99% y 100% idénticas entre sí y publicadas en GenBank con el número de acceso: KT369016. Los resultados confirman la presencia de *T. minasense* o de una especie cercanamente relacionada a *T. minasense* en las nueve muestras analizadas por secuenciación. Como ya mencionamos, los fragmentos de ADN ribosomal obtenidos presentaron el mismo tamaño en todas las muestras positivas (105 muestras) (Figura 2.18 A), con lo que podríamos extraer el resultado de infección por *T. minasense* obtenido en las 9 muestras analizadas por secuenciación al resto de las muestras positivas a la PCR ADN-Rib, resultando en una prevalencia del 97,96% en el ambiente “remoto”, del 94,87% en el “rural”, y de 94,4% en el ambiente “rururbano”.

Cabe destacar que de las 9 muestras en las que se analizó la secuencia del ADN ribosomal confirmando la presencia de *T. minasense*, 6 fueron negativas a la PCR ADN-k y 3 positivas. Estos resultados nos sugieren que *T. minasense* no puede ser amplificado por los primers utilizados en la PCR ADN-k, y que la PCR ADN-Rib en presencia de *T. minasense* no pudo detectar los tripanosomátidos amplificados por el protocolo de ADN-k.

No fue posible obtener ADN proveniente de alguna cepa de referencia de *T. minasense* para ser utilizado como control positivo en esta PCR.

A)



B)

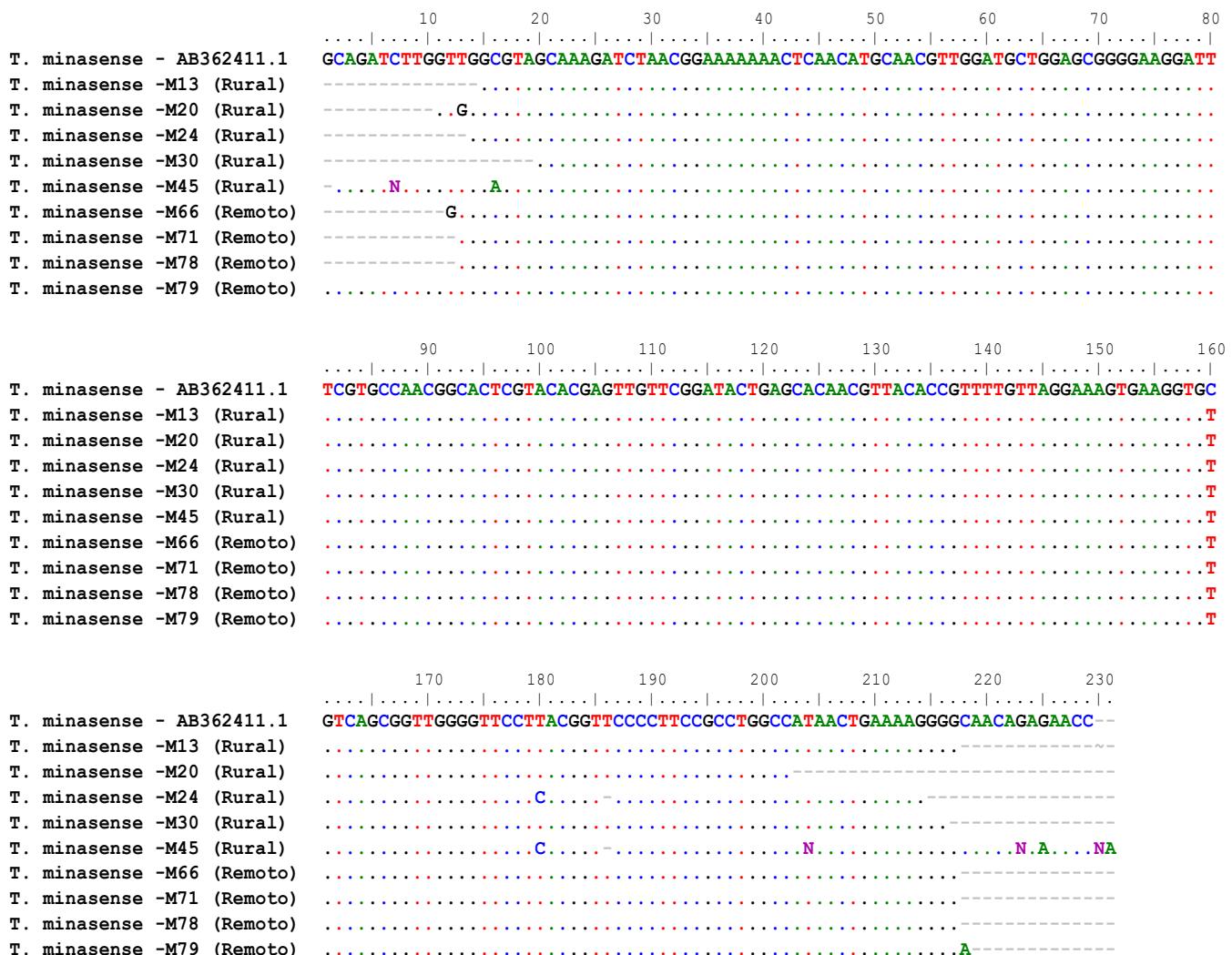


Figura 2.18- A) Gel de agarosa (2%) donde se observan los fragmentos de ADN de algunas muestras (indicadas por su código de identificación) obtenidos por la PCR ADN-Rib. Con círculo naranja se indica en cuáles de estas muestras se confirmó el resultado por análisis de secuencia. TCI: *T. cruzi* I, TCII: *T. cruzi* II, TR: *T. rangeli*; M: marcador de peso molecular de ADN 1 kb. El tamaño de los fragmentos es indicado a la izquierda de la figura y debajo de los fragmentos de los controles positivos. B) Alineamiento de las secuencias de ADN ribosomal obtenidas de las nueve muestras de tejido auricular de mono aullador (Nro. de acceso en GenBank: KT369016), con la región equivalente de la cepa de referencia publicada por Sato y col. 2008 (Nro. de acceso en GenBank: AB362411).

A partir del algoritmo (Figura 2.5) utilizado para el diagnóstico, definimos 5 resultados posibles:

- a) Muestras que dieron positivas a los tres protocolos de PCR. Este grupo representa a los individuos en los que se confirmó la presencia de *T. cruzi* por PCR de ADN-Sat, y además tuvieron resultado positivo para *T. minasense* por el protocolo de ADN-Rib, indicando que estos individuos mantienen una infección mixta entre estos dos parásitos (8 individuos presentaron este resultado, 7,34% de las muestras).
- b) Muestras que fueron positivas a las PCRs de ADN-k y ADN-Rib. En estos casos, no pudimos caracterizar y confirmar qué especie de *Trypanosoma* dio resultado positivo al protocolo de ADN-k. Sin embargo, de acuerdo con los antecedentes y la evaluación de nuestros resultados, podemos sugerir que se debe a la infección por *T. cruzi* no detectado por la PCR de ADN-Sat (menos sensible que la de ADN-k), o a la infección por *T. rangeli* que para este protocolo de PCR puede generar productos entre 300 y 450 pb derivados de minicírculos de ADNk de 4 regiones conservadas (Vallejo y col., 1999; Botero y col., 2010). Por lo tanto, podemos sugerir que son animales con infección mixta causada por *T. minasense* y *T. cruzi/T. rangeli* (40 individuos presentaron este resultado, 36,7% de las muestras).
- c) Muestras positivas a la PCR de ADN-Rib, y negativas a ADN-k y ADN-Sat. En estas muestras solo se detectó la presencia de *T. minasense* (57 individuos, 52,3% de las muestras).
- d) Muestras que solo fueron positivas al protocolo de ADN-k. En estos animales se detectó un tripanosomático que podría ser *T. cruzi* o *T. rangeli* como describimos en el punto B (1 individuo, 0,91% de las muestras).
- e) Muestras que fueron negativas a los tres protocolos de PCR (3 individuos, 2,75% de las muestras).

En la Figura 2.19 podemos ver la proporción de individuos que resultó con uno u otro resultado en cada ambiente estudiado.

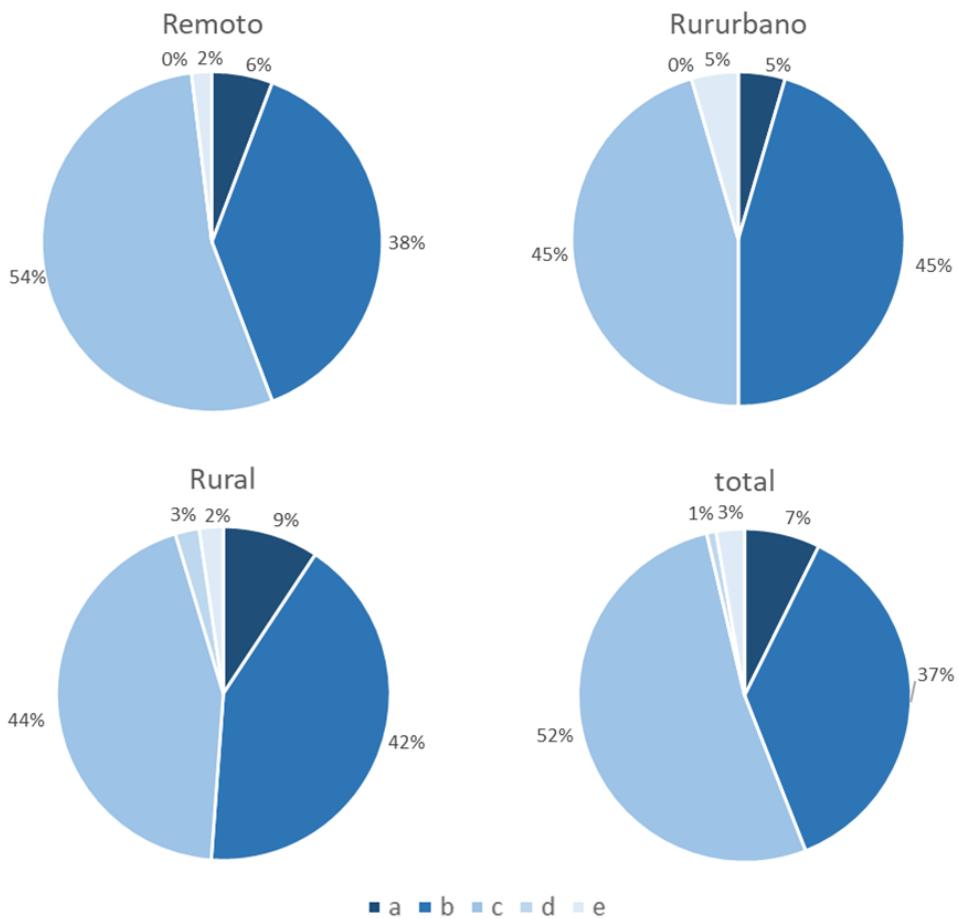


Figura 2.19. Resultados de diagnóstico por ambiente: proporción de individuos en los que se detectaron los siguientes resultados de infección: a) individuos con infección mixta de *T. cruzi* y *T. minasense*; b) individuos con infección mixta de *T. minasense* y *T. cruzi* o *T. rangeli*; c) individuos con infección de *T. minasense*; d) individuos con infección de *T. cruzi* o *T. rangeli*; y e) individuos con diagnóstico negativo.

2.3.3- Xenodiagnóstico

Esta técnica diagnóstica fue aplicada a 107 animales de los 109 capturados (utilizando un total de 213 cajas de xenodiagnóstico, en un animal se utilizó una única caja porque tenía bajo peso). Todas las muestras fueron negativas a los 30 (primera lectura) y 60 días (segunda lectura) post exposición de los triatomíos.

Se realizó una evaluación descriptiva de la calidad de implementación del método teniendo en cuenta la sobrevida y la alimentación de los triatomíos en las cajas de xenodiagnóstico, contabilizando el número de ninfas vivas por caja y clasificándolas por

su estado nutricional cualitativo según Ceballos y col. (2005) (Figura 2.20). Algunos de estos datos se relacionaron con las variables: peso del mono y temperatura diaria media, para evaluar una posible asociación de estas variables con la calidad de la implementación del xenodiagnóstico.

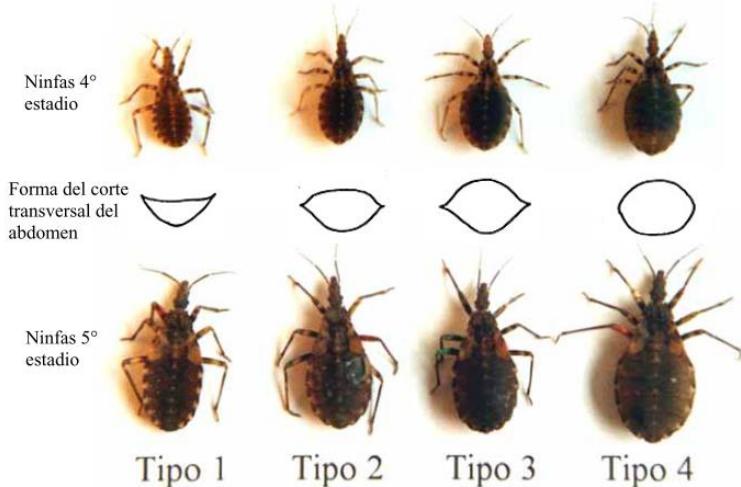


Figura 2.20. Clasificación respecto al estado nutricional cualitativo de los triatomíos de cuarto y quinto estadio según Ceballos y col. (2005): Tipo 1) ayunados; Tipo 2) escasa reserva sanguínea; Tipo 3) buena reserva sanguínea; Tipo 4) gran reserva sanguínea

En la mayoría de las cajas (177 de 213), a la semana de haber sido expuestos a alimentarse sobre el mono, la sobrevida de los triatomíos fue satisfactoria sobreviviendo entre 7 y 9 triatomíos por caja (en 6 cajas hubo por error 9 triatomíos). En 18 cajas, pertenecientes a 12 individuos, no sobrevivió ningún triatomino (Figura 2.21 A). Esto se debió a que durante el 4to día de muestreo (15/7) las cajas fueron acondicionadas para contrarrestar la baja temperatura de esos días, con el objetivo de mejorar la alimentación de los triatomíos, resultando accidentalmente en una temperatura excesiva sobre algunas cajas.

Al realizar un análisis de correlación de *Spearman*, entre la temperatura diaria media y la proporción de ninfas vivas a la semana de haber sido expuestas, sin tener en cuenta las cajas que fueron utilizadas el día 15/7, no se halló una relación lineal entre ambas variables ($S_r = 0,15$, $p = 0,1383$) (Figura 2.21 B).

Para categorizar el estado nutricional de los triatomíos, se utilizó la clasificación según Ceballos y col. (2005) (Figura 2.20). Para evaluar si la alimentación de las vinchucas

depende linealmente de la temperatura diaria, se realizó un análisis de regresión lineal simple relacionando la proporción de ninfas alimentadas (uniendo las categorías Tipo 2, 3 y 4) con la temperatura diaria media. Si bien se observa una tendencia positiva entre ambas variables, la relación lineal no fue significativa ($n_{días} = 12$, $R^2 = 0,2$, $p\text{-valor} = 0,1505$).

Otra variable analizada fue el peso de los monos. Al analizar la relación entre la proporción de triatominos vivos (a la semana de haber sido expuestos) y el peso del animal expuesto, no se encontró una relación lineal significativa ($S_r = 0,08$, $p\text{-valor} = 0,4540$). Y al analizar la proporción de ninfas alimentadas con el peso del animal tampoco se obtuvo una relación lineal significativa, y el coeficiente de correlación fue negativo ($S_r = -0,13$, $p\text{-valor} = 0,2177$). En ambos análisis no se tuvieron en cuenta los datos de las cajas utilizadas el día 15/7.

Cabe destacar que la mayor parte de los individuos capturados el 4to día de muestreo (7 animales, de los grupos Quitilina y Azula), no pudieron ser analizados por xenodiagnóstico, dado que en 18 cajas murieron el total de los tratominos que contenían (Figura 2.21); 14 de estas cajas se habían utilizado en esos 7 animales, y las 4 cajas restantes pertenecen a animales en los que se perdieron los tratominos de una de las cajas del par utilizado para el diagnóstico. Dichos 7 animales de Quitilina y Azula resultaron negativos al diagnóstico molecular de la muestra de sangre. Uno de los animales de los que quedó una sola caja viable es el M15 de Hembra Negra que resultó positivo para *T. cruzi* con el diagnóstico de sangre por PCR.

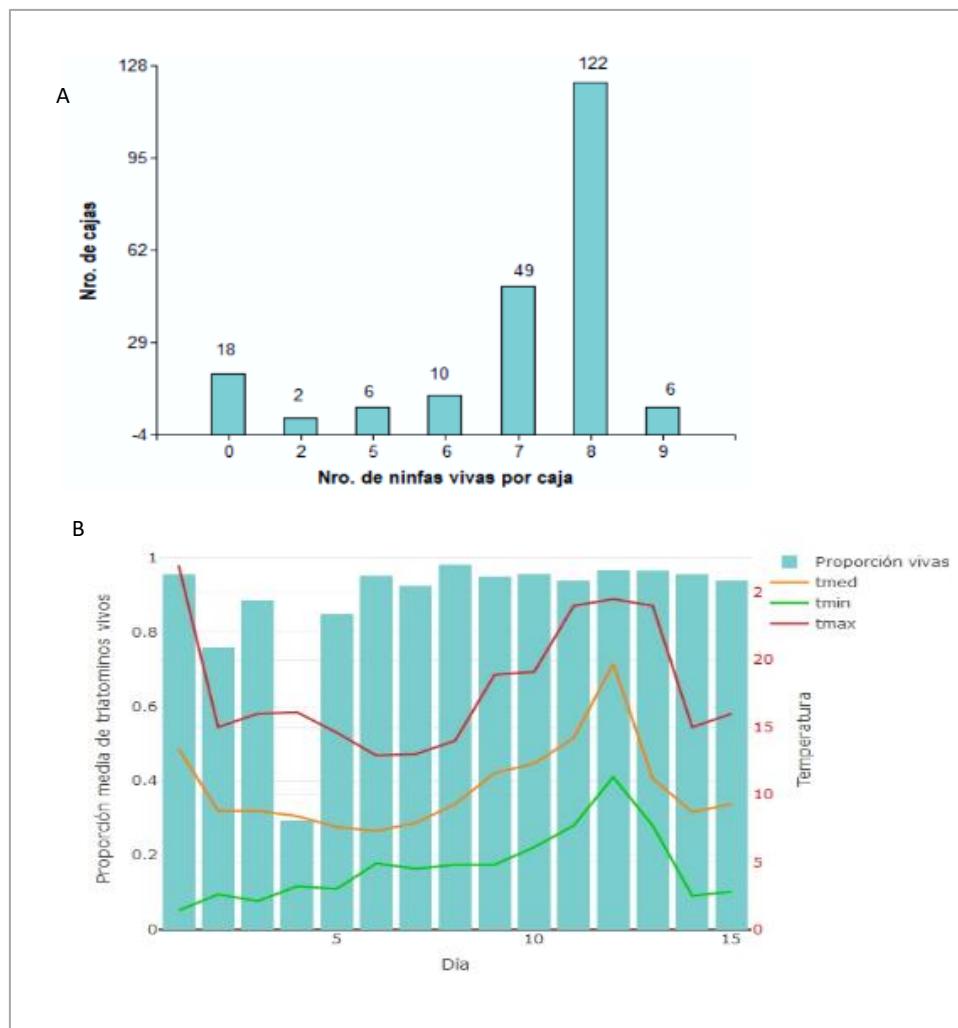


Figura 2.21. Gráficos ilustrando los datos de sobrevida de los triatominos utilizados para aplicar la técnica del xenodiagnóstico. A) Distribución del número de cajas con diferente grado de sobrevida de triatominos a la semana de haber sido aplicado el método. B) Sobrevida de los triatominos por caja asociada al registro diario de temperaturas media, mínima y máxima, para cada día de muestreo.

2.3.4- Insectos vectores de *Trypanosoma* sp. en árboles dormideros de *Alouatta caraya*

- Trampas con cebo vivo:

Entre los tres ambientes estudiados se colocaron un total de 150 trampas, con un esfuerzo de muestreo promedio de 8,95 trampas por día. En IB (ambiente “remoto”) fueron muestreados 6 sitios dormideros de los 15 en los que fueron muestreados monos aulladores; en PPSC (ambiente “rural”) se muestrearon 8 sitios de 10; y en SC (ambiente “rururbano”) 4 sitios de 6. En la Figura 2.11 de la sección anterior se muestran los

distintos ecotopos que fueron relevados en cada ambiente estudiado, y en la Tabla 2.6 cuántas trampas se colocaron en cada microhábitat o ecotopo.

El total de las trampas resultaron negativas para la presencia de triatominos. En algunas de las trampas se capturaron insectos del orden Opiliones, y de las familias Ixodidae (garrapatas duras), Argasidae (garrapatas blandas), y Psychodidae (flebótomos) (Figura 2.22).

Ambiente	Ecotopo	N trampas
Remoto	cueva	9
	entre ramas	1
	hueco árbol	32
	hueco tronco	13
Total		55
Rural	cueva	1
	hueco árbol	27
	hueco tronco	19
	palmera	7
	planta epífita	2
Total		56
Rururbano	cueva	5
	hueco árbol	25
	hueco tronco	7
	planta epífita	2
Total		39

Tabla 2.6. Número de trampas con cebo vivo colocadas en los distintos ecotopos seleccionados en cada ambiente estudiado.

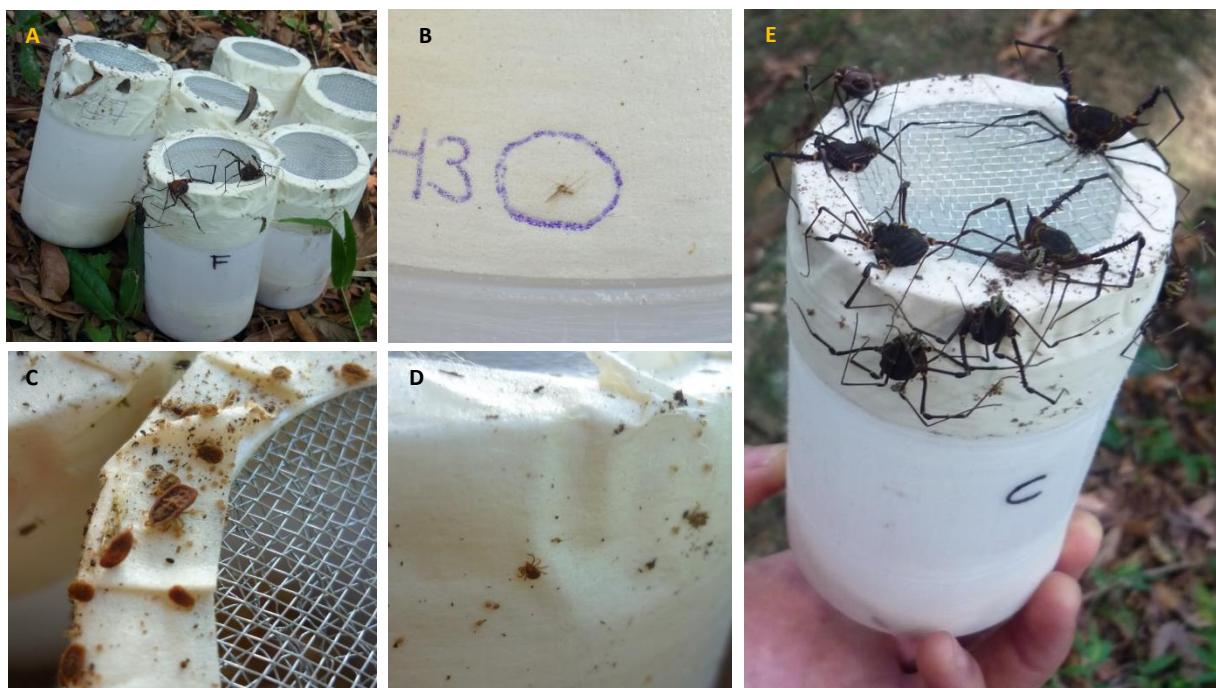


Figura 2.22. Otros insectos capturados con las trampas de cebo vivo. A) Trampas colectadas luego de una noche de exposición, donde se pueden observar en una de ellas los insectos del orden Opiliones atrapados en la trampa. B) Flebótomo atrapado en el pegamento de la cinta bifaz. C) Garrapatas de la familia Argasidae. D) Garrapata de la familia Ixodidae. E) Opiliones atrapados en el pegamento de la trampa.

- Capturas por disección de nidos de aves:

Se realizó la disección de tres nidos de aves en el ambiente “rural” y de tres nidos de aves de la familia Furnariidae en el ambiente “remoto”. En todos los casos estuvieron asociados en cercanía a alguno de los grupos de aulladores muestreados (Figura 2.23). En los seis nidos disectados registramos la presencia de triatominos de la especie *Psammolestes coreodes* (Figura 2.24). Se colectaron un promedio de $12,17 \pm 4,07$ triatominos por nido.

Se colectaron 41 triatominos en SC y 32 en IB, en la Tabla 2.7 se muestran los grupos de aulladores que se encontraban cercanos a cada nido colectado. Los insectos fueron analizados observando sus heces al microscopio óptico y en un individuo colectado en el ambiente “rural” (perteneciente al Nido 1) se registró la presencia de flagelados con morfología compatible con *T. cruzi*. Cabe destacar que el Nido 1 estaba ubicado en el área de acción del grupo “Huerta” y este grupo de animales es el grupo en el que se hallaron dos monos con resultado confirmado por PCR ADN-Sat para *T. cruzi* (Tabla 2.5).

Las muestras de heces de los triatominos, incluida la muestra positiva, no pudieron ser analizadas mediante PCR debido a un incidente en el laboratorio. Por un error, las muestras fueron descongeladas inadvertidamente, lo que provocó su deterioro y las hizo inutilizables. Nuevos muestreos y estudios de los triatominos de la zona podrían facilitar nuevo material para su diagnóstico.

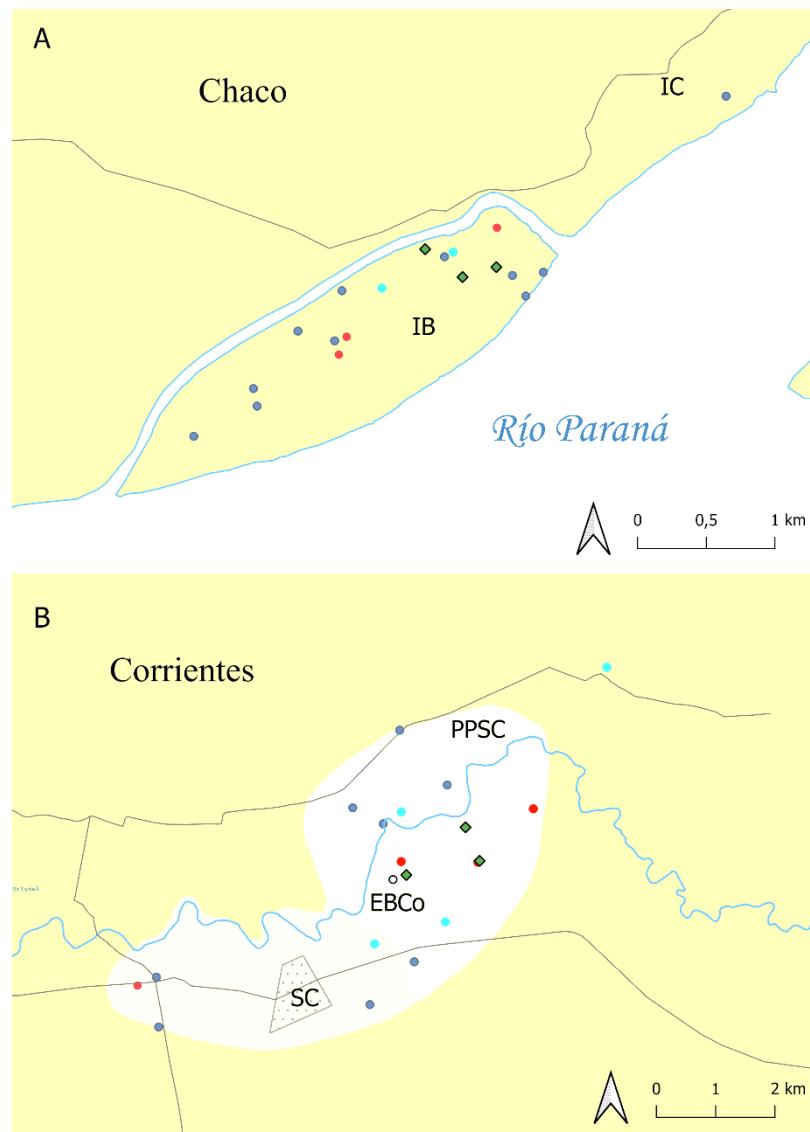


Figura 2.23. Ubicación de los nidos de aves colectados para la búsqueda de triatominos (rombos verdes) respecto de la ubicación de los grupos de monos muestreados (círculos azules, rojos y celestes, ya mostrados en Figura 2.15. A) Ubicación espacial de los nidos colectados en el ambiente “remoto” (IB: Isla Brasilera). B) Ubicación espacial de los nidos colectados en el ambiente “rururbano” (SC: San Cayetano) y en el ambiente “rural” (PPSC: Parque Provincial San Cayetano).



Figura 2.24. Especímenes de *Psammolestes coreodes* adultos colectados de nidos de aves de la familia Furnariidae.

ID nido	Grupo de monos más cercano	Ambiente	Especie	Nro. de triatominos	Nro. de positivos (observación al MO)
N1	Huerta	Rural	<i>Ps. coreodes</i>	12	1
N2	Cochelo Cue	Rural	<i>Ps. coreodes</i>	13	0
N3	Hembra Negra	Rural	<i>Ps. coreodes</i>	16	0
N4	10 Mangos	Remoto	<i>Ps. coreodes</i>	11	0
N5	10 Mangos	Remoto	<i>Ps. coreodes</i>	5	0
N6	Escuela	Remoto	<i>Ps. coreodes</i>	16	0

Tabla 2.7. Información de los triatominos capturados en los nidos de aves disectados según el ambiente y el grupo de monos cercano.

2.4- Discusión y conclusiones

2.4.1- Infección por *T. cruzi* en *A. caraya*

A partir de los muestreos y diagnósticos realizados confirmamos que los monos aulladores que habitan en las áreas de estudio se encuentran infectados por *T. cruzi* y por *T. minasense*. Y con los muestreos para triatominos detectamos la presencia de *Ps. coreodes* habitando los mismos ambientes que *A. caraya*, y la presencia de flagelados de morfología compatible con *T. cruzi* en sus heces. Los resultados obtenidos nos permiten registrar y dar conocimiento sobre la presencia de *T. cruzi* en el ambiente natural circundante a la población humana, lo que abre nuevas preguntas y alertas respecto a la vigilancia de la transmisión de *T. cruzi* actual en estos sitios del noreste argentino.

El número de monos capturados en la IB (ambiente “remoto”) fue mayor que en los otros sitios estudiados. Como hemos mencionado la densidad ecológica de monos en la isla es mayor en la isla que en el PPSC (Kowalewski y Zunino, 2004; Zunino y col., 2007), por lo que era esperable que la captura sea más exitosa en IB que en PPSC y los otros sitios. Respecto al sexo de los individuos capturados, fue mayor la proporción de machos que de hembras, y esto se debió en gran parte a que las hembras adultas y también las sub-adultas, en muchos casos se encuentran transportando crías, o preñadas, estado en el cual se procuró no capturarlas. Por otro lado, las muestras fueron obtenidas mayormente de individuos adultos, que es el grupo etario preferente al momento de elegir los individuos a ser capturados, esto podría generar un sesgo en los resultados de prevalencia dado que en principio podríamos suponer que los individuos adultos tendrían más probabilidad de estar infectados que los juveniles o infantes. Sin embargo, este sesgo podría ser compensado dado que los adultos podrían mantener infecciones crónicas, como sucede en monos del género *Macaca* y la familia *Cebidae* (Samudio y col., 1999; Espinola Carvalho y col., 2003; De Lana, 2017), en las que es más difícil la detección de parásitos circulantes en sangre.

El diagnóstico molecular de las muestras de sangre confirmó la presencia de *T. cruzi* y de *T. minasense*, estos resultados confirman los registros previos de infección por tripanosomas, basados en técnicas morfológicas y serológicas, en *A. caraya* en la misma región de estudio (Travi y col., 1982; Santa Cruz y col., 2000).

Los protocolos que nos permitieron llegar a la confirmación del diagnóstico fueron los dirigidos al ADN satélite y al ADN ribosomal, con posterior análisis por secuenciación de los productos amplificados. El protocolo dirigido a amplificar el ADN del kinetoplasto reveló resultados positivos, con pequeñas variaciones en el tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos, en casi la mitad de las muestras colectadas. Las variaciones en el tamaño de los productos de esta PCR fueron mejor registradas al exponer a los fragmentos de ADN a mayor tiempo de electroforesis. Esto también nos permitió observar que, para algunos casos, fragmentos obtenidos de animales de un mismo ambiente presentaron un patrón similar, generando fragmentos muy similares en su tamaño. Teniendo en cuenta que al menos en alguna de estas muestras se confirmó la infección por *T. cruzi*, al ser positivas a ADN-Sat y/o al análisis de secuencia, estas observaciones más detalladas de los productos de ADN-k nos permite sugerir que varias muestras positivas a este protocolo y negativas al protocolo de ADN-Sat podrían ser positivas para *T. cruzi*, y que no fueron detectadas por el método de ADN-Sat menos sensible respecto al de ADN-k (Vallejo y col., 1998). La falta de capacidad de detección de la PCR de ADN-Sat pudo estar dada por la baja carga parasitaria, como lo indican los valores de Ct obtenidos, y en particular si se trata de infecciones causadas por *T. cruzi* I o *T. cruzi* IV, para las que este protocolo, según los antecedentes, es menos sensible (Duffy y col., 2009; Schijman y col., 2011; Ramírez y col., 2015).

Asimismo, como se ha visto en trabajos anteriores, los oligonucleótidos dirigidos a amplificar ADN-k de *T. cruzi* también hibridan con el ADN-k de *T. rangeli*, y puede resultar en un conjunto de productos de PCR con tamaños de entre 300 y 450 pb (derivados de los minicírculos con cuatro regiones conservadas de *T. rangeli*), y eventualmente de 760 pb (derivados de los minicírculos con dos regiones conservadas, como se observa en la cepa control que nosotros utilizamos) (Vallejo, 1998; Vallejo y col., 1999; Vargas y col., 2000; Ramírez y col., 2002; Vallejo y col., 2002; Botero y col., 2010). Entonces, si bien en nuestros resultados se observan productos de PCR de ADN-k con tamaño similar al esperado para *T. cruzi* (330 pb), en algún caso los fragmentos podrían ser resultado de la amplificación de *T. rangeli*. No podemos descartar la posibilidad de infección cruzada entre ambos parásitos, según los antecedentes, en infecciones con *T. rangeli* que no son recientes, y en presencia de ambos parásitos, ocurre una amplificación preferencial del ADN-k de *T. cruzi* y no es posible visualizar la presencia de *T. rangeli*, y si la infección de *T. rangeli* es reciente

no es posible detectar a *T. cruzi* (Vallejo y col., 1999; Vargas y col., 2000), por lo que este protocolo de PCR no sería capaz de detectar infecciones mixtas entre estos dos tripanosomas (Vargas y col., 2000). Estas muestras podrían seguir estudiándose, por medio de secuenciación de genes candidatos y análisis in silico de las secuencias, y así poder caracterizar las especies presentes y confirmar los resultados obtenidos.

La reacción de PCR dirigida a ADN-Rib se aplicó en principio para diferenciar tanto entre las distintas cepas de *T. cruzi* como entre *T. cruzi* y *T. rangeli* (Schijman y col., 2006). Sin embargo, al aplicar este procedimiento de PCR se visualizó una banda de aproximadamente 240 pb en casi el total de las muestras, que al ser analizadas por secuenciación, nueve de estas muestras, resultaron en un 99,5% de identidad con *T. minasense*, un tripanosoma que ya ha sido registrado en muestras de primates no humanos en otros países de América latina (Chagas, 1908; Dunn y col., 1963; Hoare, 1972; Deane y col., 1974; De Resende y col., 1994; Ziccardi y col., 2000; Chinchilla y col., 2005; Sato y col., 2008; Tenorio y col., 2014) y es su primer registro en animales en vida libre en Argentina.

Los resultados muestran que en la reacción de ADN-Rib los oligonucleótidos iniciadores sólo se han apareado con el ADN de *T. minasense* sin detectar la presencia de otro tripanosomático, si detectado por los otros protocolos. Lo que sugiere que *T. minasense* se podría encontrar en mayor concentración en circulación que otro tripanosoma en los monos y compite positivamente en la amplificación del ADN blanco en este protocolo de PCR.

Por otro lado, la detección de *T. minasense* y la similitud en el tamaño del fragmento con el esperado para *T. rangeli*, al utilizar este protocolo de PCR, pone en evidencia la falta de especificidad de los oligonucleótidos iniciadores sobre la detección de las especies para las que hasta ahora eran utilizados: *T. cruzi*, *T. rangeli*, y *Leishmania* sp. (Schijman y col., 2006; Cura, 2014; Martínez y col., 2016). Por lo que, posterior a estos hallazgos se procedió al diseño de sondas de hibridación específicas (Cura, 2014), que no llegaron a ser utilizadas en este trabajo. Sin embargo, al margen de que la especificidad se encuentre garantizada por la hibridación con las respectivas sondas, la utilización de cebadores que potencialmente hibridan con los genomas de numerosas especies de tripanosomátidos podría, eventualmente, afectar la sensibilidad y eficiencia del ensayo ante la presencia de infecciones mixtas de *T. cruzi* o *T. rangeli* con otras especies (por ejemplo, con *Leishmania*

sp. en muestras clínicas, con *Blastocrithidia* sp. en muestras procedentes de vectores, o con *T. minasense* en primates no humanos) (Cura, 2014).

Respecto a los resultados del xenodiagnóstico, como ya mencionamos la carga parasitaria en los sujetos en los que se detectó ADN de *T. cruzi* era baja; posiblemente la técnica del xenodiagnóstico no haya tenido la suficiente sensibilidad para la detección de estos individuos positivos, como así tampoco de los monos que resultaron positivos a la PCR ADN-k. En otros trabajos realizados en animales silvestres donde aplicaron esta técnica diagnóstica también se registra baja sensibilidad en el xenodiagnóstico respecto a las técnicas de biología molecular: Orozco (2012) registra un 6% de prevalencia por xenodiagnóstico respecto a 17,3% detectado por PCR; y Ceballos (2010) registra una prevalencia de infección de 0,9% (5 de 585 animales) por xenodiagnóstico. Asimismo, no se puede descartar que algunos de los resultados positivos que obtuvimos con la PCR ADN-k pudieran ser falsos positivos, como consecuencia de la contaminación en algún paso del análisis o que los fragmentos de ADN obtenidos correspondieran a la amplificación de otro tripanosomático.

Por otro lado, la técnica del xenodiagnóstico permite evaluar la capacidad de infectividad del vector, lo que está directamente relacionado con la competencia del hospedador como reservorio. En este sentido, los resultados obtenidos sugieren que las poblaciones de monos aulladores estudiadas no serían reservorios efectivos para la transmisión vectorial de *T. cruzi*.

Mediante algunos análisis hemos evaluado la calidad con la que fue aplicado el método, teniendo en cuenta el grado de alimentación de los triatominos en relación con el acondicionamiento de los triatominos, la temperatura ambiente, y el peso de los monos; ya que es de esperar que cuanto más se alimenten los triatominos, mayor será la probabilidad de detección del parásito. Se registró una tendencia positiva entre la temperatura y la cantidad de vinchucas que se alimentaron, pero no significativa, entonces la temperatura ambiente no sería un factor que haya afectado la alimentación de los triatominos. Sin embargo, debemos tener en cuenta que las vinchucas fueron, dentro de las posibilidades, cuidadosamente acondicionadas durante toda su estadía en los sitios de trabajo y durante el trabajo en campo siendo mantenidas en conservadoras para mantener una temperatura adecuada hasta el momento de ser expuestas al abdomen del animal anestesiado, y luego de la exposición. También observamos que la sobrevida

de los triatomínos fue satisfactoria, y no se registró una asociación significativa entre la sobrevida y la temperatura diaria. El peso de los monos tampoco resultó ser una variable que influya en la alimentación o la sobrevida de los triatomínos.

En conclusión, sostenemos la idea de una baja carga parasitaria circulante en sangre, difícilmente detectada por el método del xenodiagnóstico, que sí pudo ser detectada por las PCRs dirigidas al kinetoplasto y a la región de secuencias satélites del ADN de *T. cruzi*.

2.4.2- Transmisión de *Trypanosoma cruzi* y la relación con variables biológicas y ambientales

La prevalencia de animales positivos para ADN-k no estuvo asociada a la edad de los animales. Los individuos juveniles, que se estima tienen entre 1 y 4 años de edad (Rumiz 1990, Kowalewski 2007), se encontraron infectados por *T. cruzi* en proporciones similares a los otros grupos etarios, estos individuos pudieron contraer la infección por vía congénita (transmisión vertical), sin embargo, no hay antecedentes que confirmen que la transmisión vertical existe en esta especie de primates. En un estudio en otra especie de primates, tamarinos de la especie *Leontopithecus rosalia*, se sugiere que la transmisión vertical es improbable en dicha especie (Lisboa y col., 2000; 2015). Otra hipótesis es la transmisión oral por consumo de hojas o frutos contaminados, lo que implicaría la presencia de triatomínos vectores en las áreas donde habitan los monos. Lo cual es posible dados nuestros hallazgos de *Ps. coreodes* en los nidos de furánidos y los antecedentes de *T. sordida* en palmeras de la región (Damborsky y col., 2001; Bar y col., 2010). De la misma manera para la hipótesis de transmisión vectorial.

La prevalencia de positivos a ADN-k no estuvo asociada significativamente a ninguno de los ambientes estudiados en particular (remoto, rural o rururbano). Sin embargo, en las UDTs de *T. cruzi* halladas encontramos alguna diferencia. Se logró la tipificación de 5 muestras, en la IB se caracterizó una secuencia compatible con *T. cruzi* I, y otra muestra fue compatible con el grupo de las UDTs II, V y VI. También se caracterizó una muestra del ambiente “rururbano” y dos del ambiente “rural”, resultando en los tres casos compatibles con el grupo de las UDTs II, V y VI.

El registro de *T. cruzi* I, solo en el ambiente “remoto”, es consistente con lo hallado en la bibliografía, donde asocian a esta UDT con el ciclo de transmisión silvestre de *T. cruzi*

(Bernabe y col., 2000; Diosque y col., 2003; Yeo y col., 2005; Ceballos y col., 2006; Cardinal y col., 2008; Ceballos, 2010; Alvarado-Otegui y col., 2012; Orozco y col., 2013; Cécere y col., 2015). La infección por *T. cruzi* I en monos aulladores, también sustenta la teoría de transmisión arbórea para esta UDT (Yeo y col., 2005; Cardinal y col., 2008; Llewellyn y col., 2009). Asimismo, las UDTs II, V y VI se han registrado en la bibliografía asociadas a ambos ciclos de transmisión (Noireau y col., 2009), pero principalmente al ciclo de transmisión doméstico de *T. cruzi* (Yeo y col., 2005). Nuestros resultados son compatibles con estas asociaciones, y el hallazgo en la Isla Brasilera de estas UDTs, si bien allí los monos no co-habitan con animales u hogares domésticos, su cercanía a chacras donde viven personas y animales domésticos hace que no podamos considerar estrictamente a la Isla como un ambiente alejado y sin interacción con el ambiente antrópico.

Por otro lado, existen registros de las UDTs *T. cruzi* V y *T. cruzi* VI en pacientes humanos crónicos provenientes de la provincia de Corrientes (San Roque y Goya) y en Chaco (varias localidades, algunas cercanas a la región de estudio), lo cuál coincide con las UDTs halladas en los monos aulladores.

Para obtener conclusiones más definidas respecto a las UDTs circulantes y sus diferencias entre los ambientes estudiados es necesario acceder a mayor cantidad de muestras caracterizadas por análisis de secuencias.

2.4.3- Infección por *Trypanosoma minasense*

Nuestros resultados muestran la presencia de *T. minasense* en la mayor parte de las muestras de sangre de *A. caraya* estudiadas, detectamos fragmentos de ADN ribosomal que presentaron identidad nucleotídica con la cepa de referencia de *T. minasense* registrada por primera vez por Sato y col. (2008). El grado de identidad que obtuvimos con la cepa de referencia fue similar al obtenido entre secuencias disponibles de ADN ribosomal 24S de dos cepas de *T. rangeli* (“San Agustín” y “SC58”: 99.58%, nro. de acceso en GenBank.: U73612 y KJ742907, respectivamente), y fue mayor que la identidad obtenida entre cepas de *T. cruzi* de una misma UDT (por ejemplo, las cepas “DM28” y “La Cruz” [TC I: 96.4%] [Souto y col. (1999) y nro. de acceso: L22334, respectivamente] y las cepas “TC IIb” e “Y” [TC II: 92.7%] [Nros. de acceso: GQ303145, y M28885, respectivamente]). Por lo tanto, definimos nuestros resultados como infección por *T.*

minasense en las 9 muestras secuenciadas y extrapolamos el resultado a todos los animales en los que la PCR ADN-Rib resultó positiva con amplicones de peso molecular idénticos a los fragmentos de ADN secuenciados, obteniendo una prevalencia de infección del 96,3%.

El protocolo de PCR de ADN del kinetoplasto no detectó la presencia de *T. minasense*, sin embargo, la falta de ADN de referencia de *T. minasense* no nos permitió contar con el control positivo para esta especie. Por otro lado, la PCR dirigida al ADN ribosomal reveló fragmentos de ADN de *T. minasense* y no los específicos de *T. cruzi* (Schijman y col., 2006), posiblemente porque la mayor carga de *T. minasense* en los individuos con infección mixta favorece la detección de este tripanosoma y no de *T. cruzi*. Este protocolo está dirigido a amplificar el dominio D7 del gen de ADN ribosomal 24S α de tripanosomátidos, el cual presenta dimorfismo en la secuencia entre tripanosomátidos, y es originalmente utilizado para la detección diferencial de tripanosomátidos y de las UDTs de *T. cruzi* (Souto y col., 1999; Schijman y col., 2006). Por lo tanto, suponemos que la cantidad de ADN de *T. minasense* presente en las muestras predominó respecto a la de otros tripanosomas, detectándose solamente dicho parásito por este protocolo.

Cerca de la mitad de las muestras presentó infección mixta para *T. minasense* y *T. cruzi/T. rangeli*, y en la otra mitad detectamos solo la infección por *T. minasense*.

Trypanosoma minasense ha sido registrado en primates del género *Alouatta*, como en *A. palliata* en vida libre por medio de técnicas morfológicas en Costa Rica (Chinchilla y col., 2005), y en *A. caraya* en cautiverio en Brasil por diagnóstico molecular (Tenório y col., 2014). Este estudio es el primero en diagnosticar específicamente la presencia de *T. minasense*, o de una especie cercanamente relacionada con este tripanosoma, en *A. caraya* de vida libre, y en detectar esta especie en Argentina.

Tripomastigotes de *T. minasense* fueron originalmente descritos por Chagas (1908) en la sangre de *Callithrix penicillata* (mono tití de pincel negro) del sudeste de Brasil. Esta especie de tripanosoma se encuentra ampliamente distribuida en primates platirrinos, como *A. palliata*, *Saimiri sciureus*, *Saguinus midas*, y *Callithrix penicillata* (Chagas, 1908; Dunn y col., 1963; Sousa y Dawson, 1976; Ziccardi y Lourenço de Oliveira, 1997; Ziccardi y col., 2000; Chinchilla y col., 2005; Sato y col., 2008). Su vía de transmisión es

desconocida. Dado que la mayoría de los primates en los que se ha registrado la infección por este parásito son primariamente arbóreos, Dunn y col. (1963) sugirió que sus vectores probablemente sean insectos arbóreos o parcialmente arbóreos.

La prevalencia de infección por *T. minasense* hallada en nuestro estudio (96%) es, según nuestros conocimientos, más alta que la registrada en la bibliografía para monos platirrinos. Tenório y col. (2014) hallaron un 90% de similitud con la secuencia homóloga de la cepa de referencia de *T. minasense* publicada por Sato y col. (2008) en un *A. caraya* en cautiverio, y los reportes en otros estudios fueron resultado de técnicas de diagnóstico como frotis de sangre, hemocultivos y/o xenodiagnóstico, sin caracterización genética de los parásitos (De Resende y col., 1994; Ziccardi y Lourenço de Oliveira, 1997; Ziccardi y col., 2000). Nuestro estudio reveló un valor de prevalencia similar al obtenido por Sato y col. (2008), donde detectaron *T. minasense* por PCR en el 93% de un grupo de *S. midas* capturados en el ambiente silvestre. Posiblemente los valores altos de prevalencia se deben a la mayor sensibilidad de los métodos moleculares de diagnóstico utilizados, pero también podrían deberse a la presencia de un parásito ya establecido en las poblaciones en vida libre de primates platirrinos, coincidiendo con lo que manifiesta Hoare (1972) que consideró a las especies pertenecientes al subgénero *Megatrypanum* filogenéticamente como los representantes más primitivos del género *Trypanosoma* de mamíferos.

Nuestro actual conocimiento acerca de las vías de transmisión de *T. minasense*, los efectos de la infección en monos, y cómo este u otro tripanosoma no zoonótico interactúa con *T. cruzi* en una infección mixta, es muy escaso. Los resultados de nuestro estudio nos abren preguntas sobre estos puntos específicos y en general sobre la biología de *T. minasense* en poblaciones de primates platirrinos en vida libre, y también en cautiverio, por ejemplo, en acciones de manejo ex-situ de individuos como soporte en estrategias de rescate, reintroducción y refuerzo poblacional en casos de acciones para conservación de una especie.

2.4.4- Insectos vectores de *T. cruzi* en árboles dormideros de *A. caraya*

Hallamos especímenes de la especie *Ps. coreodes* en nidos de aves aparentemente deshabitados en el momento de ser colectados, y no se capturó ningún triatomino con las trampas adhesivas con cebo vivo tipo *Noireau*.

Las trampas con cebo vivo fueron puestas a prueba exitosamente en varios tipos de ecosistemas y en distintos tipos de hábitats (Noireau y col., 1999; 2000; 2002; Ceballos, 2010), teniendo en cuenta estos antecedentes cabe destacar que las trampas que producimos y utilizamos fueron puestas a prueba en condiciones de laboratorio y campo. Pudimos probar la efectividad del pegamento de la cinta con vinchucas adultas de bioriego, y en campo comprobamos su efectividad al capturar con la misma otras especies de artrópodos como opiliones, garrapatas y flebótomos.

Por otro lado, según los antecedentes el éxito en las capturas con las trampas de cebo vivo depende del estado nutricional de la población de los triatominos, los insectos con falta de alimento son capturados con más facilidad (Noireau y Dujardin, 2001; Noireau y col., 2002). Por lo tanto, podríamos suponer que las trampas estaban funcionando correctamente y que efectivamente no había presencia de triatominos en los sitios en donde las activamos, o que los triatominos presentes estuvieran en buen estado nutricional y no se acercaran a la trampa.

Las palmeras, las cuevas de armadillos y de zarigüeyas, los huecos de árboles, y los nidos de aves mantienen condiciones adecuadas para que muchas especies de triatominos residan y se reproduzcan, y han sido registrados como ecotopos específicos en lugares cercanos a nuestros sitios de estudio (Bar y Wisnivesky-Colli, 2001; Damborsky y col., 2001; Bar y col. 2010). Aunque las asociaciones entre vectores y ecotopos pueden variar, algunas especies presentan una relación más cercana con un tipo de hábitat, como los triatominos del género *Psammolestes* que se asocian a nidos de aves de la familia Furnariidae (Carcavallo y col., 1998; Bar y col., 1999b), mientras otros se asocian a un gran rango de ecotopos terrestres y arbóreos (Gaunt y Miles, 2000; Noireau y col., 2009). Nosotros hemos observado variadas cavidades y nidos de aves en los árboles dormideros de los monos aulladores, que podrían ser habitados por triatominos silvestres. En varias ocasiones hemos avistado pequeñas cuevas de mamíferos en las bases de los árboles dormideros. Sin embargo, solo hemos detectado la presencia de triatominos en nidos de aves de furnáridos deshabitados, los cuales se encontraban en árboles ubicados dentro del área de uso de los grupos de aulladores estudiados.

En todos los nidos hallamos especímenes de *Ps. coreodes* y algunos de ellos presentaban rastros que nos indicaban que habían estado habitados recientemente por aves y/o pequeños mamíferos. El género *Psammolestes* pertenece a la subfamilia Triatominae la

cual se diferencia de las otras subfamilias de Reduviidae por ser hematófagas, lo que las ubica en la definición de potenciales vectores de *T. cruzi* (Hwang y col., 2012; Cruz-Guzmán y col., 2014). En las heces de un triatomino colectado detectamos protozoos flagelados en movimiento, de los que no fue posible caracterizar la especie por diagnóstico molecular por las razones ya mencionadas en la sección de resultados. Los antecedentes muestran que la detección de infección en las heces de los triatominos tiene baja sensibilidad cuando la carga parasitaria es baja, y también baja especificidad debido a la posibilidad de infección con otros tripanosomátidos morfológicamente similares como *T. rangeli* o *Blastocrithidia triatomae* (Cerisola y col., 1971; Chiurillo y col., 2003; Schijman y col., 2006), un protozoo flagelado de la familia Trypanosomatidae que afecta a los triatominos. Teniendo en cuenta los resultados de este estudio podemos sugerir que el flagelado observado podría ser *T. cruzi* o *T. minasense*, pero también podría ser otro tripanosoma o *B. triatomae*, u otro tripanosomático.

De acuerdo con los antecedentes, los triatominos asociados a nidos de aves generalmente no se encuentran infectados por *T. cruzi*, dado que las aves son refractarias a la infección, pero pueden ser importantes fuentes de alimentación para los triatominos. Por otro lado, los nidos también son habitados por roedores y/o marsupiales, principalmente en el invierno para protección y alimentación (Marti y col., 2014). Estos habitantes oportunistas son reservorios de *T. cruzi* implicados en el ciclo silvestre del parásito, por lo que, los nidos de aves infestados representan un potencial curso de infestación para ambientes domésticos y peridomésticos en áreas rurales y consecuentemente un riesgo epidemiológico para la transmisión de *T. cruzi* (Marti y col., 2014). Asimismo, no podemos descartar que estos triatominos puedan alimentarse de los monos, si bien deben coincidir varios factores a la vez para que ocurra el evento como, por ejemplo, que los monos duerman cerca de un nido infestado y que los triatominos estén hambreados y no tengan otra fuente de alimento más cercana, esto no es descartado.

Según la bibliografía la transmisión de tripanosomas en monos en vida libre ocurre principalmente a través de la ingestión de triatominos infectados (Da Silva y col., 2008; Roque y col., 2008; Marcili y col., 2009a). La dieta de los monos aulladores consiste primariamente de hojas, frutas y flores (Fernández, 2014; Días y Rangel-Negrín, 2015), pero ellos pueden ingerir accidentalmente insectos cuando comen frutas u hojas o cuando

remueven ectoparásitos de otro individuo durante el acicalamiento. Por lo tanto, los monos podrían estar infectándose por esta vía oral.

En varios departamentos de la provincia de Corrientes, incluyendo el departamento Capital donde se encuentran nuestros sitios de estudio rural y rururbano, ya se había registrado la presencia de triatominos vectores de *T. cruzi*, como *T. infestans*, *T. sordida*, *T. platensis*, *T. rubrovaria*, *Panstrongylus megistus*, *Pa. geniculatus* y *Ps. coreodes* (Damborsky y col., 2001). Además, *T. sordida*, *T. platensis*, *T. rubrovaria*, y *Ps. coreodes* se habían registrado en ecotopos silvestres, y en nidos de aves en particular se hallaron *T. platensis*, *T. sordida* y *Ps. coreodes* (Bar y col., 1999b; Damborski y col., 2001; Bar y col., 2010). Por otro lado, en otros estudios en la región se ha registrado la infección por *T. cruzi* en triatominos y se constató una seroprevalencia humana de infección por *T. cruzi* que osciló entre 5,2% y 32,3% (Bar y col., 1992; 1996; 1997; 2010). Estos elementos podrían estar manteniendo la endemia chagásica en la provincia, y nos surge la pregunta de si actualmente estos factores siguen estando presentes y cuál es la situación actual de la transmisión de *T. cruzi* en los ambientes rurales y silvestres de la zona.

2.4.5- Enfermedad de Chagas, monos aulladores y la interface doméstico-silvestre

Nuestros resultados revelan la infección por *T. cruzi* y por *T. minasense* en los monos aulladores del noreste de Argentina. Teniendo en cuenta que el ADN de un hemoparásito parece no persistir por mucho tiempo en circulación sanguínea en ausencia del organismo intacto, entonces la detección del ADN del parásito en sangre indicaría una infección activa (Barker, 1990; Vallejo, 1998), lo que nos hace suponer que los monos en los que se confirmó la detección de ADN de *T. cruzi* mantienen al mismo en circulación. Asimismo, nuestros resultados muestran una carga parasitaria baja por lo que su participación en mantener el ciclo de transmisión activo en el ambiente que habitan sería acotada.

En la provincia se registraron seroprevalencias humanas que oscilaban entre 5,2% y 32,3% (Bar y col., 1992; 1996; 1997; 2010), y durante el año 2017 el Programa Provincial de Chagas de Corrientes realizó tareas de vigilancia entomológica y relevamiento de seroprevalencia en niños de entre 0 y 10 años, con el objetivo de certificar la interrupción de la transmisión vectorial (Ministerio de Salud Pública, Provincia de Corrientes). Estas

acciones nos indican que la transmisión de *T. cruzi* se encontraba activa en la provincia, ya sea por la vía vectorial o la congénita en la población humana. Y la infección confirmada en *A. caraya* en vida libre en bosques de áreas rurales y remotas, sugieren la posibilidad de un ciclo de transmisión silvestre activo.

En este estudio además de confirmar la infección por *T. cruzi* en monos aulladores en vida libre en las localidades estudiadas, hemos hallado diferentes UDTs del parásito en los distintos ambientes relevados, lo que nos hace preguntarnos sobre las UDTs que estarían circulando en la población humana aledaña. La posibilidad de analizar las secuencias de *T. cruzi* de muestras humanas, y de animales domésticos, nos permitiría cruzar la información con nuestros resultados y evaluar coincidencias y diferencias entre ambos ciclos de transmisión, el enzoótico y el zoonótico.

Los estudios parasitológicos en primates no humanos nos aportan una importante oportunidad para entender mejor la dinámica de transmisión y el riesgo de emergencia de varias zoonosis y antropozoonosis tal como la enfermedad de Chagas, la cual aún afecta a las poblaciones humanas en muchos lugares en la región del Chaco Argentino húmedo y semiárido. Los resultados obtenidos en este estudio aportan al conocimiento sobre los animales en vida libre que portan el parásito y que podrían estar cumpliendo algún rol en la mantención del parásito en el ambiente. Para evaluar esto último hacen falta más estudios en esta y otras especies de animales en vida libre en la región.

Capítulo 3 – Infección por *Leishmania* en monos aulladores (*Alouatta caraya*) del Noreste Argentino

3.1 - Introducción

Las leishmaniasis son enfermedades zoonóticas causadas por parásitos tripanosomátidos del género *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), que se transmiten en forma vectorial a través de la picadura de la hembra de un insecto díptero del grupo de los flebotomíos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Las leishmaniasis representan un serio problema de salud pública en el mundo (PAHO/WHO, 2023), y se reportan, entre las enfermedades tropicales desatendidas, como las de mayor aumento en prevalencia entre 1990 y 2016 (Hotez, 2018). Brasil, Paraguay y Argentina están clasificados como países con escenarios de transmisión de LV en expansión (PAHO, 2023).

El género *Leishmania* en humanos causan tres tipos de enfermedad diferentes según las manifestaciones clínicas que se presenten: leishmaniasis visceral (LV), y leishmaniasis tegumentaria (LT), esta última incluye a la leishmaniasis cutánea (LC) y la leishmaniasis mucocutánea. La LV es la forma más grave, afecta en forma sistémica a diferentes órganos, usualmente se produce hepato y esplenomegalia, y cuando las manifestaciones son polisintomáticas la enfermedad puede ser fatal en el 90% de los casos humanos si no se trata adecuadamente, especialmente en niños. En América Latina la tasa de letalidad promedio es del 8% (PAHO, 2023). En la LT se producen lesiones, que pueden resolverse en tiempos variables, persistir, provocar recidivas en el tiempo, o una leishmaniasis mucocutánea. Esta enfermedad produce un alto costo social, ya que las personas que no reciben el tratamiento adecuado pueden llegar a tener lesiones mutilantes que afectan su vida social y su capacidad productiva (Salomón y Quintana, 2022).

3.1.1- Ciclo de vida

El género *Leishmania* presenta una forma extracelular flagelada o promastigote (en el hospedador invertebrado), y una forma aflagelada o amastigote de vida intracelular (en el hospedador vertebrado). En la Figura 3.1 está representado el ciclo de vida, en donde

se pueden observar las distintas formas del parásito en cada etapa del ciclo. En el tracto digestivo del hospedador invertebrado ocurre el proceso de metacilogénesis, en el que los amastigotes, provenientes del hospedador vertebrado, se transforman en promastigotes procíclicos y luego en promastigotes metacíclicos, que es la forma altamente infectiva del parásito, capaz de sobrevivir al ingresar al hospedador vertebrado. Los promastigotes infectan a macrófagos y se transforman en amastigotes que se dividirán por mitosis dentro de la célula infectada, infectando luego nuevas células, y quedando disponibles para ser transmitidos al insecto vector. El proceso de metacilogénesis involucra la expresión de ciertas proteínas que son las responsables de la especificidad de la interacción parásito-vector (Sacks y col., 2001; Akhouni y col., 2016).

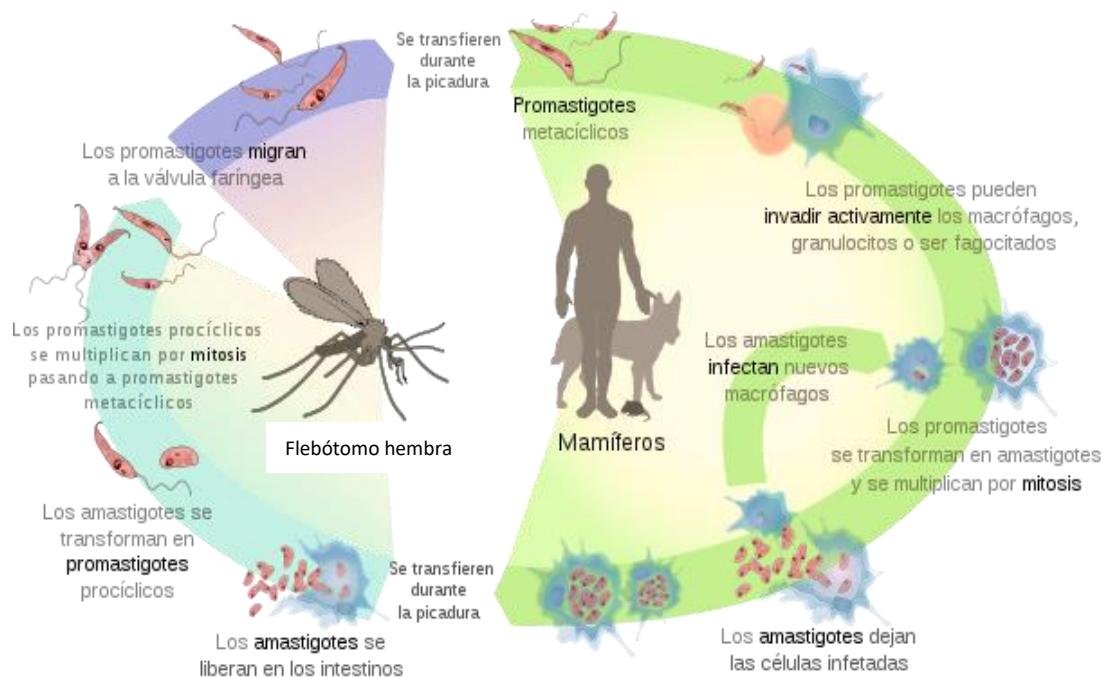


Figura 3.1- Ciclo de transmisión de las leishmaniasis (adaptación de imagen de Mariana Ruiz Villareal: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Leishmaniasis_life_cycle_diagram_en.svg).

3.1.2- Los vectores

La transmisión de *Leishmania* spp. es determinada por interacciones entre el insecto vector, el parásito y el animal hospedador reservorio. La transmisión al hospedador mamífero se da a partir de la picadura de una hembra de flebótomo infectada con

Leishmania sp. específica de su interacción parásito-vector. Muchas especies de insectos de la subfamilia Phlebotominae están involucrados como vectores de *Leishmania* spp.

Los flebótomos son encontrados en diversos ecosistemas de nuestro país incluyendo la selva húmeda y seca chaqueña, la selva en galería, la selva paranaense y las yungas. En estos bosques, el estrato vertical se extiende desde el suelo hasta la copa de los árboles, y esta última puede ser un hábitat diferente con componentes físicos y biológicos diferentes (Cortez y col., 2007). En nuestros sitios de estudio, las copas de los árboles están principalmente habitados por los monos aulladores.

Los flebótomos miden entre 2 y 3 mm en estado adulto, la duración de su ciclo de vida es de aproximadamente 45 días, dependiendo de la especie, de los recursos disponibles y de las condiciones de humedad y temperatura en el ambiente y el sustrato (Rangel y col., 1986; Escovar y col., 2004). El ciclo de vida se completa en la tierra, los huevos son puestos en tierra húmeda o materia orgánica no anegada en condiciones de sombra; se desarrollan las larvas que pasan por tres mudas (I-IV) antes de pasar a pupa, de la que emergirá el adulto (Figura 3.2).

Los adultos se alimentan del néctar de las flores, frutos y otros azúcares vegetales. Las hembras además se alimentan de sangre, lo que les permite ser parte del ciclo de transmisión de *Leishmania*. En la mayoría de las especies requieren de al menos una ingesta para desarrollar los huevos (Sherlock y col., 2003). Algunas especies de flebótomos se alimentan específicamente de una especie de vertebrado, pero usualmente son generalistas, pudiendo alimentarse de varias especies de mamíferos (Sherlock y col., 2003). El radio de vuelo de los adultos está condicionado por la oferta y distribución de fuentes de alimento. Generalmente se encuentran activos al atardecer y al amanecer. Normalmente no vuelan más de 200 metros (Salomón, 2005), con un promedio de 60 metros (Kondratieff y col., 2005), y las especies asociadas a ambientes antropizados presentan mayor radio de vuelo que las asociadas a ambientes silvestres (Sherlock y col., 2003; Kondratieff y col., 2005). Entre los estímulos que atraen a los flebótomos hasta su hospedador, se ha descrito la temperatura y el olor corporal (Sherlock y col., 2003).

Durante el día los flebótomos se refugian en sitios oscuros, relativamente frescos respecto al ambiente externo, húmedos y templados, donde no ocurran cambios bruscos

en las condiciones ambientales, como por ejemplo cuevas de animales o huecos de árboles (Sherlock y col., 2003; Salomón, 2005), y para las especies más antrópicas sus refugios se encuentran generalmente dentro de los límites del peridomicilio, en corrales de animales, como chiqueros y gallineros (Sherlock y col., 2003).

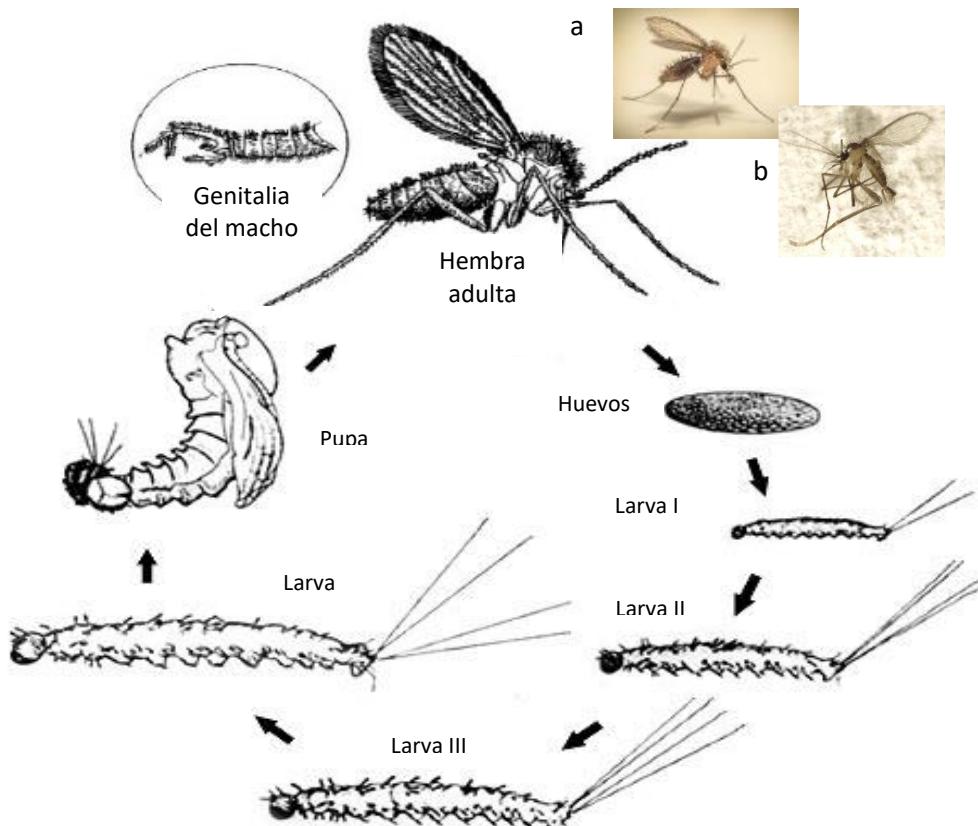


Figura 3.2- Ciclo de vida de los flebótomos, gráfico adaptado a partir de imagen en: <http://www.infectionlandscapes.org/2011/05/leishmaniasis.html>. a) Hembra adulta hematófaga; y b) macho adulto de *Lu. longipalpis* en lupa binocular (Moya, 2022). Rangos de longitud (tamaño real): adultos <5mm; huevos 0,3mm longitud-0,10mm ancho; larvas 0,4 a 0,7mm y pupas 2,5 a 2,8mm.

En América latina, *Lu. longipalpis* es el principal vector de *L. (L.) infantum*, parásito causante de la LV en ambientes urbanos (Acardi y col., 2010). La LT es principalmente causada por *L. (V.) braziliensis* (Vianna, 1911), y sus vectores principales, en el cono sur, son *Nyssomyia neivai*, *Ny. whitmani* (Antunes y Coutinho, 1939) y *Migonemyia migonei* (Salomón y col., 2004; Pita Pereira y col., 2005). En *Ny. neivai* y *Ny. whitmani* se registró la

presencia de ADN de *Leishmania*, y *Mg. migonei* fue propuesta como un posible vínculo entre los ciclos zoonóticos y antropozoonóticos de la LT (Santini y col., 2013).

Numerosas especies de flebótomos que son vectores confirmados o potenciales vectores de *Leishmania* spp., han sido registrados en las provincias de Corrientes y Chaco, incluidos *Lu. longipalpis*, *Ny. neivai*, *Mg. migonei* y *Pintomyia pessoai* (Countinho & Barretto, 1940), entre otros (Bejarano & Duret, 1950; Salomón y col., 2008b; 2009b; 2011a,b; Rosa y col., 2010; Szelag y col., 2018a; Moya y col., 2022). Salomón y col. (2011a) reportó la presencia de *Ny. neivai* y *Mg. migonei* en ambientes peridomésticos cercanos a sitios de descanso de monos aulladores silvestres y a espacios de cuarentena de osos hormigueros (*Myrmecophaga tridactyla*) en los alrededores de la Estación Biológica Corrientes (EBCo) donde fueron realizados estos estudios.

3.1.3- Leishmaniasis en Argentina

Así como las leishmaniasis presentan diferentes características clínicas, también tienen diferentes características ecológicas, como los agentes etiológicos que las causan, los vectores que las transmiten, los reservorios y sus escenarios de transmisión. En nuestro país la LV es causada principalmente por *L. (L.) infantum*, y transmitida principalmente por el flebótomo *Lu. longipalpis*, su escenario de transmisión es generalmente de características urbanas, y su principal reservorio es el perro doméstico (Acardi y col. 2010; Salomón y col., 2008a). La LC es causada principalmente por *L. (V.) braziliensis*, transmitida por *Ny. neivai* en espacios peri-domésticos en áreas endémicas del país, y por *Ny. whitmani* en paisajes silvestres de la región noreste (Córdoba-Lanús y col., 2006; Salomón y col., 2004; Salomón y col., 2009a; Salomón y col. 2016; Moya y col., 2022).

Respecto a las *Leishmania* spp. registradas en nuestro país, *L. (V.) braziliensis* y *L. (L.) infantum* son frecuentemente reportadas, mientras que *L. (L.) amazonensis*, *Le. guyanensis* y *Le. panamensis* solo se hallan como agentes causantes de las leishmaniasis ocasionalmente (Córdoba Lanús y col., 2005; Cuba y col., 1996; Frank y col., 2003; Marco y col., 2012; Segura y col., 2000; Salomón y col., 2016).

El noreste argentino puede ser considerado como la región marginal para la presencia de las leishmaniasis. El primer foco urbano autóctono de LV causado por *L. (L.) infantum* y que involucró como vector a *Lu. longipalpis* en Argentina fue reportado en 2006 en la

ciudad de Posadas, provincia de Misiones (Salomón y col., 2008a). Durante el año 2007 emergió otro foco de LV en el centro-norte del país, aunque en este caso *Mg. migonei* fue la especie sugerida como vector de *L. (L.) infantum* (Salomón y col., 2010). La LC ha sido endémica en Argentina al menos desde las primeras décadas del siglo veinte, sin embargo, el primer brote reportado en el país ocurrió desde 1985 a 1987 en la región noroeste del país (Salomón y col., 2011c).

En la región noreste, se registraron brotes de LC en varias localidades de la provincia de Corrientes, como en Bella Vista en 2003 (Salomón y col., 2006), en Riachuelo y en la ciudad de Corrientes en 2015 (Acosta-Soto y col., 2020; Andreo y col., 2022). En la provincia de Corrientes la media de número de casos humanos reportados anualmente por el Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud (SNVS) para LC y LV humana en el periodo 2010-2016 fue de $115,4 \pm 42,3$ y $16,0 \pm 7,9$ casos por año, respectivamente. Asimismo, en el 2008 se reportó por primera vez la presencia de *Lu. Longipalpis* en la ciudad de Corrientes, y en otras localidades de la provincia (Salomón y col., 2009b), desde entonces, la abundancia relativa de *Lu. longipalpis* se sigue incrementando (Berrozpe y col., 2017), y desde el año 2010 hasta la fecha los casos humanos de LV aparecen y se propagan como una enfermedad urbana de manera dispersa en el tiempo y el espacio (Salomón y col., 2015; Bruhn y col., 2018). Respecto a la provincia de Chaco, se mantiene una alta incidencia de brotes de LC, con un ciclo peridoméstico zoonótico sinantrópico que se activa esporádicamente, siendo *Ny. neivai* y *Ny. whitmani* las especies más abundantes en estos ambientes (Salomón y col., 2008b; Moya y col., 2022). Por otro lado, *Lu. longipalpis* se registró en la provincia de Chaco (Salomón y col., 2011b), y en localidades sobre el río Paraná cercanas a nuestros sitios de estudio (Szelag y col., 2014; Moya y col., 2022).

3.1.4- *Leishmania* y primates no humanos

El género *Leishmania* puede infectar naturalmente a un amplio rango de especies de mamíferos, como perros, zorros, roedores, equinos, marsupiales y primates no humanos (Lainson y col., 1989; Malta y col., 2010; Humberg y col., 2012; Acardi y col., 2013; Fernández y col., 2018; De Oliveira y col., 2020); y algunos de estos, como varias especies de roedores, perezosos, osos hormiguero, puercoespines y carnívoros salvajes están registrados como los reservorios selváticos más probables para *Leishmania*, por lo que es probable que los ciclos selváticos sean mantenidos por un ensamble de especies de

mamíferos hospedadores (Roque y Jansen, 2014). Por otro lado, para algunas especies, como es el caso de *L. (L.) infantum*, es conocido que su principal reservorio en áreas urbanas es el perro doméstico y su vector más importante es *Lu. longipalpis*, entonces en algunos casos ya conocemos el reservorio de una especie en un escenario de transmisión particular (Grimaldi y Tesh, 1993). Retomando la definición de reservorios, estos son los mamíferos que mantienen al parásito presente en la naturaleza con una carga parasitaria suficiente para que pueda ser transmitida efectivamente al vector (Haydon y col., 2002).

Los primates no humanos platirrinos y catarrinos han sido propuestos como reservorios en diferentes áreas endémicas del mundo; y los casos de infección natural hallados en primates platirrinos son más frecuentes que los hallados en monos catarrinos (Santos y Oliveira, 2020). En la Tabla 3.1 se pueden observar los registros de infección por *Leishmania* spp. encontrados hasta el momento en primates platirrinos.

Especie hospedadora	Especie de <i>Leishmania</i>	Hábitat	Método diagnóstico	País	Referencia
<i>Saguinus geoffroyi</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	Vida libre	Aislamiento	Panamá	Herrer y col., 1973
<i>Aotus trivirgatus</i>	<i>L. (V) braziliensis</i>	Vida libre	Aislamiento	Panamá	Herrer y Christensen, 1976
<i>Chiropotes satanas</i>	<i>L. (V) shawi</i>	Vida libre	Aislamiento	Brasil	Lainson y col., 1989
<i>Sapajus apella</i>	<i>L. (V) shawi</i>	Vida libre	Aislamiento	Brasil	Lainson y col., 1989
<i>Cebus xanthosternos</i>	<i>L. (L.) infantum</i>	Cautiverio	PCR (sangre)	Brasil	Malta y col., 2010
<i>Callicebus nigrifrons</i>	<i>L. (L.) infantum</i>	Cautiverio	Inmuno-histoquímica y PCR (tejido)	Brasil	Malta y col., 2010
<i>Alouatta guariba</i>	<i>L. (L.) infantum</i>	Cautiverio	PCR (sangre)	Brasil	Malta y col., 2010
<i>Leontopithecus crysomelas</i>	<i>L. (L.) infantum</i>	Cautiverio	PCR (sangre)	Brasil	Malta y col., 2010
<i>Pithecia irrorata</i>	<i>L. (L.) infantum</i>	Cautiverio	PCR (sangre)	Brasil	Malta y col., 2010
<i>Saguinus imperator</i>	<i>L. (L.) infantum</i>	Cautiverio	PCR (sangre)	Brasil	Malta y col., 2010
<i>Aotus nigriceps</i>	<i>L. (L.) infantum</i>	Cautiverio	PCR (sangre)	Brasil	Malta y col., 2010
<i>Aotus azarae</i>	<i>L. (Viannia) sp.</i>	Vida libre	PCR/RFLP (sangre)	Argentina	Acardi y col., 2013

<i>Alouatta pigra</i> y <i>Alouatta palliata</i>	<i>L. (L.) mexicana</i>	Semi-cautiverio	Serología	México	Rovirosa Hernández y col., 2013
<i>Ateles paniscus</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	Cautiverio	PCR y qPCR (sangre)	Brasil	Felix de Lima y col., 2012
<i>Alouatta guariba</i>	<i>L. (L) infantum</i>	Cautiverio	PCR (sangre)	Brasil	Lombardi y col., 2014
<i>Callithrix sp.</i>	<i>Leishmania sp.</i>	Vida libre	PCR (sangre)	Brasil	Trüeb y col., 2018
<i>Callithrix penicillata</i>	<i>L. (L) infantum</i>	Vida libre	Serología y PCR (sangre y piel)	Brasil	Paiz y col., 2019
<i>Callithrix jacchus</i>	<i>L. (L) infantum</i>	Vida libre	Serología y PCR (sangre y piel)	Brasil	Paiz y col., 2019
<i>Sapajus apella</i>	<i>L. (L) infantum</i>	Cautiverio	Serología y xenodiagnóstico	Brasil	Rodriguez de Oliveira y col., 2019
<i>Leontopithecus rosalia</i>	<i>L. (L) infantum</i>	Cautiverio	Serología y xenodiagnóstico	Brasil	Rodriguez de Oliveira y col., 2019
<i>A. seniculus</i>	<i>L. (L) infantum</i>	Vida libre	Serología y PCR (sangre)	Guayana Francesa	Medkour y col., 2019
<i>A. seniculus</i>	<i>L. (V) guyanensis</i>	Vida libre	Serología y PCR (sangre)	Guayana Francesa	Medkour y col., 2019
<i>Plecturocebus vieirai</i>	<i>L. (L) infantum</i>	Cautiverio	PCR	Brasil	Guiraldi y col., 2022
<i>Alouatta caraya</i>	<i>L. (V) braziliensis</i>	Cautiverio	PCR	Brasil	Guiraldi y col., 2022
<i>Ateles chamek</i>	<i>L. (V) braziliensis</i>	Cautiverio	PCR	Brasil	Guiraldi y col., 2022

Tabla 3.1. Especies de primates no humano neotropicales que se han registrado con infección por alguna especie de *Leishmania* (datos basados en Roque y col. (2014) y Santos y Oliveira (2020)).

3.1.5- Objetivos e hipótesis

La leishmaniasis cutánea es endémica en varias provincias del norte de la Argentina, y la leishmaniasis visceral presenta un marcado aumento de los casos entre el 2006 y la actualidad en el noreste argentino. Los componentes del ciclo de transmisión de las leishmaniasis en los ambientes silvestres aún quedan por esclarecerse en nuestro país. Asimismo, no hay estudios de infección por *Leishmania* sp. en las poblaciones de monos aulladores en vida libre en la Argentina.

El objetivo general de este estudio es evaluar el rol potencial de *Alouatta caraya* en el ciclo de transmisión silvestre de *L. (L.) infantum* y *L. (V.) braziliensis* en ambientes antropizados del Noreste argentino.

A partir de los antecedentes planteamos las siguientes **hipótesis**: 1) Los monos aulladores que habitan en vida libre en los fragmentos de bosque del noreste argentino están infectados por *L. (L.) infantum* y *L. (V.) braziliensis*. 2) La presencia conjunta de monos aulladores infectados y flebótomos vectores de *L. (L.) infantum* y *L. (V.) braziliensis* posibilita la permanencia del ciclo de transmisión de dichos parásitos en los fragmentos de bosque natural del noreste argentino.

Objetivos específicos:

- Determinar la prevalencia de infección por *Leishmania* spp. en poblaciones de *A. caraya* en vida libre que habitan en paisajes con diferente grado de urbanización del noreste argentino.
- Realizar la caracterización molecular de las especies de *Leishmania* spp. halladas en los monos aulladores estudiados.
- Estudiar la asociación entre las prevalencias halladas y el grado de urbanización de los sitios de estudio.
- Identificar las especies de flebótomos que se encuentran asociadas a los árboles dormideros, y estimar sus abundancias en las bases y en las copas de los árboles dormideros de los monos.

3.2 - Metodología

3.2.1- Descripción de los sitios de estudio:

Los sitios de estudio son los mismos ya mencionados y descriptos en la sección 2.2.1: Isla del Cerrito (**IC**) ($27^{\circ} 18' S$ - $58^{\circ} 37' O$), Isla Brasilera (**IB**) ($27^{\circ} 20' S$ - $58^{\circ} 40' O$), San Cayetano (**SC**) ($27^{\circ} 34' S$, $58^{\circ} 42' O$), y Parque Provincial San Cayetano (**PPSC**) ($27^{\circ} 30' S$, $58^{\circ} 41' O$) (donde se encuentra la Estación Biológica Corrientes (EBCo)) (ver Figura 2.13 en el capítulo anterior); y en esta parte del estudio se agrega la localidad de Riachuelo (**R**) ($27^{\circ} 35' S$, $58^{\circ} 44,5' O$), a 3 km del casco urbano de SC, donde se llevaron a cabo capturas de flebótomos en unidades domésticas. Riachuelo presenta características de urbanización similares a SC, pero con algunas calles asfaltadas, y el Municipio de Riachuelo abarca el paraje San Cayetano (Figura 3.8). Respecto de las categorías ambientales, la localidad de Riachuelo pertenece a la categoría “rurubano”, como el casco urbano de SC. Estos sitios aún mantienen características rurales, como la cría de ganado (en los casos que tienen lotes grandes), huertas familiares, producción de huevos y/o cría de pollos en el caso de los productores más pequeños; y como en SC se encuentran cercanos o vecinos a parches de bosque remanente habitados por *A. caraya*.

3.2.2- Colecta de muestras biológicas:

En la sección 2.2.3 se describieron los procedimientos para la captura y liberación de los animales (109 monos aulladores), los cuales fueron capturados con dardos anestésicos y liberados al recuperarse de la anestesia. Además de las muestras colectadas para el diagnóstico de *Trypanosoma cruzi*, se les extrajo una muestra del pabellón auricular para la búsqueda de *Leishmania*. Se colectó una pieza de aproximadamente 2 mm por 2 mm de tejido del borde del pabellón auricular externo; la forma y posición del corte en la oreja fue también utilizado como marca de identificación del individuo (además de colocaron pequeñas caravanas metálicas numeradas en la oreja de cada animal), esta muestra fue conservada en buffer PBS (Buffer Fosfato Salino), mantenida en frío en campo, y luego en freezer a $-20^{\circ}C$ hasta su posterior análisis en el laboratorio.

3.2.3- Caracterización molecular de la infección por *Leishmania* en *Alouatta caraya*:

Las muestras fueron procesadas extrayendo el ADN y aplicando protocolos de PCR específicos para la detección de leishmanias de interés sanitario como *L. (V.) braziliensis* y *L. (L.) infantum*. Los fragmentos de ADN compatibles con *Leishmania* spp. fueron confirmados por análisis de secuenciación.

- **Extracción de ADN:** La extracción de ADN de las muestras de tejido auricular externo se llevó a cabo mediante columnas de extracción comerciales (Inbio Highway® ADN Puriprep-S), según el protocolo sugerido por el fabricante.

- **Reacciones de amplificación por PCR:** Las muestras de ADN fueron analizadas utilizando el procedimiento de PCR convencional dirigido a amplificar la región del espaciador transcrita interno del ADN ribosomal (ribosomal internal transcribed spacer (ITS)), cuyo protocolo se denomina ITS-1. La reacción de amplificación utiliza los oligonucleótidos iniciadores LITSR (5'-CTGGATCATTTCGATG-3') y L5.8S (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3') (El Tai y col., 2000), y se espera obtener un fragmento de ADN de 300-350 pb con las condiciones de ciclado reportadas por Schönian y col. (2003). Se utilizó una cepa de referencia de *L. (V.) braziliensis* (HOM/BR75M2903) como control positivo de la reacción, y agua estéril como control negativo. Los productos amplificados fueron revelados por electroforesis en geles de agarosa al 2% conteniendo SyberGreen® (Invitrogen™), utilizando un marcador de peso molecular de 1 Kb.

Para evaluar la eficacia de la extracción del ADN de las muestras, se les practicó un protocolo de PCR dirigido a la región del ADN mitocondrial que codifica para el gen del citocromo B (CytB), con los oligonucleótidos iniciadores L14841 (5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3') y H15149 (5'-CCCCTCAGAATGATATTGTCCTCA-3'), amplificando un fragmento esperado de 359 pb (Lah y col., 2012).

Los fragmentos obtenidos de tamaño compatible con los esperados para *L. (V.) braziliensis* fueron analizados por RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) con la enzima de restricción *Hae III* (5'-GGCC-3' Promega), y los fragmentos resultantes fueron revelados por electroforesis en gel de agarosa 2,5%.

Para el análisis por secuenciación, los productos de PCR compatibles con *Leishmania* spp. fueron purificados utilizando las columnas comerciales *Inbio Highway® ADN Puriprep-GP* siguiendo las indicaciones del fabricante. En los casos en los que se obtuvieron fragmentos inespecíficos, los fragmentos de interés fueron separados cortando el gel bajo visualización con transiluminador, y cada fragmento inmerso en agarosa fue purificado utilizando las mismas columnas comerciales de *Inbio Highway® ADN Puriprep-GP* siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuenciación se llevó a cabo utilizando los oligonucleótidos iniciadores respectivos en las concentraciones indicadas por el sitio de procesamiento (Cromática, Argentina). Los cromatogramas obtenidos se analizaron con el programa *Codon Code Aligner™* (v 3.0.1) (CodonCode Corporation, Dedham, Massachusetts, USA) y el programa *BioEdit Sequence Alignment Editor©* versión 7.2.6 (Hall, 1999). Para el alineamiento de las secuencias se utilizó el algoritmo ClustalW (Thompson y col., 1994) del programa MEGA 10.0.5 (Kumar y col., 2018) y del programa *BioEdit Sequence Alignment Editor©*. Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias disponibles en la base de datos *GenBank* con el programa de alineamiento *BLAST* en el sitio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

3.2.4- Muestreo de flobótomos en árboles dormideros de *A. caraya* y en ambientes peridomésticos

Las capturas de flebótomos se realizaron asociadas a parte de los grupos de monos aulladores estudiados para el diagnóstico de tripanosomátidos. Las trampas fueron colocadas en los árboles dormidero (AD), seleccionando un árbol por grupo de monos como se describió en la sección 2.2.2. Además, se colocaron trampas en los peridomicilios ubicados en los cascos urbanos de SC y R. Se utilizaron trampas de luz negra ("trampas REDILA") (Fernández y col., 2015) que se activaron aproximadamente desde las 19hs hasta las 9hs del día siguiente, durante dos noches consecutivas en cada punto de muestreo (Figura 3.4). En el Anexo 4 se encuentra adjunta la planilla para la colecta de datos ambientales.

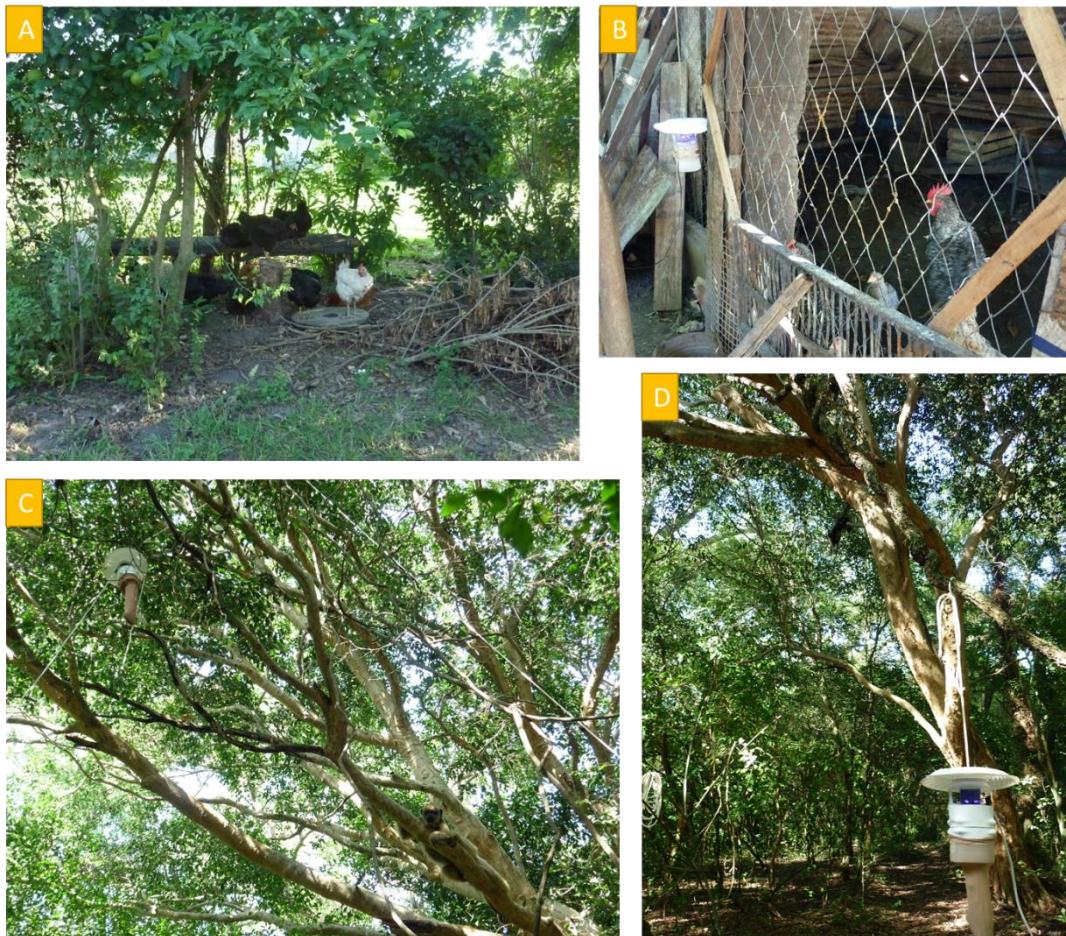


Figura 3.4. Sitios de colocación de las trampas de luz negra. A) Árbol donde duermen gallinas en peridomicilio. B) Gallinero. C) Trampa de luz colocada en el estrato alto de un árbol dormidero de monos (AD), donde se observa a una mona adulta descansando. D) Trampa colocada en el estrato bajo de un AD.

En los AD de los monos las trampas se instalaron en dos estratos de altura diferente: a 1,5m (estrato bajo) (Figura 3.4D) y entre 5 y 8m (estrato alto) (Figura 3.4C), resultando activas dos trampas por sitio por noche durante dos noches consecutivas.

En los sitios rururbanos se dividió la localidad en una grilla de celdas de 200m x 200m para abarcar toda la extensión del área. En cada celda se seleccionó una vivienda utilizando el criterio de “sitio crítico”, una definición operacional que define al sitio con mayor probabilidad de hallar flebótomos como consecuencia de sus características ambientales (Fernández y col., 2010). Teniendo en cuenta este criterio, se estudió la presencia de flebótomos en los siguientes micrositios: gallineros, árboles dormideros de gallinas, y sitios del peridomicilio donde dormían los perros de la casa. Las trampas fueron colocadas en estos micrositios, dando prioridad a los dormideros de gallinas y si no había

gallinas en la casa entonces se colocaban en el sitio donde dormían los perros. En estos sitios todas las trampas fueron colocadas a una altura aproximada de 1,5m durante dos noches consecutivas (Figura 3.4B).

Los muestreos en peridomicilios se realizaron entre el 3 y el 6 de diciembre de 2011. En los AD de los monos aulladores del PPSC y SC entre el 13 y el 16 de febrero de 2012, y en los AD de la IB entre el 22 y el 26 de marzo de 2012. Todos los sitios de muestreo fueron georreferenciados.

Los flebótomos capturados fueron conservados a -20°C hasta su procesamiento. Los individuos fueron clarificados con lacto-fenol, observados bajo microscopio óptico, y clasificados por especie de acuerdo a la clave de Galati (2003). Se contabilizaron todos los individuos capturados, y se obtuvieron las abundancias de cada especie y sexo en cada punto de muestreo.

Los individuos de las especies de *Brumptomyia* (França & Parrot, 1921) se unificaron como *Brumptomyia* sp. dado que las hembras de este género no pudieron distinguirse morfológicamente y es un género que carece de importancia sanitaria. Asimismo, las hembras de las especies *Evandromyia cortelezzii* (Brethes, 1923) y *Ev. sallesi* (Galvão & Coutinho, 1939) no pueden distinguirse por su morfología, entonces estos individuos fueron clasificados como complejo Cortelezzii (Szelag y col., 2018b).

3.2.5- Análisis de datos

Se estimaron las prevalencias de infección en los monos con intervalos de confianza del 95 % (IC) para cada especie de *Leishmania* hallada y en cada sitio evaluado.

La abundancia de flebótomos se estimó por especie y por sexo, acumulando los individuos capturados durante las dos noches de muestreo. En los peri-domicilios se evaluó la asociación entre el tipo de micrositio (gallineros, sitio donde duermen los perros, árbol donde duermen las gallinas) y la presencia de flebótomos mediante la prueba de independencia de Chi cuadrado (χ^2). En los AD de los monos aulladores se evaluó si había diferencias respecto a la abundancia de flebótomos entre los dos estratos verticales (bajo y alto) aplicando la prueba de Wilcoxon para muestras pareadas. La asociación entre las especies de flebótomos presentes y los ambientes estudiados (rururano, rural, y remoto) se evaluó mediante la prueba de χ^2 , diagrama de perfiles multivariados, y análisis de correspondencias simple (ACS) (Benzécri, 1973). En todos los casos, un *p*-valor menor a

0,05 fue considerado estadísticamente significativo. Los datos fueron procesados utilizando el programa Info Stat (Di Rienzo y col., 2008).

3.3 - Resultados:

En la sección 2.3.1 del capítulo anterior se describieron las características de los monos aulladores capturados, y en la Tabla 2.3 los datos y las características de los grupos de monos, las edades y el sexo de los individuos. Uno de los 109 animales capturados se encontraba en condiciones de salud desfavorables, por lo que se decidió no extraer la muestra de oreja de este individuo. Entonces se colectaron un total de 108 muestras para el diagnóstico de leishmaniasis (Tabla 3.2).

Sitio	Nº de grupos	Nº de indiv.	Promedio N° indiv. capturado por grupo (D.E.)	Razón de sexos (macho/hembra)	Categoría de edad		
					adulto	subadulto	juvenil
Rururbano_IC	1	2	2 (0)	(1:1) 1	2	0	0
Rururbano_SC	6	19	3,2 (1,2)	(12:7) 1,7	13	5	1
Rural	10	38	3,8 (2)	(22:16) 1,4	14	13	10
Remoto	15	49	3,3 (1,5)	(30:19) 1,6	30	10	9
Total	32	108	-	(65:43) 1,5	59	28	21

Tabla 3.2. Características de las poblaciones de monos aulladores muestreadas.

3.3.1- Caracterización molecular de la infección por *Leishmania* en *Alouatta caraya*

Nueve monos aulladores (8,3%) resultaron positivos para la presencia de leishmaniasis, y el análisis por RFLP (Figura 3.5) y el de secuenciación revelaron la presencia de *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) infantum* y *L. (L.) amazonensis* en los sitios de estudio (Tabla 3.3).

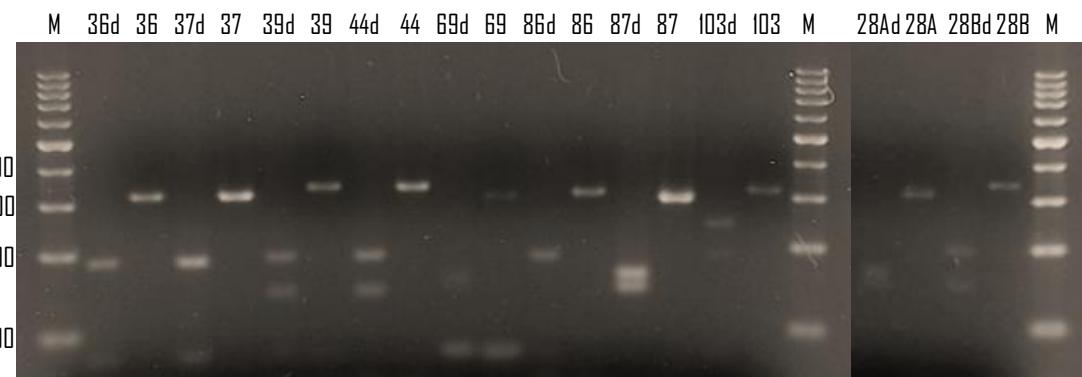


Figura 3.5. Gel de agarosa (2%) donde se observan los fragmentos amplificados de ITS-1 y el patrón polimórfico de los productos de la restricción con *HaeIII*. Las muestras están indicadas con su número de ID, y los productos de PCR digeridos por *HaeIII* con la letra “d”. M: marcador molecular de ADN de 1 kb. El tamaño de los fragmentos es indicado a la izquierda en pares de bases.

ID	Ambiente	Grupo de monos	Sexo	Categoría etaria	ITS-1 PCR-RFLP (perfil de pb aproximado) - Especie de <i>Leishmania</i>	BLAST
MO-69	Remoto	Gringos	M	Adulto	(156 - 143) - <i>L. (V.) braziliensis</i>	-
MO-86	Remoto	Quebracho	F	Subadulto	(184 - 72 - 55) - <i>L. (L.) infantum</i>	<i>L. (L.) infantum</i>
MO-87	Remoto	Maminos	F	Adulto	(156 - 143) - <i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
MO-103	Remoto	10 Mangos	F	Adulto	(184 - 250) -	<i>L. (L.) infantum</i>
MO-28	Rural	Quitilina	M	Juvenil	A: (156 - 143) - <i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
					B: (186 - 142) - <i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>
MO-44	Rural	Chupali	M	Adulto	(186 - 142) - <i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>
MO-36	Rururbano	Musculoso	M	Subadulto	(184 - 72 - 55) - <i>L. (L.) infantum</i>	<i>L. (L.) infantum</i>
MO-37	Rururbano	Musculoso	M	Adulto	(184 - 72 - 55) - <i>L. (L.) infantum</i>	<i>L. (L.) infantum</i>
MO-39	Rururbano	Otero	F	Adulto	(186 - 142) - <i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>

Tabla 3.3. Resumen de resultados obtenidos del diagnóstico por PCR ITS-1, RFLP y análisis de secuencias de las muestras de tejido auricular externo de los monos aulladores positivos muestreados entre julio y agosto de 2010, en San Cayetano (ambientes rural y rururbano), provincia de Corrientes, e Isla Brasilera (ambiente remoto), provincia de Chaco.

Los valores de las prevalencias halladas para cada protozoo fueron bajas, y no fueron suficientes para analizar estadísticamente la independencia con las variables planteadas como el grado de antropización del ambiente, el grupo etario y el sexo de los individuos. Se obtuvieron resultados de infección por *Leishmania* sp. en los tres grupos etarios y para

ambos sexos (Tabla 3.3). En los tres ambientes estudiados encontramos animales infectados con alguna de las tres especies detectadas, en el ambiente remoto se registró *L. (L.) infantum* y *L. (V.) braziliensis*, en el ambiente rururbano *L. (L.) infantum* y *L. (L.) amazonensis*, y en el ambiente rural *L. (V.) braziliensis* y *L. (L.) amazonensis* (Figura 3.6). Los ambientes rural y rururbano que se encuentran conectados comparten la presencia de *L. (L.) amazonensis*, sin embargo, en el ambiente remoto (IB) no se registró esta especie, y en los grupos rurales no se registró a *L. (L.) infantum*. Cabe destacar que los animales positivos fueron detectados en grupos diferentes: en el ambiente remoto se detectó infección en 4 individuos de 4 grupos distintos, los 2 individuos del paisaje rural pertenecen a dos grupos diferentes, y en el paisaje rururano fueron 3 animales de 2 grupos cercanos (Figura 3.6).

Sitio		Nro. grupos +/ examinados	Nro. monos +/ examinados	Prevalencia (%) [IC 95%]
	Especie de <i>Leishmania</i>			
Rururbano_IC				
	<i>L. (L.) infantum</i>	0/1	0/2	-
	<i>L. (V.) braziliensis</i>	0/1	0/2	-
	<i>L. (L.) amazonensis</i>	0/1	0/2	-
Remoto_IB				
	<i>L. (L.) infantum</i>	2/15	2/49	4,1 [0,5 - 14]
	<i>L. (V.) braziliensis</i>	2/15	2/49	4,1 [0,5 - 14]
	<i>L. (L.) amazonensis</i>	0/15	0/49	-
Rururbano_SC				
	<i>L. (L.) infantum</i>	1/6	2/19	10,5 [1,3 - 33,1]
	<i>L. (V.) braziliensis</i>	0/6	0/19	-
	<i>L. (L.) amazonensis</i>	1/6	1/19	5,3 [0,1 - 26]
Rural_PPSC				
	<i>L. (L.) infantum</i>	0/10	0/38	-
	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1/10	1/38	2,6 [0,07 - 13,8]
	<i>L. (L.) amazonensis</i>	2/10	2/38	5,3 [0,6 - 17,75]
Total				
	<i>L. (L.) infantum</i>	3/32	4/108	3,7 [0,1 - 7,3]
	<i>L. (V.) braziliensis</i>	3/32	3/108	2,8 [-0,3 - 5,9]
	<i>L. (L.) amazonensis</i>	3/32	3/108	2,8 [-0,3 - 5,9]

Tabla 3.4. Prevalencias de infección obtenidas de la PCR para ITS-1. Las prevalencias son expresadas como porcentajes, con un intervalo de confianza del 95%.

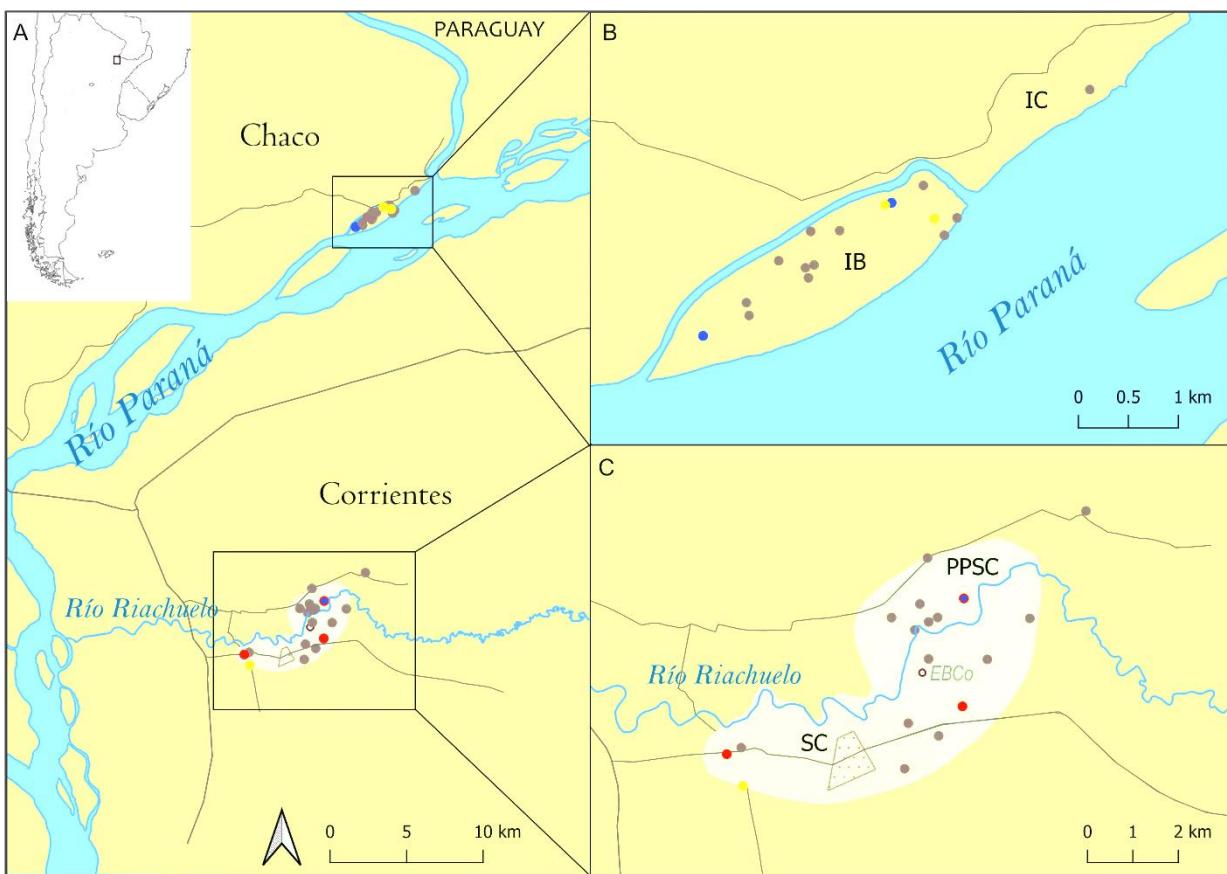


Figura 3.6. Resultados del diagnóstico de *Leishmania* para los grupos de monos (con al menos un individuo con resultado positivo): detección de *L. (V.) braziliensis* (círculo azul); detección de *L. (L.) amazonensis* (círculos rojos); detección de *L. (L.) infantum* (círculos amarillos). Se observa con un círculo azul de borde rojo el grupo “Quitilina” en el que se halló el individuo con infección mixta entre *L. (V.) braziliensis* y *L. (L.) amazonensis*.

El análisis de las secuencias de las muestras positivas confirmó los resultados obtenidos por RFLP, excepto para la muestra MO-69 que presentó un perfil de bandas compatible con *L. (V.) braziliensis*, pero el fragmento de ADN no pudo ser secuenciado porque no obtuvimos suficiente cantidad de ADN en el proceso de purificación.

Sequence alignment of Leishmania ribosomal RNA genes across four species and six isolates. The alignment shows nucleotide positions 10-50, 60-100, 110-150, 160-200, and 210-250. Colored dots indicate matching bases between isolates, while dashes represent gaps. Species are color-coded: Le. infantum (blue), Le. amazonensis (red), Le. braziliensis (green), and MO isolates (black).

Species/Isolate	10	20	30	40	50
Le. infantum (MF688836.1)	T C T G G A T C A T T T C C G A T G A T T A C A C C C A A A A A		C A T A T A C A A A		C T
MO-103 (IB)	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
MO-86 (IB)	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
MO-36 (SC)	- - - - -	- - - - -	A	A	- - - - -
MO-37 (SC)	- - - - -	- - - - -	A	A	- - - - -
Le. amazonensis (KP274862.1)	- - - - -	- - - - -	A	- - - - -	A A C T . . .
MO-28B (PPSC)	- - - - -	- - - - -	A	- - - - -	A A C T . . .
MO-44 (PPSC)	- - - - -	- - - - -	A	- - - - -	A A A T . . .
MO-39 (SC)	- - - - -	- - - - -	A	- - - - -	A A A T . . .
Le. braziliensis (MF802822.1)	- - - - -	- - - - -	A	- - - - -	C T C
MO-87 (IB)	- - - - -	- - - - -	A	- - - - -	C T C
MO-28A (PPSC)	- - - - -	- - - - -	A	- - - - -	C T C

Species/Isolate	60	70	80	90	100
Le. infantum (MF688836.1)	C G G G G A G A C C T A T G T A T A T A T A - - -	T G T A G G C C T T T C C C A C A T A C A C A G C A			
MO-103 (IB)	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
MO-86 (IB)	- - - - -	- - - - -	TA	TA	- - - - -
MO-36 (SC)	- - - - -	- - - - -	C T . C G . T A G . C G C C T T . C C . A . . .	- - - - -	- - - - -
MO-37 (SC)	- - - - -	- - - - -	C T . C G . T A G . C G C C T T . C C . A . . .	- - - - -	- - - - -
Le. amazonensis (KP274862.1)	- - - - -	- - - - -	C T . C G . T A G . C G C C T T . C C . A . . .	- - - - -	- - - - -
MO-28B (PPSC)	- - - - -	- - - - -	C T . C G . T A G . C G C C T T . C C . A . . .	- - - - -	- - - - -
MO-44 (PPSC)	- - - - -	- - - - -	C T . C G . T A G . C G C C T T . C C . A . . .	- - - - -	- - - - -
MO-39 (SC)	- - - - -	- - - - -	C T . C G . T A G . C G C C T T . C C . A . . .	- - - - -	- - - - -
Le. braziliensis (MF802822.1)	- - - - -	G T . G . . . T T C T A G C A A C - - - C T T . C C . A . . G . . . G . A T T .	- - - - -	- - - - -	- - - - -
MO-87 (IB)	- - - - -	G T . G . . . T T C T A G C A A C - - - C T T . C C . A . . G . . . G . A T T .	- - - - -	- - - - -	- - - - -
MO-28A (PPSC)	- - - - -	G T . G . . . T T C T A G C A A C - - - C T T . C C . A . . G . . . G . A T T .	- - - - -	- - - - -	- - - - -

Species/Isolate	110	120	130	140	150
Le. infantum (MF688836.1)	A A G T T T T - G T A C T C A A A A - - -	T T T G C A G T A A A - - -	A A A A A G		
MO-103 (IB)	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
MO-86 (IB)	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
MO-36 (SC)	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
MO-37 (SC)	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Le. amazonensis (KP274862.1)	- - - - -	T A C A - - - A C A C A A T .	- - - - -	- - - - -	- - - - -
MO-28B (PPSC)	- - - - -	T A C A - - - A C A C A A T .	- - - - -	- - - - -	- - - - -
MO-44 (PPSC)	- - - - -	T A C A - - - A C A C A A T .	- - - - -	- - - - -	- - - - -
MO-39 (SC)	- - - - -	T A C A - - - A C A C A A T .	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Le. braziliensis (MF802822.1)	- - - - -	C . A . C . A T A . G T G T . T . T A T A T A T A T A G A C A . . A C . T . C A G T A G . . .	- - - - -	- - - - -	- - - - -
MO-87 (IB)	- - - - -	C . A . C . A T A . . T G T . T . T A T A T A T A T A G A C A . . A C . T . C A G T A G . . .	- - - - -	- - - - -	- - - - -
MO-28A (PPSC)	- - - - -	C . A . C . A T A . . T G T G T . T A T A T A T A T A G A C A . . A C . T . C A G T A G . . .	- - - - -	- - - - -	- - - - -

Species/Isolate	160	170	180	190	200
Le. infantum (MF688836.1)	G C C G A T C G A C G T T A T A C C G C A C C G C C - - -	T A T A C A A A A G C A A A A T G T			
MO-103 (IB)	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
MO-86 (IB)	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
MO-36 (SC)	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
MO-37 (SC)	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Le. amazonensis (KP274862.1)	- - - - -	G A A . . . G C G T A G G A A A A A	- - - - -	- - - - -	- - - - -
MO-28B (PPSC)	- - - - -	G A A . . . G C G T A G G A A A A A	- - - - -	- - - - -	- - - - -
MO-44 (PPSC)	- - - - -	G A A . . . G C G T A G G A A A A A	- - - - -	- - - - -	- - - - -
MO-39 (SC)	- - - - -	G A A . . . G C G T A G G A A A A A	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Le. braziliensis (MF802822.1)	- - - - -	A T . T . . . G A T . T . . . G A A	- - - - -	- - - - -	- - - - -
MO-87 (IB)	- - - - -	A T . T . . . G A T . T . . . G A A	- - - - -	- - - - -	- - - - -
MO-28A (PPSC)	- - - - -	A T . T . . . G A T . T . . . G A A	- - - - -	- - - - -	- - - - -

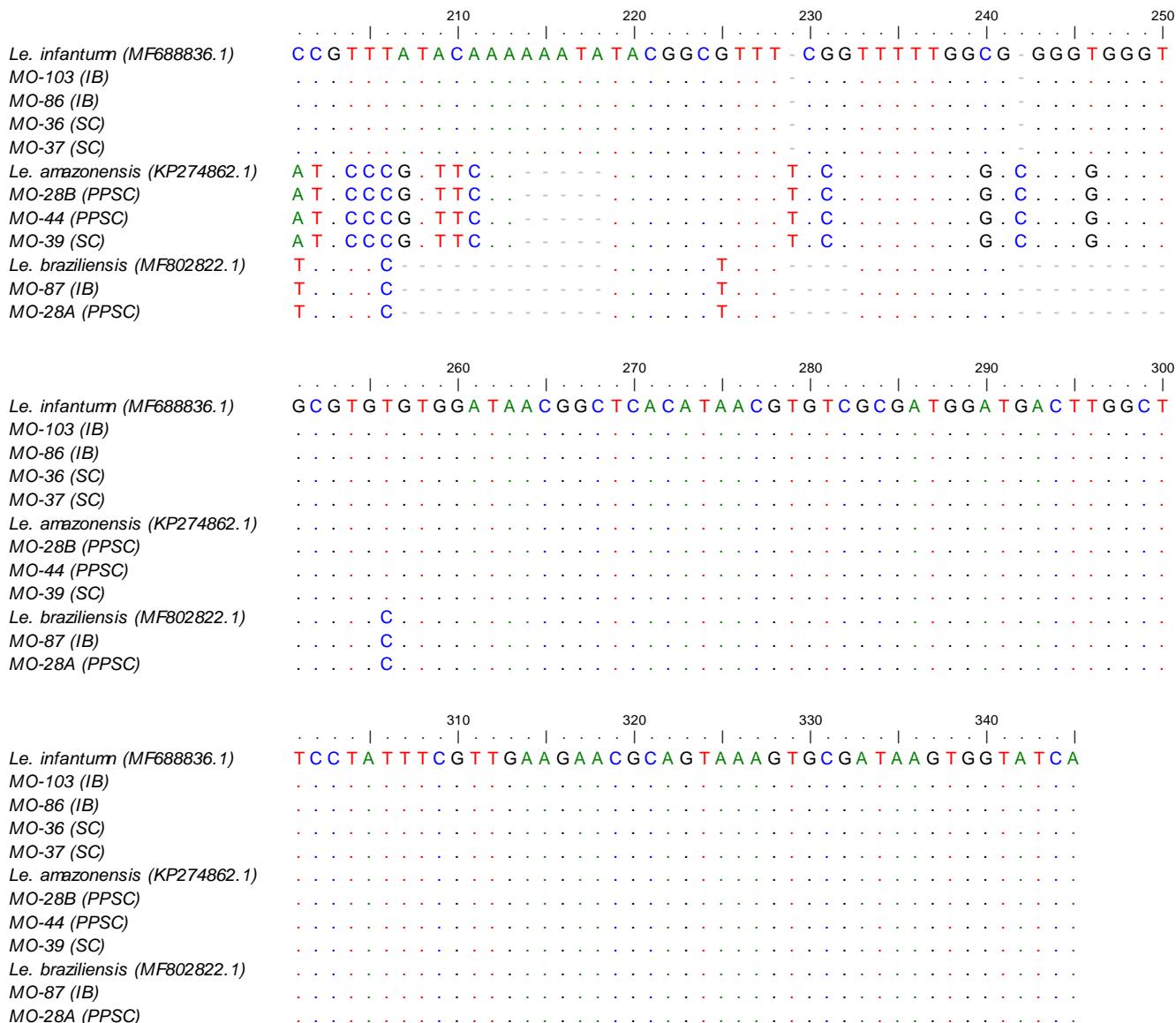


Figura 3.7. Alineamiento de las secuencias de ITS-1 (espaciador transcrita interna del ADN ribosomal) obtenidas de las nueve muestras positivas (números de acceso en *GenBank*: MN496377 a MN496380, y MN497062 a MN497066) con las secuencias de referencia de *L. (L.) infantum*, *L. (L.) amazonensis* and *Le. brasiliensis* reportadas previamente en *GenBank* (nros. de acceso en la figura).

La búsqueda de identidad de las secuencias usando el programa BLAST en GenBank indicó que las secuencias halladas en los monos aulladores comparten entre el 99,7% y el 100% de identidad con secuencias previamente reportadas para *L. (L.) infantum*, *L. (L.) amazonensis* y *Le. (V.) brasiliensis* (Figura 3.7). Las secuencias obtenidas de las muestras positivas se encuentran disponibles en la base de datos del *GenBank* con los siguientes números de acceso: MN496377, MN496378, MN496379, MN496380, MN497062,

MN497063, MN497064, MN497065, y MN497066 (correspondientes a las muestras: MO-103, MO-36, MO-37, MO-86, MO-28A, MO-87, MO-28B, MO-39, y MO-44, respectivamente).

El resultado para el individuo MO-28 revela una co-infección entre *L. (V.) braziliensis* y *L. (L.) amazonensis*. Cabe mencionar que, si bien el individuo MO-28 (macho juvenil) no presentó lesiones en la piel, en el grupo al que pertenecía este individuo (“Quitilina”) se hallaron dos monos (un macho adulto y una hembra juvenil) con lesiones cutáneas de diferentes características (Figura 3.8). Se tomaron muestras de estas lesiones para ser analizadas por PCR y los resultados fueron negativos. Las PCRs de estas muestras se realizaron seis años después de haber sido colectadas (preservadas a -20°), lo que pudo haber favorecido la degradación del ADN del parásito, sin poder llegar a la detección del mismo.



Figura 3.8. Imágenes de dos individuos pertenecientes al grupo “Quitilina” con lesiones cutáneas. A) Macho adulto con lesiones de color claro, algunas ulceradas, en rostro. B) Hembra juvenil con lesiones en distintas partes del cuerpo características de las producidas en la leishmaniasis cutánea, tipo llaga con borde elevado cubiertas o no de costra. Las cuatro imágenes ampliadas muestran algunas de las lesiones de la hembra.

La secuencia de MO-103 tuvo una identidad del 100% con secuencias de referencia de *L. (L.) infantum*, sin embargo, en el análisis por RFLP mostró un fragmento de ADN extra que difiere del perfil esperado para *L. (L.) infantum*. Cabe destacar que las secuencias de las

muestras positivas para *L. (L.) infantum* pertenecientes al sitio remoto (IB) se diferenciaron de las secuencias de ADN obtenidas en los grupos del ambiente rururbano (SC) en cuatro nucleótidos. Este resultado nos sugiere la existencia de cierto polimorfismo nucleotídico en las secuencias de *L. (L.) infantum* con al menos dos haplotipos para la región del espaciador transcrita interna del ADN ribosomal (Figura 3.7).

Los resultados de la PCR dirigida a amplificar el gen de CytB fueron positivos en todas las muestras, confirmando de esta manera la eficacia de la extracción de ADN de las mismas (Figura 3.9).

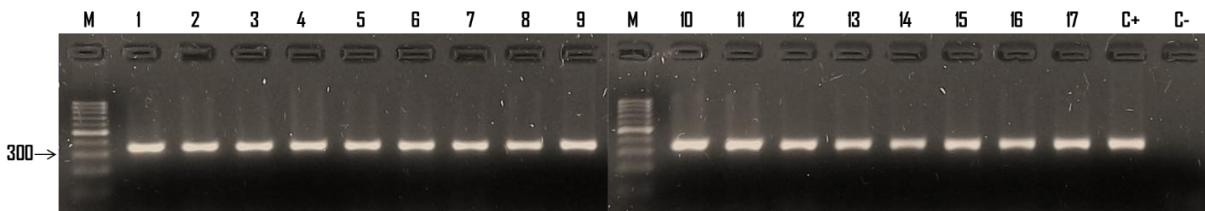


Figura 3.9. Control de extracción de ADN. Gel de agarosa (2%) donde se observan los fragmentos de Cytb amplificados de algunas de las muestras (presentadas con su número de ID) analizadas en representación del total de las muestras de monos aulladores estudiadas. M: marcador molecular de ADN de 1 kb; C+: control positivo; C-: control negativo. El tamaño de los fragmentos se indica en pares de bases.

3.3.2- Flebótomos en árboles dormideros de *A. caraya* y en ambientes peridomésticos

En el mapa de la Figura 3.8 se muestran los sitios de estudio y los puntos de los peridomicilios y ADs en los que se colocaron las trampas de luz. El número de trampas colocadas en los distintos sitios y tipos de micrositios para la captura de flebótomos se describe en la Tabla 3.5. Se capturaron un total de 2365 individuos pertenecientes a 8 especies de la familia Phlebotominae: *Ny. neivai* (61,4%), *Mg. migonei* (18,73%), *Lu. longipalpis* (0,76%), *Ny. whitmani* (0,55%), *Psathyromyia bigeniculata* (Floch y Abonnenc, 1941) (0,51%), complejo *Cortelezzii* (0,21%), *Pi. pessoai* (0,04%) y *Brumptomyia* spp. (17,8%) (Tabla 3.6).

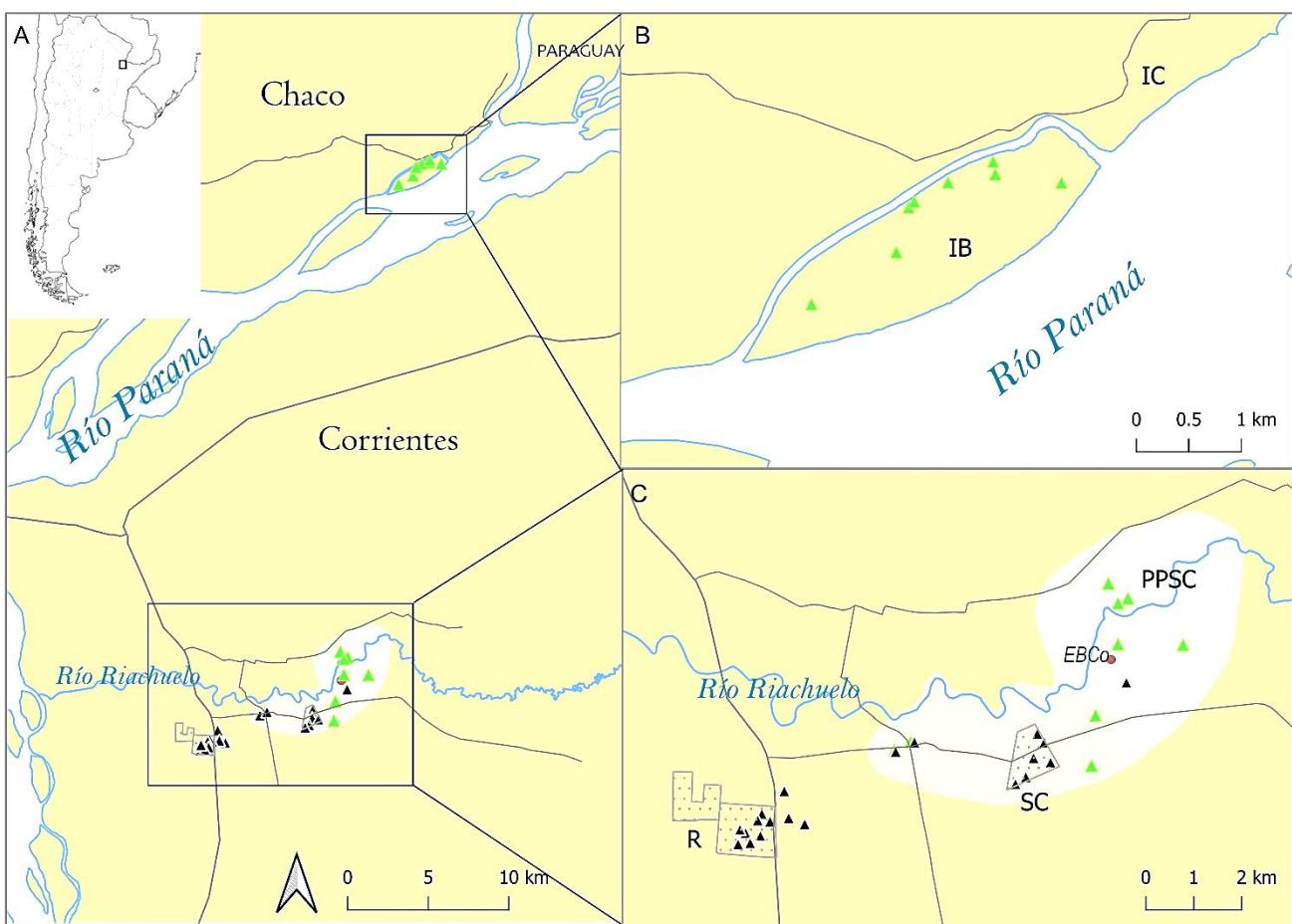


Figura 3.8. A) Ubicación de los sitios de estudio en el noreste de Corrientes y en el este de la provincia de Chaco muestreados para la captura de flebótomos. B) Ubicación de los ADs (triángulos verdes) estudiados en el ambiente “remoto” (IB: Isla Brasilera). C) Ubicación espacial de las viviendas (triángulos negros) muestreadas en Riachuelo (R) y San Cayetano (SC), y de los ADs (puntos verdes) en el ambiente “rururbano” (SC) y en el ambiente “rural” (PPSC).

Sitio de muestreo	Nro. ADs	Nro. trampas por micrositio:		Nro. peridomicilios	Nro. trampas por micrositio:		
		Arriba	Abajo		Gallinero	Árbol gallinas	Perros
Rururbano_R	0	0	0	11	12	7	2
Rururbano_SC	4	8	8	9	8	0	8
Rural	5	10	10	0	0	0	0
Remoto	8	13	15	0	0	0	0
Total	17	31	33	20	20	7	10

Tabla 3.5: Descripción de los puntos de muestreo de flebótomos, cantidad de trampas colocadas, por ambiente y por micrositio. AD: Árbol dormidero de monos.

Los gallineros fueron los micrositios con mayor abundancia de flebótomos: 211 individuos, 10 trampas positivas de 20, abarcando cuatro especies: *Mg. migonei* (67,8%), *Ny. neivai* (23,2%), *Lu. longipalpis* (8,1%) y *Ny. whitmani* (0,95%). Los dormideros de perros siguieron con una abundancia de 36 flebótomos en 6 de las 10 trampas colocadas, pertenecientes a 6 especies: *Ny. neivai* (58,3%), *Mg. migonei* (22,2%), *Brumptomyia* spp. (11,1%), *Lu. longipalpis* (2,8%), *Pi. pessoai* (2,8%) y *Pa. bigeniculata* (2,8%). En los árboles dormideros de gallinas se colectaron 21 individuos flebotomíos en 4 de 7 trampas colocadas, pertenecientes a dos especies: *Mg. migonei* (81%) y *Ny. neivai* (19%). No se obtuvieron resultados significativos al analizar la asociación entre el tipo de micrositio y el número de trampas positivas ($X^2 = 0,3; P = 0,86$).

En los árboles dormideros de monos de los sitios rururbanos (SC) se capturaron 543 individuos en los 4 ADs muestreados, el 83,1% se capturaron en el estrato bajo (*Ny. neivai* (53%), *Mg. migonei* (29,7%), *Brumptomyia* spp. (16,6%), *Ny. whitmani* (0,2%), *Pa. bigeniculata* (0,2%) y *Pi. pessoai* (0,2%)); y el 16,9% en el estrato alto de los árboles (*Ny. neivai* (59,8%) y *Mg. migonei* (40,2%)).

En el ambiente rural (PPSC) se colocaron 20 trampas en 5 árboles dormideros de monos, y se capturaron 586 flebótomos de 6 especies distintas en 18 de las trampas activadas. El 55,5% de los individuos se capturó en el estrato bajo (*Brumptomyia* spp. (49,2%), *Ny. neivai* (41,2%), *Mg. migonei* (8,3%), *Ny. whitmani* (0,9%), y complejo *Cortelezzii* (0,3%)), y el 44,5% en el estrato alto (*Ny. neivai* (51,7%), *Brumptomyia* spp. (23%), *Mg. migonei* (21,8%), *Ny. whitmani* (1,9%), y *Pa. bigeniculata* (1,5%)).

En el ambiente remoto (IB) se colocaron 28 trampas en 8 árboles, de los cuales 7 eran AD, y se colocaron 4 trampas en cada AD (dos noches en dos estratos) (en un sitio una trampa quedó inactiva), y un sitio en la costa de la IB donde se colocó una trampa noche. Se colectaron 964 individuos en 22 de las 28 trampas activadas en 5 de los 8 sitios muestreados, alcanzando a 6 especies de flebótomos distintas (Tabla 3.6). El 70,9% de los flebótomos se capturó en el estrato bajo (*Ny. neivai* (81,7%), *Brumptomyia* spp. (15,95%), *Mg. migonei* (1,5%), *Pa. Bigeniculata* (0,7%) y complejo *Cortelezzii* (0,1%)); y el 29,1% de los flebótomos se colectaron en el estrato alto (*Ny. neivai* (91,5%), *Mg. migonei* (3,2%), *Ny. whitmani* (0,35%), *Pa. bigeniculata* (0,35%) y *Brumptomyia* spp. (4,6%)).

Species	Rururbano (Peri-domicilios)		Rururbano (AD)		Rural (AD)		Remoto (AD)		Total	
	(n trampas= 37)		(n trampas= 16)		(n trampas= 20)		(n trampas= 28)			
	Ab.	%	Ab.	%	Ab.	%	Ab.	%		
<i>Ny. neivai</i>	74	27,6	294	54,1	269	45,9	815	84,5	1452	
<i>Mg. migonei</i>	168	62,7	171	31,5	84	14,3	19	2	442	
<i>Lu. longipalpis</i>	18	6,7	0	0	0	0	0	0	18	
<i>Ny. whitmani</i>	2	0,75	1	0,2	8	1,4	1	0,1	12	
<i>Pa. bigeniculata</i>	1	0,4	1	0,2	4	0,7	6	0,6	12	
Complejo Cortelezzii	1	0,4	0	0	1	0,2	1	0,1	3	
<i>Pi. pessoai</i>	0	0	1	0,2	0	0	0	0	1	
Brumptomyia sp.	4	1,5	75	13,8	220	37,5	122	12,7	421	
Total	268		543		586		964		2361	

Tabla 3.6: Especies y abundancias de flebótomos hallados en los distintos sitios estudiados.

La razón promedio entre la abundancia de flebótomos hallada en el estrato bajo y el estrato alto de los AD fue 2,3:1 (abajo: arriba) (Figura 3.9). Sin embargo, la prueba de Wilcoxon para muestras pareadas no resultó en diferencias significativas entre los estratos de altura para la presencia de flebótomos ($Z = 1,84$; $P = 0,0664$).

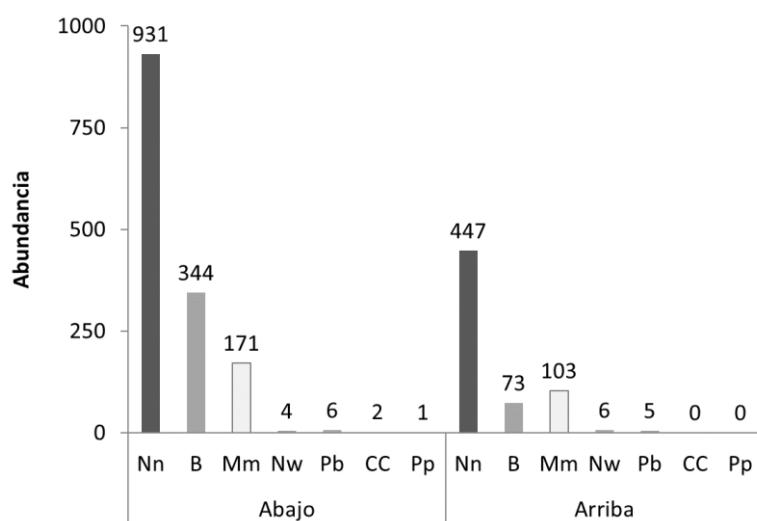


Figura 3.9. Abundancia total de flebótomos registrada en los dos estratos estudiados en los árboles dormideros de monos: 1,5 m (estrato bajo) y aproximadamente 5 m (estrato alto). Nn: *Nyssomyia neivai*; B: *Brumptomyia* sp.; Mm: *Migonemyia migonei*; Nw: *Nyssomyia whitmani*; Pb: *Psathyromyia bigeniculata*; CC: *Cortelezzii* complex; Pp: *Pintomyia pessoai*.

Por otro lado, la prueba de *Chi-cuadrado* de independencia entre las especies de flebótomos presentes y los distintos ambientes resultó en una asociación significativa entre dichas variables ($X^2 = 977,09, P < 0,0001$). Las especies incluidas en el análisis fueron: *Ny. neivai*, *Mg. migonei*, *Lu. longipalpis*, *Ny. whitmani* y *Brumptomyia* spp. Las especies *Pi. pessoai*, el complejo *Cortelezzii*, y *Pa. bigeniculata* no se tuvieron en cuenta debido a sus bajas abundancias por fuera de los requerimientos del análisis. Estos resultados también se reflejan en el diagrama de perfiles multivariados, donde cada especie mostró un patrón diferente y todos se diferencian del perfil promedio (Figura 3.10A). En el ACS el Eje 1, el cual representa la contribución más alta al estadístico chi-cuadrado, explicó el 72,68% de la inercia de los datos, y se puede observar a *Lu. longipalpis* y *Mg. migonei* asociadas positivamente con el ambiente rururbano, y *Lu. longipalpis* aún más con los peridomicilios respecto de lo esperado bajo independencia. Mientras que *Ny. neivai* se registra asociada positivamente con el ambiente remoto y rural, y en forma negativa respecto a los ambientes rururbanos (Figura 3.10B).

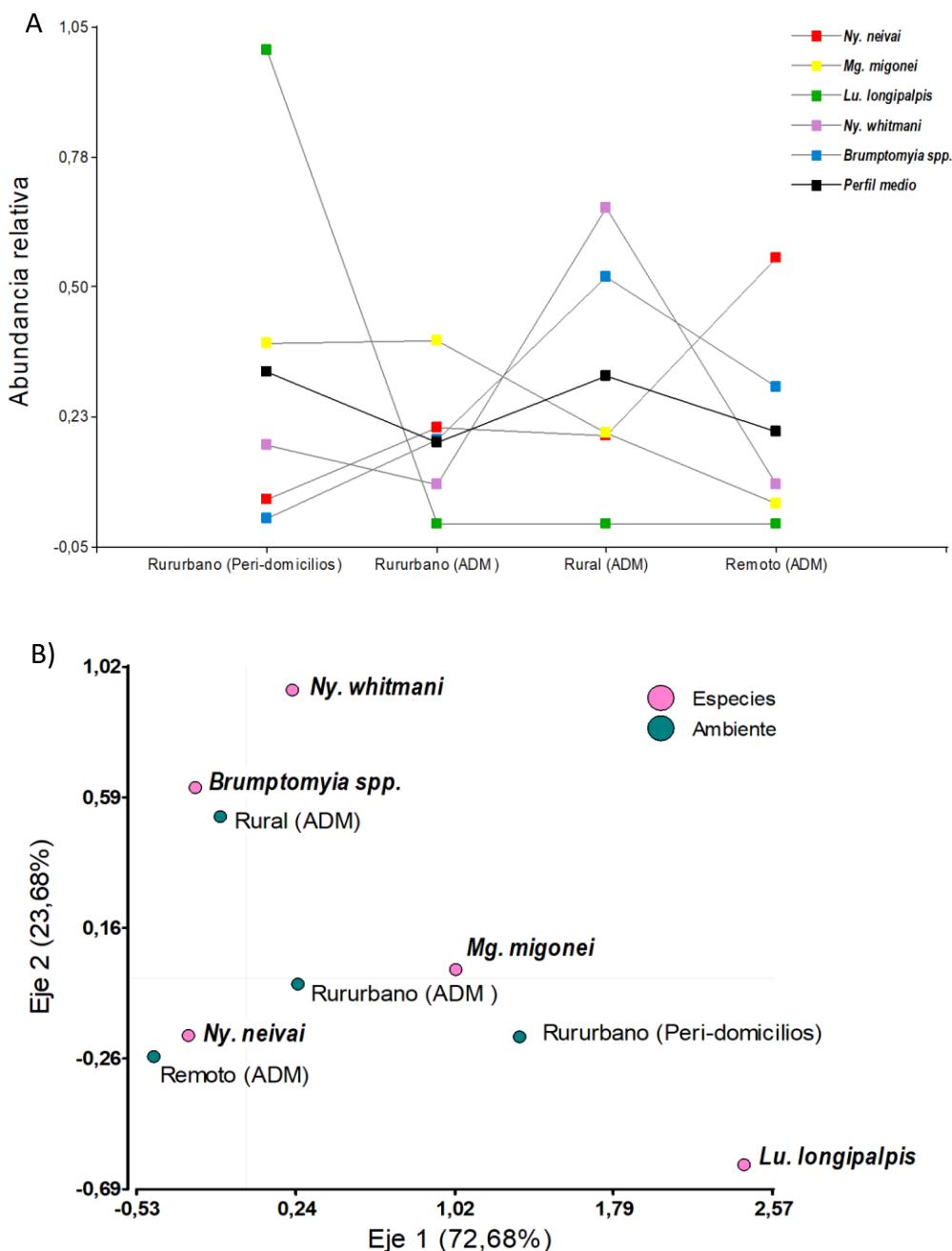


Figura 3.10. A) Diagrama de perfiles multivariados: se observan los perfiles de las abundancias relativas de cada especie de flebótomos según los ambientes estudiados. B) Resultados del análisis de correspondencias simple (ACS).

Identificamos a *Ny. neivai* como la especie asociada predominantemente con *A. caraya*, siendo la que se registró con mayor abundancia en las copas de los ADs durante la noche en la IB y también en el PPSC, mientras que *Lu. longipalpis* y *Mg. migonei* se encontraron asociadas con los ambientes peridomésticos de SC y R.

3.4- Discusión de resultados

3.4.1- Infección por *Leishmania* en *Alouatta caraya*

Las muestras obtenidas de los monos aulladores presentaron infección natural por *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* y *L. (L.) infantum*, detectando individuos infectados en los tres ambientes relevados. La infección por leishmanias fue registrada en varias especies de primates platirrinos, nuestro estudio registra por primera vez estos parásitos para monos *A. caraya* en vida libre, y también el primer registro de *L. (L.) amazonensis* en la región noreste de nuestro país.

Como ya mencionamos, la LT en nuestro país es usualmente causada por *L. (V.) braziliensis*, la especie más frecuentemente registrada en la región. Nuestros resultados para *L. (V.) braziliensis*, están en consistencia con el registro histórico de su endemicidad en la región (Salomón y col., 2006; Salomón y col., 2008b). Sin embargo, no detectamos infección por *L. (V.) braziliensis* en los monos de los sitios rururbanos, posiblemente un mayor número de muestras permita su detección. Asimismo, en los ADs de los tres ambientes estudiados, incluidos los ADs del área rururbana, encontramos a los insectos vectores de *L. (V.) braziliensis*, como *Ny. neivai*, *Mg. migonei* y *Ny. whitmani*.

Los casos de LV canina y humana en la provincia de Corrientes son atribuídos a *L. (L.) infantum*, aunque no hay diagnóstico registrado, la provincia de Corrientes comparte el bioma ecológico con su contigua provincia de Misiones, endémica para la LV, en donde se ha reportado a *L. (L.) infantum* como agente etiológico de leishmaniasis visceral urbana por medio de diagnósticos moleculares (Moya y col., 2017). El hallazgo de *L. (L.) infantum* en los monos de los ADs rururbanos (SC) apoya dicha extrapolación de resultados, y nos sugiere diferentes escenarios ecoepidemiológicos posibles: que los monos son potenciales fuentes de infección para las familias humanas y perros vecinos a los bosques habitados por los aulladores; que estos grupos de primates adquirieron la infección desde algún foco de transmisión doméstico de LV canina, cercano a los parches de bosque donde habitan los monos; o que la presencia del parásito podría deberse a la circulación enzoótica del parásito (Salomón y col., 2011c), involucrando a otros animales silvestres como por ejemplo el zorro gris pampeano (*Lycalopex gymnocercus*) o el zorro de monte (*Cerdocyon thous*) (Da Silva y col., 2021). Asimismo, la infección por *L. (L.) infantum* en los monos de la IB, los cuales mantienen escaso contacto con el ambiente doméstico, podría

deberse a la circulación enzoótica del parásito en la Isla, involucrando a otros animales como cánidos silvestres (Da Silva y col., 2021), o a un foco de transmisión proveniente de la urbanización cercana, como perros que circulan junto a pescadores u otras personas locales.

Por otro lado, las secuencias de *L. (L.) infantum* revelaron cierto polimorfismo nucleotídico (cuatro bases) entre las muestras provenientes de IB y las de SC. Este polimorfismo identificado en la región ITS-1 del ADN ribosomal, sugiere una posible diferenciación genética de *L. (L.) infantum* entre ambos sitios. No obstante, este patrón requiere confirmación mediante un análisis con un mayor número de muestras.

Detectamos por primera vez la infección por *L. (L.) amazonensis* en el noreste de nuestro país. Este parásito ya había sido registrado en el noroeste argentino, como en la provincia de Salta en personas cursando una leishmaniasis cutánea (Frank y col., 2003; García Bustos y col., 2016). Se destaca que se detectaron monos infectados con *L. (L.) amazonensis* en los sitios rurales y rururbanos, uno de ellos en co-infección con *L. (V.) braziliensis*, y ninguno en el ambiente remoto de la IB.

A pesar de la reciente urbanización y expansión de *L. (L.) infantum* en la región (Salomón y col., 2015) la hipótesis de permanencia del ciclo enzoótico con contacto excepcional con humanos se propuso en los primeros reportes de *Lu. longipalpis*, después de haberlo encontrado durante más de 50 años asociado a registros dispersos de LV humana en Argentina (Salomón y col., 2001). El escenario para *L. (L.) amazonensis* podría ser muy diferente, su expansión es aparentemente más reciente (Azeredo-Coutinho y col., 2007; Recalde y col., 2019), con vectores desconocidos en Argentina, y probablemente por vías y reservorios distintos que los implicados para *L. (L.) infantum*. Por lo tanto, puede ser que el contacto de *L. (L.) amazonensis* con poblaciones de animales silvestres más remotas como las de IB aún no haya sucedido, o que la tasa de infección sea muy baja y no la estamos detectando. Asimismo, consideramos que la caracterización de los parásitos causantes de LC en la región aportaría mayor comprensión a nuestros resultados.

Ninguno de los monos con resultado positivo presentó lesiones u otros síntomas compatibles con la enfermedad, esto coincide con lo reportado por Santos y Oliveira (2020), donde mencionan que las infecciones en monos de vida libre parecen ser asintomáticas, como también hay infecciones asintomáticas en humanos (Moreno y col., 2002). La ausencia de síntomas podría significar que estos parásitos, o la carga parasitaria

que mantienen, no afectan la salud de estos animales. Sin embargo, cabe mencionar que dos animales del PPSC presentaron lesiones cutáneas, y ambos pertenecen al grupo del mono en el que se detectó la infección mixta por *L. (L.) amazonensis* y *L. (V.) braziliensis*. En otros estudios de infección experimental con *L. (V.) braziliensis* y *L. (L.) amazonensis* en *Sapajus apella* hallaron parásitos alojados cerca de la superficie de la piel, y en las infecciones con *L. (L.) amazonensis* se registran lesiones de corto término, que forman nódulos y se van cicatrizando. En cambio, en las lesiones causadas por *L. (V.) braziliensis* los nódulos terminan en ulceraciones espontáneas, las ulceras duran mucho más tiempo que en las infecciones por *L. (L.) amazonensis* (Silveira y col., 1990). Estos datos podrían coincidir con lo hallado en los monos con lesiones del grupo Quitilina, pero los animales resultaron negativos para la PCR sobre tejido de oreja y sobre tejido de lesión, lo cual puede ser porque efectivamente eran negativos a la infección, o porque la técnica no fue lo suficientemente sensible para detectarla, y en el caso de las lesiones por el tiempo transcurrido hasta el análisis de las muestras.

A partir de estos resultados nos queda abierta la pregunta sobre el origen de esas lesiones y si podrían deberse a la infección por *L. (V.) braziliensis* o *L. (L.) amazonensis*. Futuros análisis de muestras biológicas de estas poblaciones de monos aulladores podrían dilucidar estos datos.

3.4.2- Flebótomos asociados a árboles dormideros de *Alouatta caraya* y ambientes peridomésticos

En la IB (ambiente remoto) se registró la mayor abundancia de flebótomos, seguido por el ambiente rural, rururbano y peridoméstico. Las especies de flebótomos que detectamos representan a la diversidad previamente registrada para la zona (Bejarano & Duret, 1950; Salomón y col., 2008b; 2009b; 2011a,b; Rosa y col., 2010; Szelag y col., 2018a), excepto para la presencia *Ny. whitmani* en la IB que representa el primer registro para la provincia de Chaco.

Nyssomyia neivai fue la especie más abundante en los ambientes rururbano, rural y remoto, seguida por *Mg. migonei*, la dominancia de *Ny. neivai* en la región es consistente con los registros previos en la eco-región del Chaco húmedo y en particular, en las islas del río Paraná (Salomón y col., 2008b; Rosa y col., 2010; Santos y col., 2018; Szelag y col.

2018a). Szelag y col. (2018a) hallaron una co-dominancia de *Ny. neivai* y *Mg. migonei* en localidades cercanas a la IB en ambientes rurales y periurbanos, por lo que nuestros resultados sugieren que *Ny. neivai* podría prevalecer sobre *Mg. migonei* en ambientes menos perturbados como es la IB.

Lutzomyia longipalpis se registró sólo en los peridomicilios, y fue precedida en abundancia por *Mg. migonei* y *Ny. neivai*. Sin embargo, debemos tener en cuenta que la alta abundancia para *Mg. migonei* es consecuencia de la abundancia registrada en un peridomicilio (132 de 168 individuos colectados). Por otro lado, los resultados nos muestran que *Mg. migonei* mantiene características rurales y peri-urbanas a la vez que está en cercanía a fragmentos de bosque remanentes. Estudios previos mostraron que esta especie está usualmente asociada a vegetación primaria y en abundancias menores en vegetación secundaria, así como también dentro y fuera de domicilios, y asociada a refugios de animales domésticos (Rangel y Lainson, 2009). Asimismo, *Mg. migonei* fue registrado como vector de *L. (V.) braziliensis* (Salomón y col., 2004; Pita Pereira y col., 2005) y como vector putativo de *L. (L.) infantum* en Brasil y en nuestro país (De Carvalho y col., 2010; Salomón y col., 2010). Moya y col. (2015) registraron por primera vez ADN de *L. (L.) infantum* en *Mg. migonei* en Argentina. Nuestros resultados son consistentes con lo registrado en estudios previos, sugiriendo que *Mg. migonei* podría estar conectando el ciclo de transmisión zoonótico y antropozoonótico de las leishmaniasis (Santini y col., 2013).

La presencia de ciertas especies de flebótomos depende significativamente del ambiente, esto es consistente con otros estudios en la región donde se muestra que la distribución y abundancia de especies está asociada al grado de modificación antrópica sobre los ambientes naturales (Szelag y col., 2018a). En los ADs de los tres ambientes evaluados la especie predominante fue *Ny. neivai*, el vector primario asociado a la LC a lo largo de las áreas endémicas de nuestro país (Salomón y col., 2004; Córdoba-Lanús y col., 2006). La abundancia fue mayor en el ambiente remoto que en el ambiente rural y rururbano, donde *Mg. migonei* podría jugar un rol importante.

A partir del análisis multivariado se observa que *Mg. migonei* se asocia junto a *Lu. longipalpis* con el ambiente rururano y *Ny. neivai* con el ambiente remoto, y que *Lu. longipalpis* es la especie que más se diferencia del perfil promedio en el diagrama de perfiles multivariados y la especie que más contribuye a la falta de independencia en el

ACS. Esta especie solo fue encontrada en los peridomicilios, coincidiendo con los antecedentes que muestran que el ambiente urbano es más favorable para esta especie (Rangel y col., 2012). Resultados similares fueron reportados en otras localidades del noreste argentino cercanas a ambientes silvestres (Salomón y col., 2011a; 2011b; Santini y col., 2013; Szelag y col., 2014; Berrozpe y col., 2017). Asimismo, registramos a *Lu. longipalpis* en dos viviendas localizadas a 3km del casco urbano y muy próximas a fragmentos de bosque (50m), lo que puede atribuirse a la capacidad de dispersión de *Lu. longipalpis* en paisajes discontinuos (Oliveira y col., 2011), y sugiere que la dispersión de la especie en estos sitios de estudio es un proceso que está ocurriendo desde el ambiente rururbano al ambiente rural.

Szelag y col. (2018a) registraron gran variación mensual en la abundancia de las especies en la región, entonces las diferencias que observamos entre los ambientes podrían estar dadas por las variaciones estacionales, dado que los muestreos fueron realizados todos en verano, pero en distintos meses. Muestreos estacionales en estos sitios aportarían importante información adicional sobre la diversidad y abundancia de flebótomos en los sitios estudiados y en particular en los habitados por *A. caraya*.

Respecto a los ADs, en el estrato vertical bajo se halló un mayor número de flebótomos, pero no obtuvimos diferencias significativas con las abundancias halladas en el estrato alto. Las especies registradas en las copas de los árboles, donde habitan los monos aulladores, fueron casi las mismas halladas en el estrato bajo. Varios estudios en Latinoamérica han reportado la distribución vertical de flebótomos con diferentes patrones de estratificación (Días-Lima y col., 2002; Cortez y col., 2007), pero en Argentina este es el primer estudio que registra la diversidad de flebótomos asociada a copas de los árboles en bosques naturales y asociada a sitios dormideros de monos aulladores. Lo que contribuye a sustentar la hipótesis de flujo parasitario entre los monos durmiendo en el dosel y los humanos y animales domésticos o silvestres en el terreno próximo a la base de los árboles.

Por lo tanto, en lugares con transmisión activa de leishmaniasis, la presencia de flebótomos competentes vectores de *Leishmania* sp. en las copas de los árboles dormideros de *A. caraya*, sumado a nuestros resultados de infección y a los antecedentes para otras especies de primates platirrinos, como *A. guariba* (Humboldt, 1812) (Primates: Atelidae), *Callicebus nigrifrons* (Primates: Pitheciidae) (Spix, 1823), *Cebus xanthosternos*

(Wied, 1820) (Primates: Cebidae) y *Aotus azarae* (Primates: Aotidae) (Humboldt, 1812) que son susceptibles a la infección (Malta y col., 2010; Acardi y col., 2013), podemos sugerir que *A. caraya* podría ser un potencial reservorio de leishmanias en esos escenarios. Por otro lado, los monos aulladores forman unidades sociales cohesivas, especialmente a la hora de dormir, estos primates también pueden estar funcionando como recurso de alimento para los flebótomos, y por lo tanto como amplificadores de la población de vectores.

La interacción entre los flebótomos y los monos podría ser un factor clave en el ciclo de transmisión de las leishmanias en los paisajes rurales y silvestres. Y esta observación podría cobrar importancia dado que los monos aulladores pueden habitar ambientes con distinto grado de disturbio, desde selvas conservadas a bosques severamente intervenidos antrópicamente.

3.4.3- *Leishmania*, flebótomos y *Alouatta caraya*

La detección de *Leishmania* spp. y de flebótomos asociados a monos aulladores, tanto en ambientes más antropizados como remotos, nos genera preguntas acerca de la actual prevalencia de estos parásitos, la capacidad de *A. caraya* como reservorio, y la morbilidad de las leishmaniasis en esta especie de primate. Como ya presentamos en la Tabla 3.1, varias especies de primates platirrinos son susceptibles a la infección por *Leishmania* sp., nuestros registros demuestran la infección natural por *Leishmania* spp. en *A. caraya*, sugiriendo la potencial participación de estos animales como hospedadores en el ciclo de transmisión en la interface ambiental silvestre-urbana en esta región. Sin embargo, estudios adicionales son necesarios para dilucidar su rol como hospedador accidental o reservorio de estos parásitos.

Respecto a los criterios para incriminar a una especie como reservorio de leishmanias aún hay que evaluar a muchos de ellos para *A. caraya* (Chaves y col., 2007; WHO, 2010). La superposición en tiempo y espacio entre monos aulladores y casos humanos, el contacto entre los monos y los vectores, la longevidad de los aulladores, y la disponibilidad de parásitos en piel en animales aparentemente sanos, podrían favorecer a su rol en el ciclo de transmisión de las leishmanias. Por otro lado, la sobrevida con infección de los aulladores, la identidad de parásitos entre humanos y monos requieren estudios adicionales.

Respecto al requisito de una prevalencia de infección mayor al 20%, la participación de *A. caraya* en la transmisión zoonótica periurbana y enzoótica selvática, podría darse actuando como parte de una comunidad de reservorios y no como el reservorio principal o primario (Haydon y col., 2002). A pesar de ello, el reporte de ADN de tres especies de leishmania patogénicas para el ser humano en la piel de individuos de *A. caraya* en diferentes sitios y ambientes merece que se realicen más estudios para entender si ellos son hospedadores accidentales, en donde se produce una transmisión eventual desde humanos (o animales domésticos) hacia animales silvestres en vida libre, o si los monos cumplen algún rol epidemiológico en el ciclo silvestre de las leishmaniasis.

Nuestro conocimiento actual respecto al impacto de *Leishmania* spp. sobre la salud de las poblaciones de *A. caraya* en vida libre es acotado. En consecuencia, creemos que los estudios en epidemiología, ecología de los ciclos de transmisión, y consecuencias clínicas de las infecciones por *Leishmania* en *A. caraya* y sobre otras poblaciones de primates no humanos, nos proveerá de conocimientos más profundos y seguros sobre la dinámica de estas enfermedades en la interface silvestre-doméstica. Los resultados obtenidos, si bien son relevantes, dado que estos parásitos no se habían registrado en hospedadores mamíferos en vida libre en la región, no nos permiten obtener inferencias eco-epidemiológicas al respecto. Por ello, consideramos que sería necesario profundizar en próximas investigaciones para evaluar los distintos eslabones del ciclo de transmisión silvestre, como la infección en otras especies de mamíferos en vida libre, y la infección por leishmanias en los flebótomos asociados a los ADs.

Capítulo 4 – Conclusiones e interrogantes que surgen de este estudio

Detectamos y confirmamos la infección por dos tipos de UDTs de *T. cruzi*, por *T. minasense*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) infantum* y por *L. (L.) amazonensis* en las poblaciones de monos aulladores *A. caraya* del noreste de la Argentina. Además, evaluamos la presencia de los potenciales vectores de estos parásitos coincidiendo espacio temporalmente con las poblaciones de *A. caraya* estudiadas.

Hemos detectado frecuencias de infección con valores relativamente bajos en todos los casos, excepto para *T. minasense*, que fue hallado en la mayoría de los animales estudiados, y para los resultados de PCR del ADN del kinetoplasto que muestra valores positivos en casi la mitad de los individuos. Aunque las prevalencias son bajas, la detección de hemoparásitos en monos en vida libre, que son causantes de enfermedades infecciosas de alto interés para la salud pública, aporta información relevante sobre la eco-epidemiología de estos agentes patógenos en el ambiente silvestre, tanto para su potencial repercusión sobre la salud humana como sobre la conservación de las especies de animales en vida libre susceptibles.

La posibilidad de transmisión de estos hemoparásitos requiere de la coincidencia espacio temporal del agente patógeno, el hospedador, y el vector; lo cual hemos hallado en los sitios de estudio a lo largo de este trabajo, principalmente para *Leishmania* spp. Los resultados de infección por *Leishmania* spp. nos indican una amplia distribución del parásito en la región. Los casos de infección en monos no parecen ser focos acotados sino algo establecido en los sitios de estudio, lo que nos sugiere pensar en un ciclo de transmisión silvestre potencialmente estable en la región. Estudiar la infección en los flebótomos asociados a los monos aulladores aportaría a este interrogante.

Los resultados reflejan la importancia de los estudios en animales silvestres dado su potencial rol en el ciclo enzoótico de agentes patógenos. Los monos aulladores podrían ser hospedadores e incluso reservorios putativos en el ciclo silvestre de *T. cruzi* y/o *Leishmania* spp. en la región. Resultados más rigurosos, con un mayor número de sitios y de muestras evaluadas, así como también con nuevos muestreos de vectores, nos

permitirían comprender más precisamente la dinámica de transmisión de los agentes patógenos hallados en las áreas silvestres de la región.

Los análisis diagnósticos para la detección de *Trypanosoma* spp. y de *Leishmania* spp. fueron realizados en diferentes laboratorios. Los protocolos de diagnóstico en biología molecular en general están puestos a punto con humanos o animales domésticos, lo que genera dificultades técnicas al momento de analizar muestras de animales silvestres. Asimismo, en los análisis de diagnóstico molecular para la detección de *T. cruzi*, hemos ajustado los protocolos mientras íbamos avanzando en los resultados. Por ejemplo, la detección de *T. minasense* por un protocolo que era inicialmente utilizado para diferenciar entre *Leishmania* sp., *T. rangeli*, y *T. cruzi* en muestras clínicas y/o *Blastocritidida* sp. en muestras vectoriales dejó en evidencia la necesidad de indagación y plasticidad para con los métodos ya establecidos, cuando los utilizamos en muestras de animales silvestres.

Cambios masivos en el uso de la tierra, entre otros efectos, usualmente resultan en un incremento de la probabilidad de transmisión cruzada de parásitos en tanto el contacto entre aulladores y humanos y sus animales domésticos asociados se incrementa. Nuestro actual conocimiento respecto al impacto de la infección por los hemoparásitos hallados en este estudio sobre la salud de las poblaciones de *A. caraya* en vida libre, es escaso. En consecuencia, nosotros creemos que las investigaciones en epidemiología, ecología de la transmisión, y las consecuencias clínicas de las infecciones en *A. caraya* y en otras poblaciones de primates no humanos proveerán información más precisa acerca de la dinámica de estas enfermedades en la interface doméstica-silvestre.

Interrogantes generados a partir de los resultados:

- ¿Está activo el ciclo de transmisión enzoótico de *T. cruzi*, *L. (L.) infantum*, *L. (V.) braziliensis* y *L. (L.) amazonensis* en los paisajes naturales de la región donde se realizó el estudio?
- ¿Cómo adquirieron la infección por *T. cruzi* los monos aulladores y qué rol tienen en el ciclo enzoótico del parásito?
- ¿Cuánto podrían los monos infectados aportar a la transmisión vectorial de *T. cruzi*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) infantum* y *L. (L.) amazonensis* en estos ambientes?
- ¿Podría haber un ciclo de transmisión vectorial arbóreo de *T. cruzi* en estos sitios?

- ¿Podría haber un ciclo de transmisión vectorial arbóreo de *Leishmania spp.* en estos sitios?
- ¿Qué consecuencias en la salud y la conservación de *Alouatta caraya* le pueden traer las infecciones por tripanosomátidos halladas?
- ¿Cómo adquirieron la infección por *T. minasense* los monos aulladores?
- ¿Los flebótomos presentes en los sitios de estudio de qué especies de mamíferos se alimentan mayormente en el ambiente silvestre? ¿Se encuentran infectados por *Leishmania spp.*?

Referencias:

- Acardi, S. A., Liotta, D. J., Santini, M. S., Romagosa, C. M., & Salomón, O. D. (2010). Detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and *Canis familiaris* in Misiones, Argentina: the first report of a PCR-RFLP and sequencing-based confirmation assay. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105, 796-799.
- Acardi, S. A., Rago, M. V., Liotta, D. J., Fernández-Duque, E., & Salomón, O. D. (2013). *Leishmania* (Viannia) DNA detection by PCR-RFLP and sequencing in free-ranging owl monkeys (*Aotus azarae azarae*) from Formosa, Argentina. *Veterinary parasitology*, 193(1-3), 256-259.
- Acosta-Soto, L., Encinas, E. S., Deschutter, E. J., Bornay-Llinares, F. J., & Ramos-Rincón, J. M. (2020). Autochthonous outbreak of cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in Corrientes Province, Argentina. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 102(3), 593.
- Adl, S. M., Simpson, A. G., Lane, C. E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S. S., ... & Spiegel, F. W. (2012). The revised classification of eukaryotes. *Journal of eukaryotic microbiology*, 59(5), 429-514.
- Agostini, I., Holzmann, I., Di Bitetti, M. S., Oklander, L. I., Kowalewski, M. M., Beldominico, P. M., ... & Miller, P. (2014). Building a species conservation strategy for the brown howler monkey (*Alouatta guariba clamitans*) in Argentina in the context of yellow fever outbreaks. *Tropical Conservation Science*, 7(1), 25-34.
- Agostini, I., Holzmann, I., Oklander, L. I., Peker, S. M., Pavé, R., Kowalewski, M. M. (2019). *Alouatta guariba*. In Categorización del Estado de Conservación de Los Mamíferos de Argentina 2019; Lista Roja de Los Mamíferos de Argentina; SaydS, S., Ed.; SAREM: Buenos Aires, Argentina; Available online: <http://cma.sarem.org.ar/es/especie-nativa/alouatta-guariba> (accessed on 1 March 2020).
- Alkmim-Oliveira, S. M., Costa-Martins, A. G., Kappel, H. B., Correia, D., Ramirez, L. E., & Lages-Silva, E. (2013). *Trypanosoma cruzi* experimental congenital transmission associated with TcV and TcI subpatent maternal parasitemia. *Parasitology research*, 112, 671-678.
- Almeida, M. A. B. D., Santos, E. D., Cardoso, J. D. C., Fonseca, D. F. D., Noll, C. A., Silveira, V. R., ... & Brasil, R. A. (2012). Yellow fever outbreak affecting *Alouatta* populations in southern Brazil (Rio Grande do Sul State), 2008–2009. *American Journal of Primatology*, 74(1), 68-76.
- Alvarado-Otegui, J. A., Ceballos, L. A., Orozco, M. M., Enriquez, G. F., Cardinal, M. V., Cura, C., ... & Gürtler, R. E. (2012). The sylvatic transmission cycle of *Trypanosoma cruzi* in a rural area in the humid Chaco of Argentina. *Acta tropica*, 124(1), 79-86.
- Añez, N., Crisante, G., & Soriano, P. J. (2009). *Trypanosoma cruzi* congenital transmission in wild bats. *Acta tropica*, 109(1), 78-80.
- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., & Sereno, D. (2016). A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(3), e0004349.

- Andreó, V., Rosa, J., Ramos, K., & Salomón, O. D. (2022). Ecological characterization of a cutaneous leishmaniasis outbreak through remotely sensed land cover changes. *Geospatial health*, 17(1), 10.4081/gh.2022.1033.
- Araújo, C. A. C., Waniek, P. J., Xavier, S. C. C., & Jansen, A. M. (2011). Genotype variation of *Trypanosoma cruzi* isolates from different Brazilian biomes. *Experimental parasitology*, 127(1), 308-312.
- Argibay, H. D., Orozco, M. M., Cardinal, M. V., Rinas, M. A., Arnaiz, M., Segura, C. M., & Gürtler, R. E. (2016). First finding of *Trypanosoma cruzi* II in vampire bats from a district free of domestic vector-borne transmission in Northeastern Argentina. *Parasitology*, 143(11), 1358-1368.
- Argibay, H. D. (2018). Eco-epidemiología de patógenos multi-hospedador en mamíferos silvestres del nordeste argentino. Tesis doctoral. *Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires*.
- Aysanoa, E., Mayor, P., Mendoza, A. P., Zariquiey, C. M., Morales, E. A., Pérez, J. G., ... & Lescano, A. G. (2017). Molecular epidemiology of trypanosomatids and *Trypanosoma cruzi* in primates from Peru. *EcoHealth*, 14, 732-742.
- Azeredo-Coutinho, R. B. G., Conceição-Silva, F., Schubach, A., Cupolillo, E., Quintella, L. P., Madeira, M. F., ... & Mendonça, S. C. F. (2007). First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(7), 735-737.
- Bar, M. E., Oscherov, E. B., Damborsky, M. P., Varela, M. E., Mizdraji, G., & Porcel, E. (1992). Triatomismo del Departamento San Luis del Palmar de la Provincia de Corrientes, Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*, 52, 193-201.
- Bar, M. E., Oscherov, E. B., Damborsky, M. P., Alvarez, B. M., Mizdraji, G., Avalos, G., & Porcel, E. (1996). Infestación doméstica por *Triatoma infestans* y prevalencia de seropositivos al *Trypanosoma cruzi* en un área rural del Nordeste Argentino. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 29, 549-555.
- Bar, M. E., Damborsky, M. P., Oscherov, E. B., Alvarez, B. M., Mizdraji, G., & Avalos, G. (1997). Infestación domiciliaria por triatomíos y seroprevalencia humana en el Departamento Empedrado, Corrientes, Argentina. *Cadernos de Saúde Pública*, 13(2), 305-312.
- Bar, M. E., Mabel Alvarez, B., Oscherov, E. B., Damborsky, M. P., & Jörg, M. E. (1999a). Contribución al conocimiento de los reservorios del *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) en la Provincia de Corrientes, Argentina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32, 271-276.
- Bar, M. E., Damborsky, M. P., Alvarez, B. M., Oscherov, E. B., & Mazza, S. M. (1999b). Triatomíos silvestres detectados en nidos de aves de algunos departamentos de la provincia de Corrientes, Argentina. *Rev Soc Ent Arg*, 58, 43-50.

- Bar, M. E., & Wisnivesky-Colli, C. (2001). *Triatoma sordida* Stål 1859 (Hemiptera, Reduviidae: Triatominae) in palms of northeastern Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96, 895-899.
- Bar, M. E., Damborsky, M. P., Oscherov, E. B., Milano, A. M. F., Avalos, G., & Wisnivesky-Colli, C. (2002). Triatomines involved in domestic and wild *Trypanosoma cruzi* transmission in Concepción, Corrientes, Argentina. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97, 43-46.
- Bar, M. E., Damborsky, M. P., Oscherov, E. B., & Wisnivesky-Colli, C. (2005). Epidemiología de la enfermedad de Chagas en San Roque, Corrientes: Infestación por triatominos y seroprevalencia humana. *Medicina (Buenos Aires)*, 65(2), 97-102.
- Bar, M. E., Oscherov, E. B., Pieri Damborsky, M., & Borda, M. (2010). Epidemiología de la tripanosomiasis americana en el Norte de Corrientes. *Medicina (Buenos Aires)*, 70(2), 133-138.
- Barker Jr, R. H. (1990). DNA probe diagnosis of parasitic infections. *Experimental parasitology*, 70(4), 494-499.
- Barreto, M. P., Ribeiro, R. D., & Belda Neto, F. M. (1978). Estudos sobre reservatórios e vectores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. LXVIII: Infecção de mamíferos pela via oral. *Rev Bras Biol*, 38, 455-459.
- Barreto, M. P., & Ribeiro, R. D. (1979). Reservatórios silvestres do *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* Chagas, 1909. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 39, 25-36.
- Barreto, M. P. (1985). Reservorios del *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Chagas 1909). En: *Factores biológicos y ecológicos en la Enfermedad de Chagas*. Ed.: Carcavallo R.U., Rabinovich J.E., Tonn R.J. OPS-ECO/MSAS-SNCH, Buenos Aires. Vol. II, pág. 237-250.
- Bejarano, J. F. R. & Duret, J. P. (1950) Contribución al conocimiento de los flebótomos argentinos (Diptera, Psychodidae). *Revista de la Sanidad Militar Argentina*, 49, 327-336.
- Bernabé, C., Brisse, S., & Tibayrenc, M. (2000). Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. *Parasitology*, 120, 513-26.
- Benzécri, J.P. (1973) . *L'analyse des correspondances*. L'analyse des données (ed. by Dunod), 22nd edn. Université de Paris VI, Paris.
- Berrozpe, P., Lamattina, D., Santini, M. S., Araujo, A. V., Utgés, M. E., & Salomón, O. D. (2017). Environmental suitability for *Lutzomyia longipalpis* in a subtropical city with a recently established visceral leishmaniasis transmission cycle, Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 112, 674-680.
- Bicca-Marques, J. C., & Calegaro-Marques, C. (1994). Activity budget and diet of *Alouatta caraya*: an age-sex analysis. *Folia Primatologica*, 63(4), 216-220.
- Bicca-Marques, J. C. (2003). How do howler monkeys cope with habitat fragmentation?. In *Primates in fragments: Ecology and conservation* (pp. 283-303). Boston, MA: Springer US.

- Bicca-Marques, J. C., & de Freitas, D. S. (2010). The role of monkeys, mosquitoes, and humans in the occurrence of a yellow fever outbreak in a fragmented landscape in south Brazil: protecting howler monkeys is a matter of public health. *Tropical Conservation Science*, 3(1), 78-89.
- Botero, A., Ortiz, S., Muñoz, S., Triana, O., & Solari, A. (2010). Differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* of Colombia using minicircle hybridization tests. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 68(3), 265-270.
- Bravo, S. (2003). Efecto del Carayá (*Alouatta caraya*) en la dinámica y regeneración de las selvas de inundación del Paraná medio. Tesis doctoral. *Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires*.
- Bravo, S. P., & Sallenave, A. (2003). Foraging behavior and activity patterns of *Alouatta caraya* in the northeastern Argentinean flooded forest. *International Journal of Primatology*, 24, 825-846.
- Brividoro, M. V., Kowalewski, M. M., Scarry, C. J., & Oklander, L. I. (2019). Patterns of sleeping site and sleeping tree selection by black-and-gold howler monkeys (*Alouatta caraya*) in northern Argentina. *International Journal of Primatology*, 40(3), 374-392.
- Brown, A. D., & Zunino, G. E. (1994). Hábitat, densidad y problemas de conservación de los primates de Argentina. *Vida Silvestre Neotropical*. 3(1):30-40.
- Bruhn, F. R. P., Morais, M. H. F., Cardoso, D. L., Bruhn, N. C. P., Ferreira, F., & Rocha, C. M. B. M. D. (2018). Spatial and temporal relationships between human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais, 2006–2013. *Parasites & vectors*, 11, 1-11.
- Burgos, J. M., Altcheh, J., Bisio, M., Duffy, T., Valadares, H. M., Seidenstein, M. E., ... & Schijman, A. G. (2007). Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *International Journal for Parasitology*, 37(12), 1319-1327.
- Butcher, L. V. (1991). Monitoring of *Alouatta* monkeys as an early warning system in yellow fever surveillance. In *Studies on the natural history of yellow fever in Trinidad* (pp. 59-62).
- Cabrera, A. L. (1976). *Regiones fitogeográficas de Argentina*. 2da Edición. Editorial ACME, Buenos Aires, 73pp.
- Calvo Mendez, M. L., Nogueda Torres, B., & Aguilar, A. R. (1992). The oral route: an access port for *Trypanosoma cruzi*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 34(1), 39-42.
- Carbajal De La Fuente, A. L., Sánchez-Casaccia, P., Piccinelli, R. V., Provecho, Y., Salvá, L., Meli, S., ... & Nattero, J. (2022). Urban vectors of Chagas disease in the American continent: A systematic review of epidemiological surveys. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 16(12), e0011003.
- Carcavallo, R. U., Rodriguez, M. E., Salvatella, R., Casas, S. I., Sherlock, I. S., Galvão, C., ... & Mendes, J. C. (1998). Habitats and related fauna. En: *Atlas of Chagas disease vectors in the Americas*. (pp. 1109-1109).

- Cardinal, M. V., Lauricella, M. A., Ceballos, L. A., Lanati, L., Marcet, P. L., Levin, M. J., ... & Schijman, A. G. (2008). Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *International Journal for Parasitology*, 38(13), 1533-1543.
- Carlier, Y., & Truyens, C. (2010). Maternal-fetal transmission of *Trypanosoma cruzi*. In *American Trypanosomiasis* (pp. 539-581). Elsevier.
- Carlier, Y., Sosa-Estani, S., Luquetti, A. O., & Buekens, P. (2015). Congenital Chagas disease: an update. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110, 363-368.
- Carrillo-Bilbao, G., Martin-Solano, S., & Saegerman, C. (2021). Zoonotic blood-borne pathogens in non-human primates in the Neotropical Region: a systematic review. *Pathogens*, 10(8), 1009.
- Ceballos, L. A., Vazquez-Prokopec, G. M., Cecere, M. C., Marcet, P. L., & Gürtler, R. E. (2005). Feeding rates, nutritional status and flight dispersal potential of peridomestic populations of *Triatoma infestans* in rural northwestern Argentina. *Acta Tropica*, 95(2), 149-159.
- Ceballos, L. A., Cardinal, M. V., Vazquez-Prokopec, G. M., Lauricella, M. A., Orozco, M. M., Cortinas, R., ... & Gürtler, R. E. (2006). Long-term reduction of *Trypanosoma cruzi* infection in sylvatic mammals following deforestation and sustained vector surveillance in northwestern Argentina. *Acta tropica*, 98(3), 286-296.
- Ceballos, L. A., Piccinali, R. V., Berkunsky, I., Kitron, U., & Gürtler, R. E. (2009). First finding of melanic sylvatic *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) colonies in the Argentine Chaco. *Journal of medical entomology*, 46(5), 1195-1202.
- Ceballos, L. A. (2010). Ciclo silvestre de transmisión de *Trypanosoma cruzi* en el noroeste de argentina. Universidad de Buenos Aires. Tesis presentada para optar al título de Doctor en el área Ciencias Biológicas.
- Cécere, M. C., Cardinal, M. V., Arrabal, J. P., Moreno, C., & Gürtler, R. E. (2015). *Microcavia australis* (Caviidae, Rodentia), a new highly competent host of *Trypanosoma cruzi* I in rural communities of northwestern Argentina. *Acta Tropica*, 142, 34-40.
- Cerisola, J. A., del Prado, C. E., Rohwedder, R., & Bozzini, J. P. (1971). *Blastocrithidia triatomae* n. sp. found in *Triatoma infestans* from Argentina. *The Journal of Protozoology*, 18(3), 503-506.
- Cerisola, J. A., Rohwedder, R., Segura, E. L., Del Prado, C. E., Alvarez, M., & De Martini, G. J. W. (1974). Xenodiagnosis. *Xenodiagnosis*. 127 pp. Secretaría de Estado de Salud Pública, Buenos Aires, Argentina.
- Chaves, L. F., Hernandez, M. J., Dobson, A. P., & Pascual, M. (2007). Sources and sinks: revisiting the criteria for identifying reservoirs for American cutaneous leishmaniasis. *Trends in parasitology*, 23(7), 311-316.
- Chiurillo, M. A., Crisante, G., Rojas, A., Peralta, A., Dias, M., Guevara, P., ... & Ramírez, J. L. (2003). Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infection by duplex PCR assay based on telomeric sequences. *Clinical and Vaccine Immunology*, 10(5), 775-779.
- Chagas, C. (1908). *Trypanosoma minasense* (Nota preliminar). *Brazil-Medico*, Num. 48.

- Chagas, C. (1909). Nova tripanozomiase humana. The new human tripanosomiase. Studies about morphology and life cycle of *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., etiologic agent of the new human morbidity. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1, 159-2118.
- Chinchilla, M., Troyo, A., Guerrero, O. M., Gutierrez-espeleta, G. A., & Sánchez, R. (2005). Presencia de *Trypanosoma minasense* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) en *Alouatta palliata* (Primates: Cebidae) de Costa Rica. *Parasitología latinoamericana*, 60(1-2), 90-92.
- Cohen, J. E., & Gürtler, R. E. (2001). Modeling household transmission of American trypanosomiasis. *Science*, 293(5530), 694-698.
- Córdoba Lanús, E., Piñero, J. E., González, A. C., Valladares, B., Lizarralde de Grosso, M., & Salomón, O. D. (2005). Detection of *Leishmania braziliensis* in human paraffin-embedded tissues from Tucumán, Argentina by polymerase chain reaction. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100, 187-192.
- Córdoba-Lanús, E., De Grosso, M. L., Piñero, J. E., Valladares, B., & Salomón, O. D. (2006). Natural infection of *Lutzomyia neivai* with *Leishmania* spp. in northwestern Argentina. *Acta Tropica*, 98(1), 1-5.
- Cortez, M., Silva, M. R., Neira, I., Ferreira, D., Sasso, G. R., Luquetti, A. O., ... & Yoshida, N. (2006). *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp90 downregulates invasion of gastric mucosal epithelium in orally infected mice. *Microbes and Infection*, 8(1), 36-44.
- Cortez, A. M., Silva, V. P. M., Queiroz, P. V. S., Andrade, H. T. A., Loiola, M. I. B., & Ximenes, M. F. F. M. (2007). Vertical stratification and development aspects of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in an area of Atlantic Forest tree species in a metropolitan region in northeastern Brazil. *Journal of Vector Ecology*, 32(2), 336-341.
- Crockett, C. M., & Eisenberg, J. F. (1987). Howlers: variations in group size and demography. *Primate societies*, 54-68.
- Cruz-Guzmán, P. J., Morocoima, A., Chique, J. D., Ramonis-Quintero, J., Toquero Uzcátegui, & M., Carrasco, H. J. (2014). *Psammolestes arthuri* naturally infected with *Trypanosoma cruzi* found in sympatry with *Rhodnius prolixus* and *Triatoma maculata* on bird nests in Anzoátegui state, Venezuela. *Saber Univ. Oriente Venezuela*, 26, 428-440.
- Cuba Cuba, C. A., Torno, C. O., Ledesma, O., Visciarelli, E., Garcia, S., Prat, M. I., ... & Evans, D. A. (1996). Human cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* in Santiago del Estero, Argentina: identification of parasites by monoclonal antibodies and isoenzymes. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 38, 413-421.
- Cura, C. I. (2014). Desarrollo, estandarización y aplicación de herramientas de tipificación molecular de poblaciones de *Trypanosoma cruzi* en muestras clínicas, vectores y reservorios de la enfermedad de Chagas. *Universidad de Buenos Aires*.
- D'Alessandro, A. (1976). Biology of *Trypanosoma* (*Herpetosoma*) *rangeli* Tejera, 1920. In: Lumsden WHR, Evans DA (eds) *Biology of Kinetoplastida*. Academic Press, London Vol. 1, p. 327-403.

- D'Alessandro & A., Saravia, N. G. (1992). *Trypanosoma rangeli*. In: Kreier J, Baker JR (eds) *Parasitic protozoa*, 2nd edition, Academic Press, New York, Vol 2, p 1-45.
- Damborsky, M. P., Bar, M. E., & Oscherov, E. B. (2001). Detection of triatomines (Hemiptera: Reduviidae) in domiciliary and extra-domiciliary ecotopes, Corrientes, Argentina. *Cadernos de Saúde Pública*, 17, 843-849.
- Danesi, E., Olenka Codebó, M., & Sosa-Estani, S. (2019). Transmisión congénita de *Trypanosoma cruzi*: Argentina 2002-2014. *Medicina (Buenos Aires)*, 79(2), 81-89.
- Da Silva, F. M., Naiff, R. D., Marcili, A., Gordo, M., Neto, J. D. A., Naiff, M. D. F., ... & Miles, M. A. (2008). Infection rates and genotypes of *Trypanosoma rangeli* and *T. cruzi* infecting free-ranging *Saguinus bicolor* (Callitrichidae), a critically endangered primate of the Amazon Rainforest. *Acta tropica*, 107(2), 168-173.
- Da Silva, M. A. D., Oliveira, M. R., Schettino, S. C., dos Santos, I. G., Neto, M. B. O., da Silva, W. S. I., ... & Lima, V. F. S. (2021). New insights on severe clinical manifestations and deaths from visceral leishmaniasis in free-living crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*) in Brazil. *Research, Society and Development*, 10(16), e108101622869-e108101622869.
- Deane, L. M., da SILVA, J. E., & Loures Filho, L. (1974). Nycthemeral variation in the parasitaemia of *Trypanosoma minasense* in naturally infected marmosets of the genus *Callithrix* (Primates. Callithricidae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 16(1), 1-6.
- De Carvalho, M. R., Valenca, H. F., Da Silva, F. J., de Pita-Pereira, D., de Araújo Pereira, T., Britto, C., ... & Brandão Filho, S. P. (2010). Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. *Acta tropica*, 116(1), 108-110.
- De Lana, M. (2017). Experimental studies of Chagas disease in animal models. In *American Trypanosomiasis Chagas Disease* (pp. 299-320). Elsevier.
- De Oliveira Barbosa, W., Coelho, T. G., da Costa, T. O., Paiz, L. M., Fornazari, F., Langoni, H., ... & Alves Freitas, C. I. (2020). Antibodies to *Toxoplasma gondii*, *Leishmania* spp., and *Leptospira* spp. in free-ranging six-banded armadillos (*Euphractus sexcinctus*) from Northeastern Brazil. *The Journal of Wildlife Diseases*, 56(2), 486-488.
- De Resende, D. M., Pereira, L. H., & Lôbo, A. (1994). Long-term patency of blood parasitism by *Trypanosoma minasense* and Microfilariae in *Callithrix penicillata* marmosets (Primates, Callitrichidae), caught at the wild and maintained in captivity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 89, 127-128.
- Dias, J. C. P., Silveira, A. C., & Schofield, C. J. (2002). The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97, 603-612.
- Dias, P. A. D., & Rangel-Negrín, A. (2015). Diets of howler monkeys. *Howler monkeys: Behavior, ecology, and conservation*, 21-56.

- Dias-Lima, A., Bermúdez, E. C., Medeiros, J. F. D., & Sherlock, I. (2002). Estratificação vertical da fauna de flebótomos (Diptera, Psychodidae) numa floresta primária de terra firme da Amazônia Central, Estado do Amazonas, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 18(3), 823-832.
- Di Fiore, A., Link, A., Campbell, C. (2011). The atelines: behavioral and socioecological diversity in a New World monkey radiation. En: Campbell, C. J., Fuentes, A., MacKinnon, K. C., Panger, M., Beader, S. (eds) *Primates in perspective*, 2.a ed. Oxford University Press, Oxford, UK, pp 155-188.
- Diosque, P., Barnabé, C., Padilla, A. M., Marco, J. D., Cardozo, R. M., Cimino, R. O., ... & Basombrío, M. A. (2003). Multilocus enzyme electrophoresis analysis of *Trypanosoma cruzi* isolates from a geographically restricted endemic area for Chagas' disease in Argentina. *International Journal for Parasitology*, 33(10), 997-1003.
- Diotaiuti, L., Pereira, A. S., Loiola, C. F., Fernandes, A. J., Schofield, J. C., Dujardin, J. P., ... & Chiari, E. (1995). Inter-relation of sylvatic and domestic transmission of *Trypanosoma cruzi* in areas with and without domestic vectorial transmission in Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 90, 443-448.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2014). InfoStat versión 2014. *InfoStat Group*, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Duffy, T., Bisio, M., Altcheh, J., Burgos, J. M., Diez, M., Levin, M. J., ... & Schijman, A. G. (2009). Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in Chagas disease patients. *PLoS neglected tropical diseases*, 3(4), e419.
- Duffy, T., Cura, C. I., Ramirez, J. C., Abate, T., Cayo, N. M., Parrado, R., ... & Schijman, A. G. (2013). Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(1), e2000.
- Dunn, F. L., Lambrecht, F. L., & Du Plessis, R. (1963). Trypanosomes of South American monkeys and marmosets. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 12(4), 524-34.
- Félix de Lima, V. M., Santiago, M. E. B., da Cruz Sanches, L., & De Lima, B. D. (2012). Molecular diagnosis of *Leishmania amazonensis* in a captive spider monkey in Bauru, São Paulo, Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 43(4), 943-945.
- Fowler, M. E. (2008). *Restraint and Handling of Wild and Domestic Animals*. 3rd edition, Wiley-Blackwell, Part 1, pp 5-96.
- El Tai, N. O., Osman, O. F., El Fari, M., Presber, W., & Schönian, G. (2000). Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(5), 575-579.

- Enriquez, G. F., Cardinal, M. V., Orozco, M. M., Lanati, L., Schijman, A. G., & Gürtler, R. E. (2013). Discrete typing units of *Trypanosoma cruzi* identified in rural dogs and cats in the humid Argentinean Chaco. *Parasitology*, 140(3), 303-308.
- Escobar, J., Bello, F. J., Morales, A., Moncada, L., & Cárdenas, E. (2004). Life tables and reproductive parameters of *Lutzomyia spinicrassa* (Diptera: Psychodidae) under laboratory conditions. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99, 603-607.
- Espinola Carvalho, C. M., Andrade, M. C. R., Xavier, S. S., Mangia, R. H. R., Britto, C. C., Jansen, A. M., ... & Almeida, M. D. B. (2003). Chronic Chagas' disease in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): evaluation of parasitemia, serology, electrocardiography, echocardiography, and radiology. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68(6), 683-691.
- Falasca, C. A., Grana, D. R., Mareso, E. A., Gomez, E., & Gili, M. M. (1991). Electrocardiographic changes in chronic *Trypanosoma cruzi* infected *Cebus apella* monkeys. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 56(4):287-293.
- Fernández, V. A. (2014). *Ecología nutricional del mono aullador negro y dorado (Alouatta caraya) en el límite sur de su distribución*. Tesis de doctorado. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- Fernández, M. S., Salomón, O. D., Cavia, R., Perez, A. A., Acardi, S. A., & Guccione, J. D. (2010). *Lutzomyia longipalpis* spatial distribution and association with environmental variables in an urban focus of visceral leishmaniasis, Misiones, Argentina. *Acta Tropica*, 114(2), 81-87.
- Fernández, M. S., Martínez, M. F., Pérez, A. A., Santini, M. S., Gould, I. T., & Salomón, O. D. (2015). Performance of light-emitting diode traps for collecting sand flies in entomological surveys in Argentina. *Journal of Vector Ecology*, 40(2), 373-378.
- Fernández, M. S., Fraschina, J., Acardi, S., Liotta, D. J., Lestani, E., Giuliani, M., ... & Salomón, O. D. (2018). Assessment of the role of small mammals in the transmission cycle of tegumentary leishmaniasis and first report of natural infection with *Leishmania braziliensis* in two sigmodontines in northeastern Argentina. *Parasitology research*, 117, 405-412.
- Frank, F. M., Fernández, M. M., Taranto, N. J., Cajal, S. P., Margni, R. A., Castro, E., ... & Malchiodi, E. L. (2003). Characterization of human infection by *Leishmania* spp. in the Northwest of Argentina: immune response, double infection with *Trypanosoma cruzi* and species of *Leishmania* involved. *Parasitology*, 126(1), 31-39.
- Funayama, G. K., & Baretto, M. P. (1970). Estudos sobre reservatórios e vectores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XLII. Infecção natural do simio, *Alouatta caraya* (Humboldt, 1812) pelo T. cruzi. *Rev. Inst. Med. Trop. So Paulo*, 12(4), 257-265.
- Galati, E. A. B. Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América (2003) Flebotomíneos Do Brasil. *EF Rangel, R Lainson, Fiocruz, Rio de Janeiro*, 53-175.
- García Bustos, M. F., González-Prieto, G., Ramos, F., Mora, M. C., Hashiguchi, Y., Parodi, C., ... & Barrio, A. (2016). Clinical and epidemiological features of leishmaniasis in northwestern-Argentina through a retrospective analysis of recent cases. *Acta tropica*, 154, 125-132.

- Gaunt, M., & Miles, M. (2000). The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95, 557-565.
- Grimaldi Jr, G., & Tesh, R. (1993). Leishmanias of the New World: current concepts and implications for future research. *Clinical microbiology reviews*, 6(3), 230-250.
- Gillespie, T. R., & Chapman, C. A. (2008). Forest fragmentation, the decline of an endangered primate, and changes in host-parasite interactions relative to an unfragmented forest. *American Journal of Primatology: Official Journal of the American Society of Primatologists*, 70(3), 222-230.
- Guiraldi, L. M., Dos Santos, W. J., Manzini, S., Taha, N. E. H., Aires, I. N., Ribeiro, E., ... & Lucheis, S. B. (2022). Identification of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in captive primates from a zoo in Brazil. *American Journal of Primatology*, 84(4-5), e23376.
- Gurgel-Goncalves, R., Cura, C., Schijman, A. G., & Cuba, C. A. C. (2012). Infestation of *Mauritia flexuosa* palms by triatomines (Hemiptera: Reduviidae), vectors of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian savanna. *Acta tropica*, 121(2), 105-111.
- Gürtler, R. E., Segura, E. L., & Cohen, J. E. (2003). Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. *Emerging infectious diseases*, 9(1), 29.
- Gürtler, R. E. (2007). Eco-epidemiología regional de la transmisión vectorial: Enfermedad de Chagas en el Gran Chaco. En “La enfermedad de Chagas a la puerta de los 100 años del conocimiento de una endemia americana, 1909-2006”. *Organización Panamericana de la Salud*. 137-155.
- Gürtler, R. E., Kitron, U., Cecere, M. C., Segura, E. L., & Cohen, J. E. (2007). Sustainable vector control and management of Chagas disease in the Gran Chaco, Argentina. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(41), 16194-16199.
- Gürtler, R. E. (2009). Sustainability of vector control strategies in the Gran Chaco Region: current challenges and possible approaches. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 52-59.
- Hall, T. A. (1999, January). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, No. 41, pp. 95-98).
- Haydon, D. T., Cleaveland, S., Taylor, L. H., & Laurenson, M. K. (2002). Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerging infectious diseases*, 8(12), 1468-1473.
- Herrer, A., Christensen, H. A., & Beumer, R. J. (1973). Reservoir hosts of cutaneous leishmaniasis among Panamanian forest mammals. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 22(5), 585-591.
- Herrer, A., & Christensen, H. A. (1976). Epidemiological patterns of cutaneous leishmaniasis in Panama. III. Endemic persistence of the disease. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 25(1), 54-58.
- Higo, H., Miura, S., Horio, M., Mimori, T., Hamano, S., Agatsuma, T., ... & Himeno, K. (2004). Genotypic variation among lineages of *Trypanosoma cruzi* and its geographic aspects. *Parasitology international*, 53(4), 337-344.

- Hoare, C. A. (1972). The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. *Blackwell Scientific Publication*, Oxford. U.K., p. 749.
- Hoft, D. F., Farrar, P. L., Kratz-Owens, K., & Shaffer, D. (1996). Gastric invasion by *Trypanosoma cruzi* and induction of protective mucosal immune responses. *Infection and immunity*, 64(9), 3800-3810.
- Holzmann, I., Agostini, I., Areta, J. I., Ferreyra, H., Beldomenico, P., & Di Bitetti, M. S. (2010). Impact of yellow fever outbreaks on two howler monkey species (*Alouatta guariba clamitans* and *A. caraya*) in Misiones, Argentina. *American Journal of Primatology: Official Journal of the American Society of Primatologists*, 72 (6), 475-480.
- Honigberg, B. M. (1963). A contribution to systematics of the non-pigmented flagellates. *Progress in protozoology*, 68-69.
- Hotez, P. J. (2018). Human parasitology and parasitic diseases: heading towards 2050. *Advances in Parasitology*, 100, 29-38.
- Humberg, R. M., Oshiro, E. T., e Cruz, M. D. S. P., Ribolla, P. E., Alonso, D. P., Ferreira, A. M., ... & de Oliveira, A. G. (2012). *Leishmania chagasi* in opossums (*Didelphis albiventris*) in an urban area endemic for visceral leishmaniasis, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 87(3), 470.
- Hwang, W. S., & Weirauch, C. (2012). Evolutionary history of assassin bugs (Insecta: Hemiptera: Reduviidae): insights from divergence dating and ancestral state reconstruction.
- Jansen, A. M., Xavier, S. C., & Roque, A. L. R. (2015). The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. *Acta tropica*, 151, 1-15.
- Jansen, A. M., Xavier, S. C. D. C., & Roque, A. L. R. (2018). *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. *Parasites & vectors*, 11, 1-25.
- Junqueira, A. C., Degrave, W., & Brandão, A. (2005). Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. *Trends in parasitology*, 21(6), 270-272.
- Klepac, P., Hsieh, J. L., Ducker, C. L., Assoum, M., Booth, M., Byrne, I., Dodson, S., Martin, D. L., Turner, C. M. R., van Daalen, K. R., Abela, B., Akamboe, J., Alves, F., Brooker, S. J., Ciceri-Reynolds, K., Cole, J., Desjardins, A., Drakeley, C., Ediriweera, D. S., Ferguson, N. M., ... Fall, I. S. (2024). Climate change, malaria and neglected tropical diseases: a scoping review. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 118(9), 561-579.
- Kowalewski, M., & Zunino, G. E. (2004). Birth seasonality in *Alouatta caraya* in Northern Argentina. *International Journal of Primatology*, 25, 383-400.
- Kowalewski, M. M., & Zunino, G. (2005). The Parasite Behavior Hypothesis and the Use of Sleeping Sites by Black Howler Monkeys (*Alouatta caraya*) in a Discontinuous Forest. *Neotropical Primates*, 13(1), 22-26.
- Kowalewski, M. M. (2007). *Patterns of affiliation and co-operation in howler monkeys: an alternative model to explain social organization in non-human primates* (Doctoral dissertation, University of Illinois at Urbana-Champaign).

- Kowalewski, M. M., & Gillespie, T. R. (2009). Ecological and anthropogenic influences on patterns of parasitism in free-ranging primates: a meta-analysis of the genus *Alouatta*. *South American primates: Comparative perspectives in the study of behavior, ecology, and conservation*, 433-461.
- Kowalewski, M. M., & Garber, P. A. (2010). Mating promiscuity and reproductive tactics in female black and gold howler monkeys (*Alouatta caraya*) inhabiting an island on the Paraná River, Argentina. *American Journal of Primatology*, 72(8), 734-748.
- Kowalewski, M. M., Salzer, J. S., Deutsch, J. C., Raño, M., Kuhlenschmidt, M. S., & Gillespie, T. R. (2011). Black and gold howler monkeys (*Alouatta caraya*) as sentinels of ecosystem health: patterns of zoonotic protozoa infection relative to degree of human-primate contact. *American Journal of Primatology*, 73(1), 75-83.
- Kowalewski, M. M., Pave, R., Fernandez, V. A., Raño, M., & Zunino, G. (2019). Life-history traits and group dynamic in black and gold howler monkeys in flooded forests of northern Argentina. In Cambridge University Press (Ed.), *Primates in flooded habitats: Ecology and conservation*.
- Kondratieff, B. C., Moore, C. G., Freier, J. E., Hagedorn, H. H., Black, W. C., James, A. A., & Hemingway, A. J. (2005). *Biology of Disease Vectors*, W. C. Marquardt, Ed. Elsevier Academic Press, 2005.
- Kreeger, T., Arnemo, J. M., Caulkett, N. A., Hampton, J. O., & Meyer, L. C. (2023). *Handbook of wildlife chemical immobilization*. 6th ed. Terry Kreeger.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547-1549.
- Kuthyar, S., Kowalewski, M. M., Seabolt, M., Roellig, D. M., & Gillespie, T. R. (2022). Molecular characterization of *Giardia duodenalis* and evidence for cross-species transmission in Northern Argentina. *Transboundary and emerging diseases*, 69(4), 2209-2218.
- Lah, E. F. C., Ahamad, M., Haron, M. S., & Ming, H. T. (2012). Establishment of a molecular tool for blood meal identification in Malaysia. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 2(3), 223-227.
- Lainson, R., Braga, R. R., De Souza, A. A. A., Povoa, M. M., Ishikawa, E. A. Y., & Silveira, F. T. (1989). *Leishmania* (Viannia) *shawi* sp. n., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil. *Annales de parasitologie humaine et comparée*, 64(3), 200-207.
- Lake, J. A., De La Cruz, V. F., Ferreira, P. C., Morel, C., & Simpson, L. (1988). Evolution of parasitism: kinetoplastid protozoan history reconstructed from mitochondrial rRNA gene sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(13), 4779-4783.
- Lent, H., & Wygodzinsky, P. (1979). Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bulletin of American Museum of Natural History*. 163: 155.

- Lewis, M. D., Ma, J., Yeo, M., Carrasco, H. J., Llewellyn, M. S., & Miles, M. A. (2009). Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: systematic selection of assays allowing rapid and accurate discrimination of all known lineages. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(6), 1041.
- Lisboa, C. V., Dietz, J., Baker, A. J., Russel, N. N., & Jansen, A. M. (2000). *Trypanosoma cruzi* infection in *Leontopithecus rosalia* at the Reserva Biológica de Poco das Antas, Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95, 445-452.
- Lisboa, C. V., Mangia, R. H., Luz, S. L. B., Kluczkowski, A., Ferreira, L. F., Ribeiro, C. T., ... & Jansen, A. M. (2006). Stable infection of primates with *Trypanosoma cruzi* I and II. *Parasitology*, 133(5), 603-611.
- Lisboa, C. V., Monteiro, R. V., Martins, A. F., Xavier, S. C. D. C., Lima, V. D. S., & Jansen, A. M. (2015). Infection with *Trypanosoma cruzi* TcII and TcI in free-ranging population of lion tamarins (*Leontopithecus* spp): an 11-year follow-up. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(3), 394-402.
- Llewellyn, M. S., Lewis, M. D., Acosta, N., Yeo, M., Carrasco, H. J., Segovia, M., ... & Gaunt, M. W. (2009). *Trypanosoma cruzi* IIc: phylogenetic and phylogeographic insights from sequence and microsatellite analysis and potential impact on emergent Chagas disease. *PLoS neglected tropical diseases*, 3(9), e510.
- Lombardi, M. C., Turchetti, A. P., Tinoco, H. P., Pessanha, A. T., Soave, S. A., Malta, M. C., ... & Santos, R. L. (2014). Diagnosis of *Leishmania infantum* infection by Polymerase Chain Reaction in wild mammals. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 34, 1243-1246.
- Lucero H. 2021. Nota periodística “Dengue, chagas y paracoccidioidomicosis, enfermedades del NEA que requieren atención de poblaciones vulnerables”. En *Corrientes Hoy*, 18 de octubre de 2021. <https://www.corrienteshoy.com/info-general/dengue-chagas-y-paracoccidioidomicosis-enfermedades-del-nea-que-requieren-atencion-de-poblaciones-vulnerables.htm>
- Macedo, A. M., Oliveira, R. P., & Pena, S. D. (2002). Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. *Expert reviews in molecular medicine*, 4(5), 1-16.
- Maffey, L., Cardinal, M. V., Ordóñez-Krasnowski, P. C., Lanati, L. A., Lauricella, M. A., Schijman, A. G., & Görtler, R. E. (2012). Direct molecular identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in domestic and peridomestic *Triatoma infestans* and *Triatoma sordida* from the Argentine Chaco. *Parasitology*, 139(12), 1570-1579.
- Malta, M. C. C., Tinoco, H. P., Xavier, M. N., Vieira, A. L. S., Costa, É. A., & Santos, R. L. (2010). Naturally acquired visceral leishmaniasis in non-human primates in Brazil. *Veterinary parasitology*, 169(1-2), 193-197.
- Marcili, A., Valente, V. C., Valente, S. A., Junqueira, A. C., da Silva, F. M., das Neves Pinto, A. Y., ... & Teixeira, M. M. (2009a). *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *International Journal for Parasitology*, 39(5), 615-623.

- Marcili, A., Lima, L., Cavazzana, M., Junqueira, A. C. V., Veludo, H. H., Da Silva, F. M., ... & Teixeira, M. M. G. (2009b). A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology*, 136(6), 641-655.
- Marco, J. D., Barroso, P. A., Mimori, T., Locatelli, F. M., Tomatani, A., Mora, M. C., ... & Hashiguchi, Y. (2012). Polymorphism-specific PCR enhances the diagnostic performance of American tegumentary leishmaniasis and allows the rapid identification of *Leishmania* species from Argentina. *BMC Infectious Diseases*, 12, 1-8.
- Marti, G. A., Echeverria, M. G., Waleckx, E., Susevich, M. L., Balsalobre, A., & Gorla, D. E. (2014). Triatominae in furnariiid nests of the Argentine Gran Chaco. *Journal of Vector Ecology*, 39(1), 66-71.
- Martínez, M. F., Kowalewski, M. M., Salomón, O. D., & Schijman, A. G. (2016). Molecular characterization of trypanosomatid infections in wild howler monkeys (*Alouatta caraya*) in northeastern Argentina. *International journal for parasitology: Parasites and wildlife*, 5(2), 198-206.
- Medkour, H., Davoust, B., Levasseur, A., & Mediannikov, O. (2019). Molecular evidence of *Leishmania infantum* and *Leishmania guyanensis* in red howler monkey (*Alouatta seniculus*) from French Guiana. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 19(12), 896-900.
- Miles, M. A., Feliciangeli, M. D., & de Arias, A. R. (2003). American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *Bmj*, 326(7404), 1444-1448.
- Minter D. M. (1976). Effects on transmission to man of the presence of domestic animals in infested households. En: *Pan American Health Organization, New Approaches in American Trypanosomiasis Research*. Scientific Publication No. 318, pág. 330-337.
- Molyneux, D. H. & Ashford, R. W. (1983). The Biology of *Trypanosoma* and *Leishmania*: Parasites of man and domestic animals (Taylor and Francis, London) (pp. xi+-294).
- Monteiro, R. V., Baldez, J., Dietz, J., Baker, A., Lisboa, C. V., & Jansen, A. M. (2006). Clinical, biochemical, and electrocardiographic aspects of *Trypanosoma cruzi* infection in free-ranging golden lion tamarins (*Leontopithecus rosalia*). *Journal of medical primatology*, 35(1), 48-55.
- Moreno, J., & Alvar, J. (2002). Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in parasitology*, 18(9), 399-405.
- Moreno, E. S., Agostini, I., Holzmann, I., Di Bitetti, M. S., Oklander, L. I., Kowalewski, M. M., ... & Miller, P. (2015). Yellow fever impact on brown howler monkeys (*Alouatta guariba clamitans*) in Argentina: a metamodeling approach based on population viability analysis and epidemiological dynamics. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110, 865-876.
- Moya, S. L., Giuliani, M. G., Acosta, M. M., Salomón, O. D., & Liotta, D. J. (2015). First description of *Migonemyia migonei* (França) and *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) (Psychodidae:

- Phlebotominae) natural infected by *Leishmania infantum* in Argentina. *Acta Tropica*, 152, 181-184.
- Moya, S. L., Giuliani, M. G., Santini, M. S., Quintana, M. G., Salomón, O. D., & Liotta, D. J. (2017). *Leishmania infantum* DNA detected in phlebotomine species from Puerto Iguazú City, Misiones province, Argentina. *Acta Tropica*, 172, 122-124.
- Moya L., (2022). Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas: "Taxonomía molecular de phlebotominae (Diptera: Psychodidae) y su aplicabilidad a estudios ecoepidemiológicos en zonas endémicas de leishmaniasis en argentina". *Universidad Nacional de Córdoba*.
- Moya, S. L., Szelag, E. A., Manteca-Acosta, M., Quintana, M. G., & Salomón, O. D. (2022). Update of the Phlebotominae fauna with new records for Argentina and observations on Leishmaniasis transmission scenarios at a regional scale. *Neotropical Entomology*, 51(2), 311-323.
- MSAL. (2021). Salud continua trabajando en la prevención y control de la enfermedad de Chagas. Ministerio de Salud de la Nación. <https://www.argentina.gob.ar/noticias/salud-continua-trabajando-en-la-prevencion-y-control-de-la-enfermedad-de-chagas>.
- Nóbrega, A. A., Garcia, M. H., Tatto, E., Obara, M. T., Costa, E., Sobel, J., & Araujo, W. N. (2009). Oral transmission of Chagas disease by consumption of açaí palm fruit, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 15(4), 653-5.
- Noireau, F., Flores, R., & Vargas, F. (1999). Trapping sylvatic Triatominae (Reduviidae) in hollow trees. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(1), 13-14.
- Noireau, F., Flores, R., Gutierrez, T., Abad-Franch, F., Flores, E., & Vargas, F. (2000). Natural ecotopes of *Triatoma infestans* dark morph and other sylvatic triatomines in the Bolivian Chaco. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(1), 23-27.
- Noireau, F., & Dujardin, J. P. (2001). Flight and nutritional status of sylvatic *Triatoma sordida* and *Triatoma guasayana*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96, 385-389.
- Noireau, F., Abad-Franch, F., Valente, S. A., Dias-Lima, A., Lopes, C. M., Cunha, V., ... & Jurberg, J. (2002). Trapping Triatominae in silvatic habitats. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97, 61-63.
- Noireau, F., Cortez, M. G. R., Monteiro, F. A., Jansen, A. M., & Torrico, F. (2005). Can wild *Triatoma infestans* foci in Bolivia jeopardize Chagas disease control efforts?. *Trends in Parasitology*, 21(1), 7-10.
- Noireau, F., Diosque, P., & Jansen, A. M. (2009). *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Veterinary research*, 40(2).
- OMS (2024). La enfermedad de Chagas (trypanosomiasis americana). Organización Mundial de la Salud. [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
- Oklander, L. I., Zunino, G. E., Di Fiore, A., & Corach, D. (2007). Isolation, characterization and evaluation of 11 autosomal STRs suitable for population studies in black and gold howler monkeys *Alouatta caraya*. *Molecular Ecology Notes*, 7(1), 117-120.

- Oklander, L. I., Miño, C. I., Fernández, G., Caputo, M., & Corach, D. (2017). Genetic structure in the southernmost populations of black-and-gold howler monkeys (*Alouatta caraya*) and its conservation implications. *PLoS One*, 12(10), e0185867.
- Oklander, L., Kowalewski, M., Peker, S., Pavé, R., Agostini, I., Holzmann, I., Apellaniz, M. (2019). *Alouatta caraya*. Categorización 2019 de los mamíferos de Argentina según su riesgo de extinción. *Lista Roja de los mamíferos de Argentina*. SAyDS-SAREM (eds.). Versión digital: <http://cma.sarem.org.ar>.
- Oliveira, D. M. S. D., Saraiva, E. M., Ishikawa, E. A. Y., Sousa, A. A. A. D., Silva, E. O. D., & Silva, I. M. D. (2011). Distribution of phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) across an urban-rural gradient in an area of endemic visceral leishmaniasis in northern Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106, 1039-1044.
- Orozco, M. (2012). Circulación de múltiples agentes infecciosos entre mamíferos silvestres y domésticos del Chaco Argentino. Universidad de Buenos Aires. *Tesis presentada para optar al título de Doctor en el área de Ciencias Biológicas*.
- Orozco, M. M., Enriquez, G. F., Alvarado-Otegui, J. A., Cardinal, M. V., Schijman, A. G., Kitron, U., & Gürtler, R. E. (2013). New sylvatic hosts of *Trypanosoma cruzi* and their reservoir competence in the humid Chaco of Argentina: a longitudinal study. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(5), 872.
- Orozco, M. M., Enriquez, G. F., Cardinal, M. V., Piccinelli, R. V., & Gürtler, R. E. (2016). A comparative study of *Trypanosoma cruzi* infection in sylvatic mammals from a protected and a disturbed area in the Argentine Chaco. *Acta tropica*, 155, 34-42.
- Paiz, L. M., Motoie, G., Richini-Pereira, V. B., Langoni, H., Menozzi, B. D., Tolezano, J. E., & Donalisio, M. R. (2019). Antibodies and molecular detection of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* in samples of free-ranging marmosets (Primates: Callitrichidae: *Callithrix* spp.) in an area of canine visceral leishmaniasis in Southeastern Brazil. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 19(4), 249-254.
- Pedersen, A. B., & Davies, T. J. (2009). Cross-species pathogen transmission and disease emergence in primates. *EcoHealth*, 6, 496-508.
- Pita-Pereira, D., De Alves, C. R., Souza, M. B., Brazil, R. P., Bertho, A. L., Figueiredo Barbosa, A., & De Britto, C. C. (2005). Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 99, 905-913.
- Podlipaev, S. A. (2000). Insect trypanosomatids: the need to know more. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95, 517-522.
- Provecho, Y. M., Fernández, M. D. P., Salvá, L., Meli, S., Cano, F., Sartor, P., & Carbajal-de-la-Fuente, A. L. (2021). Urban infestation by *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae), an overlooked phenomena for Chagas disease in Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 116, e210056.

- Pujol, F. H. (2006). Virus en primates no humanos: Zoonosis, Antroponosis y Biodiversidad. *Interciencia*, 31(6), 396-402.
- Ramirez, L. E., Lages-Silva, E., Alvarenga-Franco, F., Matos, A., Vargas, N., Fernandes, O., & Zingales, B. (2002). High prevalence of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in opossums and triatomids in a formerly-endemic area of Chagas disease in Southeast Brazil. *Acta tropica*, 84(3), 189-198.
- Ramírez, J. C., Cura, C. I., da Cruz Moreira, O., Lages-Silva, E., Juiz, N., Velázquez, E., ... & Schijman, A. G. (2015). Analytical validation of quantitative real-time PCR methods for quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 17(5), 605-615.
- Rangel, E. F., Souza, N. A., Wermelinger, E. D., Barbosa, A. F., & Andrade, C. A. (1986). Biologia de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 e *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae), em condições experimentais. I. aspectos da alimentação de larvas e adultos. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 81, 431-438.
- Rangel, E. F., & Lainson, R. (2009). Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 937-954.
- Rangel, O., Sampaio, S. M. P., Ciaravolo, R. M. D. C., & Holcman, M. M. (2012). The distribution pattern of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in the peridomestic of a sector with canine and human visceral leishmaniasis transmission in the municipality of Dracena, São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107, 163-169.
- Recalde, O. D. S., Brunelli, J. P., Rolon, M. S., de Arias, A. R., Aldama, O., & Gómez, C. V. (2019). First molecular report of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* and *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* in paraguayan inhabitants using high-resolution melt-PCR. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(4), 780.
- Riarte, A., Sinagra, A., Lauricella, M., Bolomo, N., Moreno, M., Cossio, P., ... & Segura, E. L. (1995). Chronic experimental infection by *Trypanosoma cruzi* in *Cebus apella* monkeys. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 90, 733-740.
- Ridel, G. M., Luis, I. R., & Teja, J. (2004). Las enfermedades emergentes y reemergentes: un problema de salud en las Américas. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 15(4), 285-287.
- Rocha, F. L., Roque, A. L. R., de Lima, J. S., Cheida, C. C., Lemos, F. G., de Azevedo, F. C., ... & Jansen, A. M. (2013). *Trypanosoma cruzi* infection in neotropical wild carnivores (Mammalia: Carnivora): at the top of the *T. cruzi* transmission chain. *Plos one*, 8(7), e67463.
- Rodrigues de Oliveira, A., Pinheiro, G. R. G., Tinoco, H. P., Loyola, M. E., Coelho, C. M., Dias, E. S., ... & Santos, R. L. (2019). Competence of non-human primates to transmit *Leishmania infantum* to the invertebrate vector *Lutzomyia longipalpis*. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(4), e0007313.

- Roque, A. L. R., Xavier, S. C., Rocha, M. G., Duarte, A. C. M., D'Andrea, P. S., & Jansen, A. M. (2008). *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas disease outbreaks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79(5), 742–749.
- Roque, A. L. R., & Jansen, A. M. (2014). Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 3(3), 251-262.
- Rosa, J. R., Salomon, O. D., Andrade Filho, J. D., Carvalho, G. M., Szelag, E. A., Stein, M., ... & Brazil, R. P. (2010). Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of the province of Chaco, Argentina. *Neotropical Entomology*, 39, 303-305.
- Rovirosa-Hernández, M. D. J., Cortes-Ortíz, L., García-Orduña, F., Guzmán-Gómez, D., López-Monteon, A., Caba, M., & Ramos-Ligonio, A. (2013). Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana* in Free-Ranging Howler Monkeys in Southeastern Mexico. *American Journal of Primatology*, 75(2), 161-169.
- Rózsa, L., Reiczigel, J., & Majoros, G. (2000). Quantifying parasites in samples of hosts. *Journal of parasitology*, 86(2), 228-232.
- Rueda, K., Trujillo, J. E., Carranza, J. C., & Vallejo, G. A. (2014). Transmisión oral de *Trypanosoma cruzi*: una nueva situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en Colombia y otros países suramericanos. *Biomédica*, 34(4), 631-641.
- Rumiz, D. I. (1990). *Alouatta caraya*: Population Density and Demography in Northern Argentina. *American Journal of Primatology* 21: 279-294.
- Rumiz, D. I., Zunino, G. E., Obregozo, M. L., & Ruiz, J. C. (1986). *Alouatta caraya*: habitat and resource utilization in northern Argentina.. In: Taub DM, King FA (eds.), *Current Perspectives in Primate Social Dynamics*. Van Nostrand Reinhold, pp. 175-193.
- Sacks, D. L. (2001). Leishmania-sand fly interactions controlling species-specific vector competence: Microreview. *Cellular microbiology*, 3(4), 189-196.
- Salomón, O. D., Sosa Estani, S., Rossi, G. C., & Spinelli, G. R. (2001). Presencia de *Lutzomyia longipalpis* y situación de la leishmaniosis visceral en Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*, 61, 174-478
- Salomón, O. D., Wilson, M. L., Munstermann, L. E., & Travi, B. L. (2004). Spatial and temporal patterns of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis focus in northern Argentina. *Journal of medical entomology*, 41(1), 33-39.
- Salomón, O. D., & Orellano, P. W. (2005). *Lutzomyia longipalpis* in Clorinda, Formosa province, an area of potential visceral leishmaniasis transmission in Argentina. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100, 475-476.
- Salomón, O. D., Sosa-Estani, S., Ramos, K., Orellano, P. W., Sanguesa, G., Fernández, G., ... & Rapascioli, G. (2006). Tegumentary leishmaniasis outbreak in Bella Vista city, Corrientes, Argentina during 2003. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101, 767-774.

- Salomón, O. D., Sinagra, A., Nevot, M. C., Barberian, G., Paulin, P., Estevez, J. O., ... & Estevez, J. (2008a). First visceral leishmaniasis focus in Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103, 109-111.
- Salomón, O. D., Rosa, J. R., Stein, M., Quintana, M. G., Fernández, M. S., Visintin, A. M., ... & Bruno, M. R. (2008b). Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) fauna in the Chaco region and Cutaneous Leishmaniasis transmission patterns in Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103, 578-584.
- Salomón, O. D., Acardi, S. A., Liotta, D. J., Fernández, M. S., Lestani, E., López, D., ... & Fattore, G. (2009a). Epidemiological aspects of cutaneous leishmaniasis in the Iguazú falls area of Argentina. *Acta Tropica*, 109(1), 5-11.
- Salomón, O. D., Ramos, L. K., Quintana, M. G., Acardi, S. A., Santini, M. S. & Schneider, A. (2009b) Distribución de vectores de leishmaniasis visceral en la provincia de Corrientes, 2008. *Medicina (Buenos Aires)*, 69, 1-6.
- Salomón, O. D., Quintana, M. G., Bezzi, G., Morán, M. L., Betbeder, E., & Valdés, D. V. (2010). *Lutzomyia migonei* as putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda, Argentina. *Acta Tropica*, 113(1), 84-87.
- Salomón, O. D., Fernández, M. S., Santini, M. S., Saavedra, S., Montiel, N., Ramos, M. A., ... & Martínez, M. F. (2011a). Distribución de *Lutzomyia longipalpis* en la Mesopotamia Argentina, 2010. *Medicina (Buenos Aires)*, 71(1), 22-26.
- Salomón, O. D., Rosa, J. R., Fabiani, M., San Miguel, S. R., Szelag, E. A., Nepote, M., & Parras, M. A. (2011b). Distribución de *Lutzomyia longipalpis* en el Chaco Argentino, 2010. *Medicina (Buenos Aires)*, 71(3), 225-230.
- Salomón, O. D., Mastrángelo, A. V., Quintana, M. G., & Rosa, J. R. (2011c). Leishmaniasis and environment in Argentina: An eco-epidemiological approach. In: Nriagu JO (ed.) *Encyclopedia of Environmental Health*, Burlington: Elsevier, 3, pp. 481-490.
- Salomón, O. D., Feliciangeli, M. D., Quintana, M. G., Afonso, M. M. D. S., & Rangel, E. F. (2015). *Lutzomyia longipalpis* urbanisation and control. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(7), 831-846.
- Salomón, O. D., Mastrángelo, A. V., Santini, M. S., Liotta, D. J., & Yadón, Z. E. (2016). La eco-epidemiología retrospectiva como herramienta aplicada a la vigilancia de la leishmaniasis en Misiones, Argentina, 1920-2014. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 40, 29-39.
- Salomón, O. D., & Quintana, M. G. (2022). Eco-epidemiological studies to develop integrated vector surveillance of leishmaniasis vectors in the Americas. *One Health Implement Res*; 2:45-55.
- Samudio, M., Montenegro-James, S., Kasamatsu, E., Cabral, M., Schinini, A., Rojas De Arias, A., & James, M. A. (1999). Local and systemic cytokine expression during experimental chronic *Trypanosoma cruzi* infection in a Cebus monkey model. *Parasite immunology*, 21(9), 451-460.

- Sanmartino, M., Martí, G. A., Amieva Nefa, C., Balsalobre, A., Carrillo, C., Medone, P., Mordegia, C., ... & Scazzola, M. S. (2015). Hablamos de Chagas. Aportes para (Re) pensar la problemática con una mirada integral. Buenos Aires: *Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas*; 2015 [citado 15 de mayo de 2020]. 152 p.
- Santa Cruz, A. C. M., Prieto, O. H., Roux, J. P., Patiño, E. M., Borda, J. T., Gomez, L., & Schiebler, N. (2000). Endo y ectoparasitosis en el mono aullador (*Alouatta caraya*) (Humboldt, 1812), Mammalia, Cebidae, Informe Preliminar. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad Nacional del Nordeste*.
- Santana, R. A. G., Guerra, M. G. V., Sousa, D. R., Couceiro, K., Ortiz, J. V., Oliveira, M., ... & Guerra, J. A. O. (2019). Oral transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon. *Emerging infectious diseases*, 25(1), 132.
- Santini, M. S., Gould, I. T., Acosta, M. M., Berrozpe, P., Acardi, S. A., Fernández, M. S., ... & Salomon, O. D. (2013). Spatial distribution of phlebotominae in puerto iguazú-misiones, argentina-brazil-paraguay border area. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 55, 239-243.
- Santos, B. A., Reinhold-Castro, K. R., Cristóvão, E. C., Silveira, T. G. V., & Teodoro, U. (2018). Predominance of *Nyssomyia neivai* (Pinto) on the Islands of the Paraná River, Southern Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 55(5), 1349-1353.
- Santos, R. L., & de Oliveira, A. R. (2020). Leishmaniasis in non-human primates: Clinical and pathological manifestations and potential as reservoirs. *Journal of Medical Primatology*, 49(1), 34-39.
- Sato, H., Leo, N., Katakai, Y., Takano, J. I., Akari, H., Nakamura, S. I., & Une, Y. (2008). Prevalence and molecular phylogenetic characterization of *Trypanosoma* (Megatrypanum) *minasense* in the peripheral blood of small neotropical primates after a quarantine period. *Journal of Parasitology*, 94(5), 1128-1138.
- Schenone, H. (1999). Xenodiagnosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94, 289-294.
- Schijman, A. G., Lauricella, M. A., Marcket, P. L., Duffy, T., Cardinal, M. V., Bisio, M., ... & Görtler, R. E. (2006). Differential detection of *Blastocrithidium triatomae* and *Trypanosoma cruzi* by amplification of 24Sα ribosomal RNA genes in faeces of sylvatic triatomine species from rural northwestern Argentina. *Acta tropica*, 99(1), 50-54.
- Schijman, A. G., Bisio, M., Orellana, L., Sued, M., Duffy, T., Mejia Jaramillo, A. M., Cura, C., Auter, F., Veron, V., Qvarnstrom, Y., Deborggraeve, S., Hijar, G., Zulantay, I., Lucero, R. H., Velazquez, E., Tellez, T., Sanchez Leon, Z., Galvão, L., Nolder, D., Monje Rumi, M., ...& Ladzins, J. (2011). International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS neglected tropical diseases*, 5(1), e931.
- Schofield, C. J., Diotaiuti, L., & Dujardin, J. P. (1999). The process of domestication in Triatominae. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94, 375-378.

- Schofield, C. J., Jannin, J., & Salvatella, R. (2006). The future of Chagas disease control. *Trends in parasitology*, 22(12), 583-588.
- Schönian, G., Nasreddin, A., Dinse, N., Schweynoch, C., Schallig, H. D., Presber, W., & Jaffe, C. L. (2003). PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 47(1), 349-358.
- Schmidt, D. A., Kowalewski, M. M., Ellersieck, M. R., Zunino, G. E., Stacewicz-Sapuntzakis, M., Chen, T. C., & Holick, M. F. (2007). Serum nutritional profiles of free-ranging *Alouatta caraya* in northern Argentina: lipoproteins; amino acids; vitamins A, D, and E; carotenoids; and minerals. *International Journal of Primatology*, 28, 1093-1107.
- Segura, E. L., Juan, N., Piquin, A. L., Cuba Cuba, C. A., Abramo Orrego, L., McMahon-Pratt, D., ... & Grimaldi Jr, G. (2000). Molecular and biologic characterization of *Leishmania* parasites implicated in an epidemic outbreak in northwestern Argentina. *Parasitology research*, 86, 504-508.
- Sherlock, E. B. Galati, J. Dedet, R. Vignes, E. Rangel, P. Ready, G. M. de Aguiar, W. M. de Medeiros, R. Brazil, B. Brazil, P. Pimenta, N. Secundino, E. N. Blanco, R. Lainson, J. Shaw, A. T. de Rosa, A. de Souza, A. Cruz, & M. Vilela, (2003). *Flebotomíneos do Brasil*, E. Rangel and R. Lainson, Eds. Editora Fiocruz, pp. 368-368.
- Sherlock, I. A. (2000). Vetores. En: *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 2^a edición. Ed.: Brener, Andrade, Barral-Netto. Editorial Guanabara Koogan SA, Rio de Janeiro, Brasil, pág. 21-40.
- Shikanai-Yasuda, M. A., & Carvalho, N. B. (2012). Oral transmission of Chagas disease. *Clinical Infectious Diseases*, 54(6), 845-852.
- Silveira, F. T., Moraes, M. A., Lainson, R., & Shaw, J. J. (1990). Leishmaniose cutânea experimental. III-Aspectos histopatológicos do comportamento evolutivo da lesão cutânea produzida em *Cebus apella* (Primates: Cebidae) por *Leishmania* (Viannia) *lainsoni*, L. (V.) *braziliensis* e *L.(Leishmania) amazonensis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 32, 387-394.
- Simpson, L. (1987). The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annual Review of Microbiology*, 41, 363-382.
- Soto, G., Alleva, K., Mazzella, M. A., Amodeo, G., & Muschietti, J. P. (2008). AtTIP1; 3 and AtTIP5; 1, the only highly expressed *Arabidopsis* pollen-specific aquaporins, transport water and urea. *FEBS letters*, 582(29), 4077-4082.
- Sousa, O. E., & Dawson, G. A. (1976). Trypanosome infections in the marmoset (*Saguinus geoffroyi*) from the Panama Canal Zone. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 25(3), 407-409.

- Souto, R. P., Vargas, N., Zingales, B. (1999). *Trypanosoma rangeli*: discrimination from *Trypanosoma cruzi* based on a variable domain from the large subunit ribosomal RNA gene. *Exp. Parasitol.*, 91, 306-314.
- Souza-Lima, R. D. C. De, Vale Barbosa, G., Rodrigues Coura, J., Lima Arcanjo, A. R., Da Silva Nascimento, A., Barbosa Ferreira, J. M. B., ... De Oliveira Guerra, J. A. (2013). Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 46(4), 510-514.
- Stuart, M., Pendergast, V., Rumfelt, S., Pierberg, S., Greenspan, L., Glander, K., & Clarke, M. (1998). Parasites of wild howlers (*Alouatta* spp.). *International Journal of Primatology*, 19, 493-512.
- Szelag, E.A., Parras, M.A., Fabiani, M., Rosa, J.R. & Salomón, O.D. (2014) Incipient colonisation of *Lutzomyia longipalpis* in the city of Resistencia, province of Chaco, Argentina (2010–2012). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109, 488–491.
- Szelag, E. A., Rosa, J. R., Quintana, M. G. & Salomón, O. D. (2018a) Temporal distribution of, and effect of anthropic modifications on, phlebotomine populations in the Chaco Bioregion, Argentina. *Medical and Veterinary Entomology*, 32, 206–215.
- Szelag, E. A., Rosa, J. R., Galati, E. A., Andrade Filho, J. D., & Salomón, O. D. (2018b). Considerations on the species complex of the *Cortelezzii* series (Diptera: Psychodidae) and description of *Evandromyia chacuensis* sp. nov., a new phlebotomine species of the Chaco Region, Argentina. *Journal of medical entomology*, 55(4), 902-909.
- Teixeira, A. R., Monteiro, P. S., Rebelo, J. M., Argañaraz, E. R., Vieira, D., Lauria-Pires, L., ... & Costa, J. M. (2001). Emerging Chagas disease: trophic network and cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from palm trees in the Amazon. *Emerging Infectious Diseases*, 7(1), 100.
- Tenório, M. S., e Sousa, L. O., Alves-Martin, M. F., Paixão, M. S., Rodrigues, M. V., Starke-Buzetti, W. A., ... & Lucheis, S. B. (2014). Molecular identification of trypanosomatids in wild animals. *Veterinary parasitology*, 203(1-2), 203-206.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22(22), 4673-4680.
- Tibayrenc, M. (1998). Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *International journal for parasitology*, 28(1), 85-104.
- Tibayrenc, M. (2003). Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid biology and disease*, 2, 1-6.
- Travi, B., Ruiz, A. M., Colillas, O. J., & Segura, E. L. (1982). Trypanosomiasis en monos neotropicales. *Medicina (B. Aires)*, 55-60.

- Trüeb, I., Portela, R. D., Franke, C. R., Carneiro, I. O., Ribeiro Jr, G. J., Soares, R. P., & Barrouin-Melo, S. M. (2018). *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* sp. infection in wildlife from urban rainforest fragments in northeast Brazil. *Journal of Wildlife Diseases*, 54(1), 76-84.
- Ulon, S. N., Zorzo, L. R., Muzzio, N. M., Machuca, L. M., & Maruñak, S. L. (2018). Seroprevalencia de *T. cruzi* en caninos de distintos tipos de viviendas de un barrio periférico de Corrientes, Argentina. *Revista veterinaria*, 29(2), 133-136.
- UMSEF. 2017. Monitoreo de la Superficie de Bosque Nativo de la República Argentina: Regiones forestales Parque Chaqueño, Yungas, Selva Paranaense y Espinal. *Ministerio de Ambiente y Desarrollo sustentable de la Nación Argentina*.
- Vallejo, G. A. (1998). Estudios comparativos entre las secuencias de kDNA de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* y su aplicación en el diagnóstico molecular de la tripanosomiasis americana. *Actualidades Biológicas*, 20(68), 43-56.
- Vallejo, G. A., Guhl, F., Chiari, E., & Macedo, A. M. (1999). Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. *Acta Tropica*, 72(2), 203-212.
- Vallejo, G. A., Guhl, F., Carranza, J. C., Lozano, L. E., Sánchez, J. L., Jaramillo, J. C., ... & Steindel, M. (2002). kDNA markers define two major *Trypanosoma rangeli* lineages in Latin-America. *Acta Tropica*, 81(1), 77-82.
- Vargas, N., Souto, R. P., Carranza, J. C., Vallejo, G. A., & Zingales, B. (2000). Amplification of a specific repetitive DNA sequence for *Trypanosoma rangeli* identification and its potential application in epidemiological investigations. *Experimental Parasitology*, 96(3), 147-159.
- Wisnivesky-Colli, C., Schweigmann, N. J., Alberti, A., Pietrokovsky, S. M., Conti, O., Montoya, S., ... & Rivas, C. (1992). Sylvatic American trypanosomiasis in Argentina. *Trypanosoma cruzi* infection in mammals from the Chaco forest in Santiago del Estero. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86(1), 38-41.
- Woolhouse, M. E., & Gowtage-Sequeria, S. (2005). Host range and emerging and reemerging pathogens. *Emerging infectious diseases*, 11(12), 1842.
- World Health Organization. (2010). Chagas disease: control and elimination. Sixty-third World Health Assembly.
- Yeo, M., Acosta, N., Llewellyn, M., Sánchez, H., Adamson, S., Miles, G. A., ... & Miles, M. A. (2005). Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *International journal for parasitology*, 35(2), 225-233.
- Zeledon, R. (1974). Epidemiology, modes of transmission and reservoir hosts of Chagas' disease. In *Ciba Foundation Symposium 20-Trypanosomiasis and Leishmaniasis (with Special Reference to Chagas' Disease)* (Vol. 20, pp. 51-85). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.

- Ziccardi, M., & Lourenço-de-Oliveira, R. (1997). The infection rates of trypanosomes in squirrel monkeys at two sites in the Brazilian Amazon. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92, 465-470.
- Ziccardi, M., Lourenço-de-Oliveira, R., Lainson, R., Brígido, M. D. C. D. O., & Muniz, J. A. P. C. (2000). Trypanosomes of non-human primates from the National Centre of Primates, Ananindeua, State of Pará, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95, 157-159.
- Zingales, B., Andrade, S. G., Briones, M. R. D. S., Campbell, D. A., Chiari, E., Fernandes, O., ... & Schijman, A. G. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 1051-1054.
- Zingales, B., Miles, M. A., Campbell, D. A., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M., ... & Sturm, N. R. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, genetics and evolution*, 12(2), 240-253.
- Zunino, G. E., & Rumiz, D. I. (1986). Observaciones sobre el comportamiento territorial del mono aullador negro (*Alouatta caraya*). *Bol. Primatol. Arg.*, 4(1), 36-52.
- Zunino, G. E. (1996). Análisis de nacimientos en *Alouatta caraya* (Primates, Cebidae), en el noreste de la Argentina. *Revista Museo Argentino de Ciencias Naturales, Nueva Serie*, 133, 1-10.
- Zunino, G. E., Kowalewski, M. M., Oklander, L. I., & González, V. (2007). Habitat fragmentation and population size of the black and gold howler monkey (*Alouatta caraya*) in a semideciduous forest in northern Argentina. *American Journal of Primatology: Official Journal of the American Society of Primatologists*, 69(9), 966-975.
- Zunino, G. E., & Kowalewski, M. M. (2008). Primate research and conservation in northern Argentina: the field station Corrientes (Estación Biológica de Usos Múltiples – EBCo). *Tropical Conservation Science*, 1(2), 140-150.

Abreviaciones:

SC: San Cayetano

IB: Isla Brasilera

PPSC: Parque Provincial San Cayetano

EBCo: Estación Biológica Corrientes

AD: Árbol dormidero de monos

ID: Identificación

Anexo 1



Comité de Evaluación Ética
de Investigaciones Biomédicas
del Instituto Nacional de Enfermedades
Virales Humanas "Dr. Julio I. Maiztegui"

Monteagudo 2510
2700 Pergamino
Argentina

Pergamino, 1 de abril de 2009.

Sra. Directora
Dra. Delia Enria
INEVH "Dr. Julio Maiztegui"
S _____ / D _____

De nuestra consideración:

Tenemos el agrado de dirigirnos a Ud. a los efectos de comunicarle que este Comité, previo profundo análisis del contenido del Protocolo "Actividad del virus de la Fiebre Amarilla y otros Arbovirus de importancia sanitaria en primates no humanos, roedores y mosquitos en el noreste de Argentina" y habiendo efectuado las recomendaciones que figuran en el acta de la reunión mantenida en el día de la fecha, considera que el mismo reúne los requisitos de ética esenciales que hacen viable su puesta en marcha.

No teniendo otra observación que realizar, le comunicamos por la presente nuestra aprobación.

Dr. Néstor Fernández

Dr. Carlos Kitroser

Ing. Daniel Fregiaro

Sr. Julio Torrado

Dra. Alba Damilano

Anexo 2: Planilla de datos de los monos capturados

ID NUMBER:

Tu nombre:

Appendix C

Monkey Identification Card

Front of card used for written descriptions of key traits.

Troop: _____ Name: _____ Date: _____

Age and Sex: _____ (Date of birth and mother's name) _____

Pelage: _____

Head hair: _____

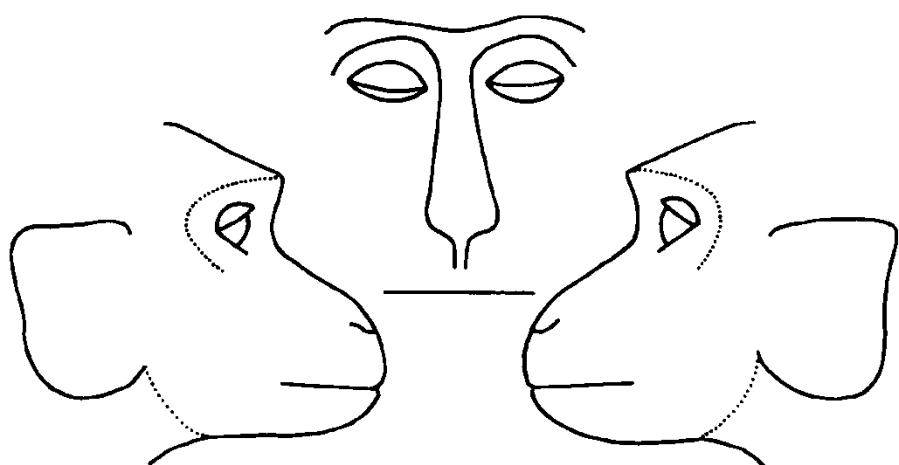
Face color: _____

Ears: _____

Dermal skin: _____

Other: _____

Name: _____



Back of card has printed monkey faces used for drawing in the location, size, and configuration of pigment spots, scars, and similar blemishes.

Medidas del cuerpo

Parte del cuerpo	Medida	Comentarios
Largo de cabeza (nuca-frente)		
Ancho de cabeza (frente)		
Altura de cabeza (cara)		
LARGO TOTAL		
Cabeza (nuca)-comienzo de cola		
Largo de cola y cola digital		
Alto oreja der e Izq		
Span de brazos		
Span de piernas		
Rodilla-cabeza de fémur		
Tobillo-rodilla		
Tobillo-metatarso (inicio dedos)		
Largo de planta de pie		
*Dedo largo del pie		
Altura de planta		
Largo de mano		
Muñeca a comienzo de dedos		
Ancho de palma		
Altura de palma		
Muñeca-codo		
Codo-cabeza de humero		
Altura de pezón		
Ancho de pezón		
Área de lactación		
Canino bajo der izq		
Canino Alto der izq		
Largo de genitales		
Ancho de genitales		
Altura de genitales		

Notas: Cicatrices faciales: ubicación, herida abierta/curada, número - Marcas en las orejas: ubicación, herida abierta/curada, número.

Incluya comentarios como: ¿los dientes son blancos y no están desgastados?, ¿han erupcionado todos los dientes permanentes?, ¿hay dedos faltantes?, ¿hay lesiones? y cualquier otra información relevante.

NUMERO DE CARAVANA Y MARCAS:

PESO DEL MONO:

TIEMPO DE INICIO y FINALIZACION DE TRABAJO

DIENTES: LADO BAJO IZQUIERDO MÁS INCISIVOS BAJOS. LIMPIAR ANTES.

COMENTARIOS:

CAPTURAS CARAYA 2010. FICHA DE CONTENCIÓN QUÍMICA N°.....

Fecha: / /10 Lugar:..... Caravana:..... (-)

Nombre: Tropa:

Edad:..... Cría(). Juvenil(). Adulto(). Senil(). Sexo: M(). H().

Estado de Nutrición: Obeso(). Excelente(). Bueno(). Regular(). Malo(). Cauquexia().

Constitución: Fuerte(). Débil(). Temperamento: Linfático(). Sanguíneo()

Condición Social: Aislado(). Pareja(). Grupo(). Temp. Ambiente:

Peso Estim: Kg. Dosis Estim: mg/Kg. mg/Kg

Peso Real:Kg. Dosis Real:mg/Kg.mg/Kg

1. Tipo: T- Tranquilizante (pre-anestésico)
I- Inmovilizante (inductor / anestésico)
S- Suplemento (p/ obten. plano deseado)
M- Mantenimiento (dosis extras para
Mantener el plano)
A- Antagonista
O- Otros

2. Medio Aplicac.:
J – Jeringa
C – Cerbatana
R – Rifle

Vía: IM
SC
IV

3. Éxito de Aplicación:

4. Efectos: 0 – Ninguno
(estados) 1 – Ligera anestesia
2 – Moderada Anest.
3 – Profunda Anest.
4 – Excesiva / Prof.
5 – Deceso

Lugar de Impacto del dardo	Desequilibrio	Dormido en Arbol	Bajado	Apto

Limpieza(), Cicaderma(), Curabicheras(), Colirio().....

Recuperación de la Anestesia: Normal(). Prolongado(). Deceso(). hs

Evaluación de la Anestesia: Excelente(). Buena(). Regular(). Mala() 155.....
Responsable:

Anexo 3

Planilla datos ambientales trampas de Noireau

Planilla n°:

Fecha:

Localidad:

Dormidero:

Observaciones:

Anexo 4: Planilla de datos ambientales de la captura de flebótomos

Nombre de unidad de muestreo:

Fecha:

1. Ubicación geográfica

Provincia: Responsable Muestreo:
Minicipio: Tomador de datos:
Nro. Foto:

2. Sitio muestreado

Dirección _____
Nombre familia:_____

3. MICROSITIO (Trampa)

Latitud (GPS):	Longitud (GPS):
Altura terreno (GPS):	

Lugar de colocación:	Gallinero	Perro	Árbol c/gallinas	Chiquero	otros	
Fecha	Hora coloc.	Hora retir.	Tmín	Tmáx	HRmín	HRmáx

4. VARIABLES PARA CADA MICROSITIO (repetir en caso de mas de 1 micrositio)

<u>SUELLO</u> (2x2 mts alrededor de la trampa)
% de cobertura: 0-25% 25-50% 50-75% 75-100%
% de sombra: 0-25% 25-50% 50-75% 75-100%
Nº de estratos:
Nº de árboles presentes en área de 10x10 metros:
Nro. frutales:
Nro. sin hojas:

5. Características de la Unidad Doméstica:

<p>m² Totales:</p> <p>m² domicilio:</p> <p><u>m² Peridomicilio</u> (todo lo exterior):</p> <ul style="list-style-type: none"> └─ % cemento: └─ % tierra (sin vegetación): └─ <u>% vegetación</u> (incluye huerta y macetas): <ul style="list-style-type: none"> └─ % pasto <20 cm └─ % pasto >20 cm └─ Cantidad de árboles totales: <ul style="list-style-type: none"> └─ # Frutales: └─ Nro. de macetas presentes: 	<p><i>Esquema de vivienda (croquis):</i></p>
ANIMALES	#perros: #gallinas: #chanchos: Otros (número y tipo):
Se inunda alguna zona del peridomicilio? NO/ SI SI: ¿Cuántos m ² ?	m ² ocupados por “materiales fuera de uso”:

6. Características del entorno

La vivienda fue fumigada?..... SI/NO Hace cuánto? Con qué?
 Registro de inundación de menos de 5 años?:..... SI / NO
 Basural permanente a menos de 300 metros:SI / NO

Tiene.... agua de red?.....SI / NO
 energía eléctrica?.....SI / NO
 recolección de residuos?.....SI.....frecuencia?.....
 NO....Quema / Entierra / Tira en otro lado / Otro
 alumbrado público?.....SI / NO
 cloaca ()pozo ciego ().....Otro ()

En la vereda... hay árboles? SI / NO SI: Cuántos?:
 hay vegetación? SI / NO SI: % cubierta por: vegetación < 20 cm:
 vegetación > 20cm:

Material de la calle: Tierra () Empedrado () Asfalto () Ripio ()

Escriba aquí todo tipo de observación / variable adicional que considere pertinente para el sitio donde colocó la trampa. Incluya información si alguna trampa resultó defectuosa / batería descargada, etc.

