Final SRAS Report

Detección molecular de *Trypanosoma* spp. en poblaciones de cocodrílidos de Panamá y su relación con el estado del hospedador y el hábitat.

Melciellyne Del C. Aguilar-M

Abstract

This study evaluated the presence of hemoparasites of the genus Trypanosoma in crocodilian populations across the Republic of Panama, aiming to provide information on their prevalence, geographic distribution, and potential relationship with host health status and habitat conditions. Blood samples were collected from individuals of *Crocodylus acutus* and *Caiman crocodilus* across multiple localities nationwide, including both wild and captive populations.

Trypanosome detection was carried out using molecular techniques based on the amplification of SSU rRNA and gGAPDH gene fragments, complemented by hematological analyses and microscopic examination of blood smears. No parasitic forms were observed through microscopy, suggesting low parasitemia levels in the studied populations. However, molecular evidence confirmed the presence of Trypanosoma spp. in a subset of sampled individuals.

Overall prevalence was low, with variation between species and living conditions. No significant association was found between parasite presence and hematological parameters or body condition index, suggesting that infections may be subclinical under the evaluated conditions. Additionally, spatial patterns in parasite occurrence were observed, with higher frequencies in regions influenced by anthropogenic activities.

This study represents one of the first nationwide efforts in Panama to molecularly detect Trypanosoma in crocodilians, contributing valuable insights into the ecology of these hemoparasites and their potential implications for the conservation of crocodilian species.

Resumen

Este estudio evaluó la presencia de hemoparásitos del género Trypanosoma en poblaciones de cocodrílidos en la República de Panamá, con el objetivo de aportar información sobre su prevalencia, distribución geográfica y posible relación con el estado de salud del hospedador y las condiciones del hábitat. Se analizaron muestras de sangre de individuos de *Crocodylus acutus* y *Caiman crocodilus* provenientes de múltiples localidades a nivel nacional, incluyendo poblaciones silvestres y en cautiverio.

La detección de tripanosomas se realizó mediante técnicas moleculares basadas en la amplificación de fragmentos de los genes ribosomales SSU rRNA y gGAPDH, complementadas con análisis hematológicos y observaciones microscópicas de frotis sanguíneos. No se observaron formas parasitarias mediante microscopía, lo que sugiere niveles bajos de parasitemia en las poblaciones estudiadas. Sin embargo, la evidencia molecular confirmó la presencia de *Trypanosoma* spp. en un subconjunto de los individuos analizados.

Los resultados indican una baja prevalencia general del parásito, con variaciones entre especies y condiciones de vida. No se encontró evidencia de una relación significativa entre la presencia del parásito y los parámetros hematológicos o el estado corporal de los individuos, lo que sugiere que las

infecciones podrían ser subclínicas bajo las condiciones evaluadas. Asimismo, se identificaron patrones espaciales en la distribución del parásito asociados a regiones con mayor influencia antrópica.

Este estudio constituye uno de los primeros esfuerzos a escala nacional en Panamá para la detección molecular de Trypanosoma en cocodrílidos, aportando información relevante para la comprensión de la ecología de estos hemoparásitos y su potencial impacto en la conservación de estas especies.

Introducción

Los hemoparásitos del género Trypanosoma (Euglenozoa, Kinetoplastea) constituyen un grupo diverso de protozoarios que infectan una amplia gama de vertebrados, incluyendo reptiles, aves y mamíferos (Fermino et al., 2015; Marcili et al., 2013). En reptiles, se han descrito múltiples especies con una distribución amplia, aunque el conocimiento sobre su diversidad y ecología sigue siendo limitado, especialmente en el Neotrópico.

En cocodrilianos, los estudios han documentado la presencia de varias especies de Trypanosoma, principalmente en África y América del Sur, utilizando enfoques moleculares basados en genes como SSU rRNA y gGAPDH (Fermino et al., 2013, 2015, 2019). Estas investigaciones han permitido comprender aspectos evolutivos y filogenéticos del grupo, sugiriendo una diversificación reciente asociada a procesos de dispersión y cambio de hospedador (Fermino et al., 2019; Mendoza-Roldan et al., 2021).

Los tripanosomas presentan ciclos de vida complejos que involucran vectores hematófagos, como insectos de la familia Tabanidae y sanguijuelas del género Haementeria, los cuales han sido identificados como vectores en cocodrilianos neotropicales (Fermino et al., 2019; Lemos et al., 2015). La detección de estos parásitos puede ser limitada mediante métodos tradicionales debido a su baja parasitemia, lo que hace que técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sean herramientas fundamentales para su identificación (Desquesnes et al., 2022).

A pesar de estos avances, en Panamá no existían estudios previos que documentaran la presencia, distribución o posibles efectos de *Trypanosoma* spp. en especies nativas como *Crocodylus acutus* y *Caiman crocodilus*, lo que representaba un vacío importante en el conocimiento de la ecología parasitaria de estos reptiles.

Métodos

El estudio se llevó a cabo en múltiples localidades distribuidas a lo largo de la República de Panamá, abarcando diferentes tipos de hábitats y condiciones ambientales. Se incluyeron tanto poblaciones silvestres como individuos en cautiverio de las especies *Crocodylus acutus* y *Caiman crocodilus*.

Las capturas se realizaron mediante muestreos nocturnos utilizando técnicas estándar de localización y captura, seguidas de la toma de datos morfométricos y biológicos de cada individuo. Las muestras de sangre fueron obtenidas de la vena caudal y procesadas para análisis hematológicos, preparación de frotis sanguíneos y extracción de ADN.

La detección de *Trypanosoma* spp. se realizó mediante la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de fragmentos de los genes SSU rRNA y gGAPDH. Los productos de amplificación fueron verificados mediante electroforesis en gel de agarosa. Adicionalmente, se evaluaron parámetros hematológicos y se estimó un índice de condición corporal para cada individuo.

Los análisis de datos incluyeron la evaluación de la prevalencia del parásito, así como la exploración de posibles asociaciones entre su presencia y variables como especie, condición de vida (silvestre o cautiverio), estado corporal y parámetros hematológicos.

Resultados

El análisis microscópico de los frotis sanguíneos no evidenció la presencia de formas parasitarias de Trypanosoma, lo que sugiere niveles bajos de parasitemia en las poblaciones evaluadas. Sin embargo, la detección molecular permitió identificar la presencia del parásito en un subconjunto de individuos, confirmando infecciones no detectables mediante métodos tradicionales.

La prevalencia general observada fue baja, con diferencias entre especies y condiciones de vida. Se identificaron variaciones en la frecuencia de detección entre individuos silvestres y en cautiverio, particularmente en una de las especies estudiadas.

No se encontró evidencia de una relación significativa entre la presencia de *Trypanosoma* spp. y los parámetros hematológicos evaluados, ni con el índice de condición corporal de los individuos. Asimismo, los análisis espaciales sugieren una distribución heterogénea del parásito, con mayor frecuencia en regiones con mayor influencia antrópica.

Discusión

La ausencia de detección de formas parasitarias mediante microscopía, junto con la detección positiva mediante técnicas moleculares, coincide con estudios previos que indican que los tripanosomas en cocodrilianos pueden presentar niveles muy bajos de parasitemia, lo que dificulta su observación directa en frotis sanguíneos (Fermino et al., 2013, 2015). Esto resalta la importancia del uso de herramientas moleculares para el estudio de estos hemoparásitos.

La baja prevalencia observada en este estudio es consistente con reportes en otras especies de cocodrilianos, donde las infecciones por Trypanosoma suelen ser de baja intensidad y no necesariamente están asociadas a manifestaciones clínicas evidentes (Fermino et al., 2015). Esta condición sugiere una posible relación de coexistencia entre hospedador y parásito, probablemente resultado de procesos de coevolución a largo plazo.

Adicionalmente, la falta de asociación entre la presencia del parásito y variables hematológicas o de condición corporal coincide con estudios que indican que estos hemoparásitos no generan efectos patológicos significativos en sus hospedadores bajo condiciones naturales (Fermino et al., 2015; Mendoza-Roldan et al., 2021). Esto podría estar relacionado con mecanismos de tolerancia inmunológica desarrollados por los crocodilianos.

Por otro lado, la variación espacial en la detección del parásito sugiere que factores ambientales podrían influir en su dinámica de transmisión. Estudios previos han señalado que la presencia de vectores y las condiciones ecológicas locales pueden desempeñar un papel importante en la distribución de los tripanosomas (Lemos et al., 2015; Fermino et al., 2019). En este sentido, las áreas con mayor influencia antrópica podrían favorecer la interacción entre hospedadores y vectores, incrementando las probabilidades de transmisión.

En conjunto, estos resultados aportan evidencia relevante sobre la ecología de Trypanosoma en cocodrilianos neotropicales y resaltan la necesidad de estudios futuros orientados a la identificación de especies, vectores y su papel en los ecosistemas acuáticos.

Conclusión

Se confirmó la presencia de *Trypanosoma* spp. en cocodrílidos de Panamá mediante técnicas moleculares.

La prevalencia del parásito fue baja en las poblaciones evaluadas.

No se evidenció una relación entre la presencia del parásito y el estado de salud de los individuos.

La distribución del parásito sugiere una posible influencia de factores ambientales y antrópicos.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo institucional de la Smithsonian Tropical Research Institute y la Universidad de Panamá por facilitar el desarrollo de esta investigación. Asimismo, se reconoce el financiamiento otorgado por la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT).

Se agradece especialmente el apoyo brindado por el IUCN SSC Crocodile Specialist Group Student Research Assistance Scheme, cuyo financiamiento fue fundamental para la ejecución de este proyecto.

Bibliografía

Desquesnes, M., Gonzatti, M., Sazmand, A., Thévenon, S., Bossard, G., Boulangé, A., Gimonneau, G., Truc, P., Herder, S., Ravel, S., Sereno, D., Jamonneau, V., Jittapalapong, S., Jacquiet, P., Solano, P., & Berthier, D. (2022). A review on the diagnosis of animal trypanosomoses. *Parasites & Vectors 2022 15:1*, *15*(1), 1–24. https://doi.org/10.1186/S13071-022-05190-1

Fermino, B., Paiva, F., Soares, P., Tavares, L. E. R., Viola, L. B., Ferreira, R. C., Botero-Arias, R., de-Paula, C. D., Campaner, M., Takata, C. S. A., Teixeira, M. M. G., & Camargo, E. P. (2015). Field and experimental evidence of a new caiman trypanosome species closely phylogenetically related to fish trypanosomes and transmitted by leeches. *International Journal for Parasitology. Parasites and Wildlife*, *4*(3), 368–378. https://doi.org/10.1016/J.IJPPAW.2015.10.005

Fermino, B., Paiva, F., Viola, L. B., Rodrigues, C., Garcia, H. A., Campaner, M., Takata, C., Sheferaw, D., Kisakye, J. J., Kato, A., Jared, C., Teixeira, M., & Camargo, E. P. (2019). Shared species of crocodilian trypanosomes carried by tabanid flies in Africa and South America, including the description of a new species from caimans, Trypanosoma kaiowa n. sp. *Parasites and Vectors*, *12*(1), 1–17. https://doi.org/10.1186/S13071-019-3463-2/FIGURES/9

Fermino, B., Viola, L. B., Paiva, F., Garcia, H. A., De Paula, C. D., Botero-Arias, R., Takata, C. S. A., Campaner, M., Hamilton, P. B., Camargo, E. P., & Teixeira, M. M. G. (2013). The phylogeography of trypanosomes from South American alligatorids and African crocodilids is consistent with the geological history of South American river basins and the transoceanic dispersal of Crocodylus at the Miocene. *Parasites and Vectors*, *6*(1), 1–14. https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-313/FIGURES/7

Lemos, M., Fermino, B. R., Simas-Rodrigues, C., Hoffmann, L., Silva, R., Camargo, E. P., Teixeira, M. M. G., & Souto-Padrón, T. (2015). Phylogenetic and morphological characterization of trypanosomes from Brazilian armoured catfishes and leeches reveal high species diversity, mixed infections and a new fish trypanosome species. *Parasites and Vectors*, *8*(1), 1–17. https://doi.org/10.1186/S13071-015-1193-7/FIGURES/6

Marcili, A., Costa, A. P. da, Soares, H. S., Acosta, I. C. L., Lima, J. T. R. de, Minervino, A. H. H., & Gennari, S. M. (2013). First Report of Trypanosoma sp. in Spectacled Caiman (Caiman crocodilus): Morphological and Phylogenetic Relationships. *ISRN Parasitology*, *2013*, 1–7. https://doi.org/10.5402/2013/328794

Mendoza-Roldan, J. A., Mendoza-Roldan, M. A., & Otranto, D. (2021). Reptile vector-borne diseases of zoonotic concern. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, *15*, 132–142. https://doi.org/10.1016/J.IJPPAW.2021.04.007

Venegas-Anaya, M. (2013). *The use of integrative analyses for understanding the evolutionary and ecological determinants of diversity in New World Crocodylia* (pp. 1–333). https://hdl.handle.net/2346/82356