

TITULO DEL PROYECTO: *Efectos de los trastornos antropogénicos en la salud de pequeños mamíferos en Bolivia y el riesgo de enfermedades zoonóticas*

Proyecto realizado como CBF:

Dra. Leila Porter, Carrera de Antropología, Northern Illinois University, EEUU. Responsable principal del proyecto.

Adriana Rico, Unidad de Zoología – Instituto de Ecología, Carrera de Biología, UMSA

Isabel Moya, Unidad de Zoología del MNHN

El resto del equipo de investigadores:

Pamela Durán Toledo, Facultad de Medicina, Enfermería, Nutrición y Tecnología Médica, Instituto de Investigación en Salud y Desarrollo, Universidad Mayor San Andrés

Eddy Octavio Martínez Avendaño, Facultad de Medicina, Enfermería, Nutrición y Tecnología Médica, Instituto de Investigación en Salud y Desarrollo, Universidad Mayor San Andrés.

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

Los mamíferos sirven como hospedadores para una amplia variedad de patógenos infecciosos (Samuel et al., 2001; Williams et al., 2001). Las infecciones por parásitos pueden extenderse rápidamente, y cuando se combinan con factores estresantes adicionales como la depredación, la desnutrición y la competencia intra / interespecífica, pueden afectar en última instancia la salud de un animal (Huffman, 2001; Lozano, 1998). Considerando la capacidad de las infecciones para poner en riesgo a las poblaciones de fauna silvestre, es importante identificar posibles ciclos de transmisión de patógenos de humanos y animales domésticos a la fauna silvestre y viceversa, particularmente cuando la fauna silvestre incluye especies amenazadas y / o en peligro de extinción (Appelbee et al., 2005; Gillespie et al., 2009). Se necesita una mejor integración de la información de las disciplinas de salud humana y animal para anticipar los brotes de enfermedades zoonóticas y desarrollar respuestas de manejo adecuadas para prevenirlos y contenerlos (OMS, 2004).

La reducción del área del hábitat posterior a la fragmentación del bosque restringe el alcance y aumenta la acumulación de fauna silvestre (Lafferty y Holt, 2003; McCallum y Dobson, 2002). La densidad de hospedadores es un factor importante que afecta las tasas de infección en parásitos transmitidos directamente (Anderson y May, 1992) y se ha demostrado que se correlaciona positivamente con la prevalencia y diversidad de infecciones parasitarias (Morand y Poulin, 1998; Packer et al., 1999). A medida que aumenta la densidad de la población humana en las áreas rurales cercanas a los hábitats de la fauna silvestre, hay aumentos correspondientes en la reducción del hábitat, la

fragmentación del hábitat, el contacto entre humanos y animales y la transmisión de patógenos entre los seres humanos y animales silvestres (Gillespie, 2006).

Los cambios antropogénicos también pueden conducir a la introducción de especies invasoras, tolerantes a las perturbaciones y sus parásitos asociados (Verneau et al., 2011). La colonización humana de las áreas forestales conduce a un aumento de la población de especies invasoras, como las ratas (OMS, 2004). Además, la pérdida de hábitat, específicamente en la forma de deforestación, se ha relacionado con una disminución en los grandes depredadores que lleva a un aumento posterior tanto de las poblaciones de roedores como de las enfermedades que albergan (Young et al., 2014). Se ha encontrado que los roedores en áreas urbanizadas albergan una mayor prevalencia de infección por parásitos en comparación con los roedores en áreas rurales (Reperant et al., 2009). Los roedores son reservorios de numerosas enfermedades zoonóticas responsables de pérdidas económicas significativas y problemas de salud pública (Dabritz et al., 2008; Meerburg et al., 2009; Pereira et al., 2010). Las ratas invasoras han sido implicadas como reservorios para la propagación de enfermedades en muchos sistemas ecológicos (Vogler et al., 2013; Reynes et al., 2014).

Los pequeños mamíferos que viven en hábitats alterados pueden ser susceptibles a una amplia gama de patógenos, incluidos parásitos gastrointestinales y numerosos patógenos transmitidos por la sangre. Las áreas rurales de 21 países del subcontinente latinoamericano desde México hasta el Cono Sur son las regiones endémicas tradicionalmente reconocidas para la enfermedad de Chagas (Luna et al., 2016). El ciclo de transmisión zoonótico de *Trypanosoma cruzi* involucra roedores silvestres, marsupiales y otros mamíferos sudamericanos (Teixeira et al., 2001; Coura, 2007; Luna et al., 2016). La Organización Mundial de la Salud estima que entre 7 y 8 millones de personas están infectadas por *T. cruzi* (OMS 2013). El virus del dengue es el patógeno humano transmitido por vectores más importante, que infecta a 50 a 100 millones de personas anualmente (OMS, 2012). El virus del dengue se ha detectado en varias especies de roedores y marsupiales neotropicales salvajes (de Thoisy et al., 2009).

Si bien la mayoría de las iniciativas de investigación en América del Sur se han centrado en Brasil, los cuatro sitios de investigación de este estudio se encuentran en las selvas tropicales del Amazonas de Bolivia. Esta región se encuentra al suroeste de la Amazonía brasileña, y está adyacente a los Andes, por lo que se pueden encontrar diferencias importantes en los patógenos entre estas regiones.

OBJETIVO GENERAL:

Nuestro objetivo a corto plazo es probar tres hipótesis sobre el impacto de la perturbación antropogénica en la salud de los pequeños mamíferos. Analizaremos nuestros datos con el objetivo de medir el efecto del cambio de hábitat antropogénico en la salud de los pequeños mamíferos nativos. Un objetivo a largo plazo es proteger a

las poblaciones humanas de la transmisión de enfermedades zoonóticas y la propagación de patógenos humanos a la vida silvestre.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Si la degradación del hábitat aumenta el riesgo de infección por patógenos microbianos, entonces la prevalencia de patógenos, la carga y el número de coinfecciones por individuo aumentarán a medida que aumenta la perturbación del hábitat.
2. La condición de salud observable de los pequeños mamíferos disminuirá a medida que aumente la prevalencia de infecciones por patógenos.
3. Los patógenos nativos de mamíferos pequeños (marsupiales y roedores nativos) estarán más estrechamente relacionados con los patógenos de ratas invasoras y humanas a medida que aumenta la perturbación del hábitat. Alternativamente, los patógenos nativos de mamíferos pequeños estarán más estrechamente relacionados entre sí que con los humanos o ratas negras a medida que disminuya la perturbación del hábitat.

RESULTADOS ESPERADOS:

Este estudio aumentará nuestra comprensión de qué patógenos gastrointestinales y transmitidos por la sangre están presentes en pequeños mamíferos en Bolivia, y la prevalencia estimada de cada patógeno. Este trabajo producirá datos cuantitativos sobre el impacto de la alteración del hábitat antropogénico en la gravedad de las infecciones por patógenos. Además, esperamos dilucidar el potencial de transmisión de patógenos de especies cruzadas. Finalmente, nuestro objetivo es utilizar nuestros datos para trabajar con funcionarios de salud pública y funcionarios de vida silvestre para determinar qué medidas se pueden tomar para prevenir la transmisión de enfermedades entre las poblaciones humanas y de vida silvestre.

Con relación a la comunidad de roedores, se mojará el conocimiento de especies de roedores en diferentes tipos de hábitat, siendo este un aporte al conocimiento de los micromamíferos terrestres en el Norte de Bolivia, y con esta información se podrá hacer un análisis de la variación de la comunidad de micromamíferos terrestres en dos diferentes tipos de hábitat.

MARCO METODOLOGÍCO:

Este proyecto se llevará a cabo en cuatro estaciones de campo, administradas por el Centro de Investigación y Preservación de la Amazonía y la Universidad Amazónica de Pando, Cobija, Departamento de Pando, Bolivia. Los niveles de perturbación humana son mínimos en dos sitios y altamente perturbados en otros dos sitios. Los sitios menos perturbados contienen grandes extensiones de bosque primario, mientras que los sitios altamente perturbados están cerca de carreteras principales, grandes ciudades y están

rodeados de grandes áreas de pastos y campos agrícolas. Atraparemos atas negras invasoras (*Rattus rattus*), marsupiales nativos y roedores nativos en cada sitio. Considerando que el éxito de captura promedio para roedores es de 8%, se requiere emplear el mayor esfuerzo posible para tener la mayor probabilidad de detectar la presencia de virus o parásitos en las diferentes poblaciones. De hecho, se sabe que la prevalencia de anticuerpos de Hantavirus en poblaciones de roedores silvestres es de aproximadamente el 5% (Pini, et al. 2003 en NW Argentina encontró anticuerpos en 2.8% en Akodon simulator y 5.1% en *Calomys callosus*; Carroll, et al. 2005 en Bolivia, encontró 7.7% en *Oligoryzomys microtis* y 8.1% *Calomys callosus*).

Métodos de captura de animales

En este estudio se colectarán animales salvajes y de vida libre de cuatro sitios de estudio en la selva amazónica boliviana. Las trampas de animales vivos Tomahawk y Sherman se utilizarán para la captura de marsupiales y roedores. Las trampas serán cebadas con avena, atún y esencia de vainilla. Las trampas se colocarán por la noche antes de la puesta del sol y se revisarán temprano a la mañana siguiente (Kilonzo et al., 2013).

El muestreo de los animales implicará la delimitación de una grilla de 25 estaciones separadas 10 metros una de la otra. En cada estación se colocarán dos trampas Sherman. Todo el procedimiento de trampeo y manipulación de los especímenes y obtención de muestras se realizará de acuerdo a Mills et al. (1995) y Kelt y Hafner (2010) para mantener las medidas requeridas de bioseguridad.

Una vez capturados, los animales serán tranquilizados utilizando Ketamina (K) 50mg/Kg + Xilacina (X) 5 mg/Kg de forma intra muscular. Una vez anestesiados, los individuos pequeños serán sacrificados a través de presión torácica y para los animales grandes (como por ejemplo ratas) se utilizará una sobre dosis del anestésico que implica el uso de tres veces la dosis mencionada arriba. Una vez muerto, cada animal será medido, pesado, sexado y etiquetado. Se procederá a evaluar su estado de salud (pelaje, síntomas de deterioro, por ejemplo, en el hocico, etc.). Para todos los animales, se recolectarán sangre y heces para examinar patógenos, además de tejidos de bazo, pulmones, hisopados bucales, orina, heces, músculo y cráneo. También limpiaremos el ano de cada animal en busca de materia fecal y recogeremos todas las heces que se recolectan en las trampas.

Todos los especímenes serán conservados en alcohol al 96% para ser trasladados al laboratorio de la Colección Boliviana de Fauna, donde se realizará la identificación de los mismos. Una vez en la CBF se llevará a cabo la identificación en laboratorio y el posterior análisis de los datos. Para ello se realizará la identificación de especies con ayuda de claves taxonómicas y comparación con muestras de la Colección Boliviana de fauna, y de ser posible por análisis de cariotipo.

Para caracterizar las comunidades de roedores y comparar ambos tipos de ambiente se calculará la riqueza de especies y la proporción de capturas de cada especie respecto al total de animales capturados, con lo cual se podrá obtener los índices de diversidad de Shannon-Wiener. Para entender la acumulación de especies respecto al total de animales

capturados en cada ambiente se graficarán curvas de rarefacción para cada tipo de hábitat y curvas de rango abundancia, que nos permite comparar la equitatividad de la abundancia de individuos por especie, la identidad de las especies de roedores en cada tipo de ambiente y la presencia e identidad de especies raras. La abundancia relativa se estimará corrigiendo el número de individuos según el esfuerzo de captura realizado en cada sitio; se dividirá por el número de noches trampas y se multiplicará por 200 obteniéndose un valor estandarizado. Finalmente se evaluará la diversidad β analizando el recambio de especies entre los tipos de hábitat los cuales serán interpretados en función a la ecología de cada una de las especies de roedores.

Recolección de muestras biológicas y métodos de diagnóstico

De cada animal colectado se obtendrán muestras de sangre y heces. Aproximadamente la mitad de la sangre se almacenará en tubos con guanidina y la otra mitad en tubos de ARN de sangre TempusTM (Life Technologies, Grand Island, NY). Además, se realizarán dos frotis y dos gotas gruesas, y se impregnarán tres gotas de sangre en papel de filtro. Las muestras de sangre se almacenarán a 4°C, y los papeles de filtro y los frotis se almacenarán en un lugar seco hasta el momento del procesamiento. Las muestras fecales se recogerán de las jaulas de captura y se almacenarán en tubos Eppendorff con una solución de formalina al 10% para su conservación.

Se analizarán las muestras fecales, muestras de sangre en guanidina, frotis de sangre y papeles de filtro impregnados en el Laboratorio de Investigación de la Cátedra de Parasitología y en el laboratorio del IJNSAD, en la Universidad Mayor de San Andrés en La Paz, Bolivia. Las muestras fecales se concentrarán utilizando la técnica de concentración de formalina / gasolina. Las muestras fecales concentradas se analizarán mediante microscopía de luz directa para parásitos gastrointestinales. Se analizarán las muestras de sangre para detectar agentes causantes de la malaria (*Plasmodium* sp.) y la enfermedad de Chagas (*Trypanosoma cruzi*). Los frotis y gotas gruesas se teñirán con una solución de Giemsa al 10% durante 30 minutos y luego se examinarán con microscopía óptica de 100x para detectar *Plasmodium* sp. y *Trypanosoma* sp. Un análisis adicional de la muestra de sangre conllevará una caracterización molecular para la identificación de especies de *Trypanosoma* y *Plasmodium*. El ADN se extraerá de las muestras de sangre conservadas en guanidina utilizando el kit Qiagen DNeasy (Qiagen, EE. UU.), según las recomendaciones del fabricante. Para la caracterización molecular de los parásitos *Trypanosoma*, las amplificaciones de ADN se llevarán a cabo de acuerdo con un protocolo de PCR multiplex basado en el polimorfismo de la región espaciadora no transcrita del gen mini-exón (Fernandes et al., 2001). Se utilizarán los siguientes cebadores: Tc1, Tc2, Tc3, Tr y un cebador Me, un oligonucleótido corriente abajo que corresponde a la parte más conservada del gen mini-exón. Los amplicones de 250 pb son característicos de TCII, TcV y TcVI, 200 pb de TcI, 150 pb de TcIII / TcIV y 100 pb de T. rangeli. Las muestras también se someterán a una PCR anidada utilizando cebadores para la identificación de especies de *Plasmodium* (*P. malariae* / *P. brasiliense*, *P. vivax* / *P. simium* y *P. falciparum*), dirigidas a la subunidad pequeña del ARN ribosomal 18S (18S SSU rRNA) gen (Snounou et al., 1993). Los productos de PCR se someterán a secuenciación utilizando los cebadores específicos.

Adicionalmente, se colectarán muestras de tejidos de los animales preservados en alcohol al 96%, los ectoparásitos serán guardados en tubos Eppendorf con alcohol al 96%, se tomarán muestras de pulmón, orina, vejiga y bazo para determinar la presencia de genoma viral correspondiente a Hantavirus, lo cual se realizará a través de biología molecular.

Paralelamente se analizará las muestras de sangre conservadas en los tubos de ARN de sangre TempusTM para detectar cualquier patógeno de transmisión sanguínea, además de las especies de *Trypanosoma* y *Plasmodium*. Estas muestras de sangre se enviarán a los Estados Unidos y el análisis se llevará a cabo en Sequencing Core en Chicago, IL, EE. UU. Cada muestra de sangre se dividirá para que una porción se pueda usar para la secuenciación escopeta de última generación (NGS por su denominación en inglés next-generation shotgun sequencing), y el resto se reserve para un análisis posterior utilizando un enfoque de PCR cuantitativa dirigida (qPCR). Las muestras de sangre separadas para NGS se agruparán por especie (por ejemplo, roedores, zarigüeyas) y por sitio de campo. El análisis de NGS se realizará utilizando una secuenciación de alto rendimiento de ARN total extraído de las muestras (Larsen et al., 2016). El ARN total se extraerá de las muestras utilizando el kit de aislamiento de ARN Spin TempusTM (Life Technologies, Grand Island, NY). La globina de ARNm se reducirá utilizando el kit GLOBINclear (Life Technologies, Grand Island, NY). La globina – ARN agotado se purificará luego utilizando el kit de limpieza y concentrado de ARN (Zymo Research, Irvine, CA). Para cada muestra, se utilizarán 100 ng de ARN para la construcción de la biblioteca RNA-seq (tamaño de fragmento de ~ 300 pb) siguiendo el protocolo Illumina Stranded RNA-Seq + Ribozero Gold (humano / ratón / rata). Las muestras se agruparán y secuenciarán en un secuenciador Illumina NextSeq500. Luego se realizará un análisis metagenómico para cada ensamblaje transcriptome para la clasificación taxonómica. Todas las lecturas de no-mamíferos se analizarán para detectar parásitos transmitidos por vectores y las secuencias asociadas se someterán a un análisis filogenético. Este flujo de trabajo permitirá la identificación de conjuntos de novo de ARN ribosomal y genes mitocondriales para parásitos transmitidos por la sangre. A continuación, se realizará un análisis de qPCR en todas las muestras ($n = 150$) para determinar la prevalencia de cada patógeno para todas las especies de prueba en los cuatro sitios (Watzinger et al., 2004). Los cebadores específicos necesarios para las pruebas de qPCR se determinarán en función de los resultados de la secuenciación en escopeta.

Todos los análisis estadísticos se realizarán utilizando el software estadístico R. Las diferencias en las prevalencias de patógenos y las coinfecciones (más de una infección por patógenos) entre las especies y los sitios de estudio se examinarán mediante las pruebas exactas de Fisher.

BIBLIOGRAFÍA:

- Álvarez-Romero, J. & R. Medellín. 2005. *Mus musculus*. Vertebrados superiores exóticos en México: diversidad, distribución y efectos potenciales. Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto U020. México D.F.
- Anderson, S. 1997. Mamíferos de Bolivia. Taxonomía y distribución. Bulletin of the American Museum of Natural History. Issue 231.
- Aplin K., P. Brown, J. Jacob, C. Krebs, & G. Singleton. 2003. Field methods for rodent studies in Asia and the Indo-Pacific. Ed Melbourne. Australian Centre for International Agricultural Research. Canberra, Australia. 61-65.
- Bomford, M. 1987. Food and reproduction of wild house mice. 1. Diet and breeding seasons in various habitats on irrigated cereal farms in New South Wales. Aust Wildlife Res. 125:183–196.
- Cruz, L. E, C. Lorenzo, O. G. Retana & E. C. Sántiz. 2010. Interspecific variability in the abundance of small rodents in the highlands of Chiapas, Mexico. 1: 129-136.
- Greenberg, R., P. Bichier & A. Cruz. 2006. Strategies for the control of pests and diseases for sustainable cocoa production in Nigeria T. C. N. Ndubuaku and E.U. Asogwa. African Scientist. 7 (4)
- Jackson T. P. & R. J. Van Aarde. 2004. Diet quality differentially affects breeding effort of *Mastomys coucha* and *M. natalensis*: Implications for Rodent Pests. Journal of experimental Zoology. 301A: 97–108.
- Marconi P. N. & F. O. Kravetz. 1986. Comunidad de roedores del parque Nacional El Palmar (Entre Ríos, Argentina) según la historia del fuego. Revista Chilena de Historia Natural. 59: 47 – 57.
- Medellin R. A., M. Equihua & M. A. Amin, 2000. Bat diversity and abundance as indicators of disturbance in Neotropical Rainforests. Conservation Biology 14:6.
- Miño, M. 2003. Caracterización de las comunidades de pequeños roedores en granjas avícolas del partido de Exaltación de la Cruz (provincia de Buenos Aires). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Nowak, R. 1991. Walker's mammals of the world. The Johns Hopkins University Press. Baltimore, Maryland, EUA.
- Ortega, J., J. Martínez & D. Tirira (eds.). 2014. Historia de la mastozoología en Latinoamérica, las Guayanas y el Caribe. Editorial Murciélagos Blanco y Asociación Ecuatoriana de Mastozoología, Quito y México.

Pardiñas, U., G. D'Elía & P. Ortiz. 2002. Sigmodontinos fósiles (Rodentia, Muroidea, Sigmodontinae) de América del Sur: Estado actual de su conocimiento y prospectiva. *Mastozoología Neotropical* 9: 209-252.

Patton, J., U. Pardiñas & G. D'Elía. 2015. *Mammals of South America. Volumen 2: Rodents.* Universidad of Chicago Press. 1336 pp.

Redford, K & J. Eisenberg. 1992. *Mammals of the Neotropics. Vol. 2: The Southern Cone.* The University of Chicago Press. Chicago, EUA.

Revollo-Cadima, S., A. Rico C., L.F. Pacheco & J. Salazar-Bravo. 2018. Community structure and abundance of small non-volant mammals at the wave front of agroforestry in Alto Beni, Bolivia. Submitted to Revista Mexicana de Mastozoología.

Sánchez, V. 2018. Cambio de la diversidad y composición de pequeños mamíferos en los bosques ribereño con cultivo y pie de monte en la comunidad T'simane Cuchisama del departamento del Beni, en las épocas, húmeda-seca, seca y seca- húmeda. Tesis de grado para optar al título de Licenciatura. Carrera de Biología, UMSA. La Paz, Bolivia.

Saunders D. A., R. J. Hobbs & C. R. Margules. 1991. Biological Consequences of Ecosystem Fragmentation: A Review. *Conservation Biology*. 5: 18-32.

Stenseth, N. 1980. Spatial heterogeneity and population stability: some evolutionary consequences. *Oikos*. 35:165-184.

Stevens R. & S. Tello. 2011. Diversity begets diversity: relative roles of structural and resource heterogeneity in determining rodent community structure. *Journal of Mammalogy*. 92:387-395.

Umetsu, F., & R. Pardini. 2007. Small mammals in a mosaic of Forest remnants and anthropogenic habitats – evaluating matrix quality in a Atlantic forest landscape. *Landscape Ecology*. 22: 517 - 530.

Valencia-Pacheco, E., J. Avaria-Llautureo, C. Muñoz-Escobar, D. Boric-Bagetto & C. Hernández. 2011. Patrones de distribución geográfica de la riqueza de especies de roedores de la tribu Oryzomyini (Rodentia: Sigmodontinae) en Sudamérica: Evaluando la importancia de los procesos de colonización y extinción. *Revista Chilena de Historia Natural*, 84: 365-377.

Vásquez R. A., A. Ebensperger & F. Bozinovic. 2002. The influence of habitat on running velocity, intermittent locomotion, and vigilance in a diurnal rodent. *Behavioral Ecology*. 13: 182 – 187.

Vergara, P., A. Rivera-Hutinel, A. Fariás, H. Cofré, H. Samaniego e I. Hahn. 2014. Capítulo 6: ¿Cómo Responden los Animales del Bosque a las Perturbaciones Antropogénicas? Pp.: 235-254. En: Donoso, C., M. González & A. Lara (eds.). 2014. *Ecología forestal: Bases para el Manejo sustentable y Conservación de los Bosques Nativos de Chile*. Ediciones Universidad Austral de Chile.