

**FILOGENIA MOLECULAR, HISTORIA DEMOGRÁFICA Y ESTRUCTURA
GENÉTICA DE NUEVAS CEPAS DE *Trypanosoma terrestris* AISLADAS DE
Tapirus terrestris EN LOS BIOMAS BRASILEÑOS DE PANTANAL Y MATA
ATLÁNTICA**

SERGIO DANIEL PÉREZ PRECIADO

**Trabajo de grado como requisito parcial para optar por el título de
Biólogo**

Director

ARLEI MARCILI, Ph.D.

Universidad de São Paulo, SP., Brasil

UNIVERSIDAD DEL TOLIMA

FACULTAD DE CIENCIAS

PROGRAMA DE BIOLOGÍA

IBAGUÉ - TOLIMA

2016



**FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA**

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TRABAJO DE GRADO

TÍTULO Filogenia Molecular, historia demográfica
y estructura genética de nuevas cepas de
Trypanosoma ferox aisladas de los bosques brasileños
de Pantanal y mata Atlántica
AUTORES Sergio Daniel Pérez Preciado
DIRECTOR Arlei Marcelli
JURADOS Lina Marcela Villa - Gustavo Adolfo Vallejo
CALIFICACIÓN 5.0 (Laureado).

☒ APROBADO

☐ REPROBADO

OBSERVACIONES

FIRMAS

[Firma]
JURADO 1.
[Firma]
Director del trabajo

[Firma]
JURADO 2.
[Firma]
Director del Programa

Ciudad y fecha: Ibagué, 1 marzo 2017

“La naturaleza es pródiga en variedad, aunque avara en innovación”
(Charles Darwin, *On the Origin of Species*, 1859)

AGRADECIMIENTOS

Ninguna de las contribuciones hechas en este trabajo, hubiesen sido posibles sin la infinita paciencia, comprensión y apoyo de un puñado de amigos, mis hermanos y en especial de mi Mamá, sin cuyo amor infinito y entrega absoluta, yo no tendría el mismo amor, eso sí imperfecto, por las cosas que hago.

Al Prof. Dr. Arlei Marcili, mi orientador, y a quién realmente debo mi iniciación científica. Agradezco a él no sólo por su generosidad intelectual y profesionalismo sino por sus consejos y apoyo personal, que hoy me hacen una mejor persona.

A la Profa. Dra. Patrícia Medici (y todo su equipo), coordinadora de la Iniciativa Nacional de Conservación de la danta brasileña (*Tapirus terrestris*) del Instituto de Pesquisas Ecológicas y del IUCN/SSC Tapir Specialist Group (TSG) por el material correspondiente al bioma Pantanal.

A Sueli, responsable del Laboratorio de Biología Molecular Aplicada y Serología del Departamento de Medicina Veterinaria Preventiva y Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de São Paulo, por la colaboración prestada en la fase final del secuenciamiento de DNA.

A los colegas del laboratorio de enfermedades parasitarias (VPS-FMVZ/USP) por su apoyo y compañía en la convivencia.

A Bruna Matarucco, Juliana Silva y Andréa Pereira de la línea de investigación de filogenia y filogeografía de *Trypanosoma* y *Leishmania* del VPS-FMVZ/USP por su empeño y colaboración en el aprendizaje. Especiales agradecimientos a mi amiga Alhelí Romero de la Universidad Autónoma de Yucatán por su excelente humanidad y compañerismo durante mi estancia en la USP.

A Isaías L. Villegas del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por disponer amablemente de los computadores multiprocesadores para analizar los datos de este trabajo.

A Isabella Furegatti y a Alexander Arciniegas Torres, ambos miembros de las Oficinas de Relaciones Internacionales de la USP y la UT, respectivamente, por toda su amabilidad.

Al Dr. Jared A. Grummer del laboratorio Leaché de la Universidad de Washington por su valiosa colaboración en la delimitación y los alcances de este trabajo, así como en la ayuda en algunos análisis.

A todos, muchas gracias.

RESUMEN

A pesar de que los tripanosomas son un extenso grupo de parásitos, poco se sabe sobre los mecanismos evolutivos que están promoviendo divergencia en sus poblaciones naturales, y con esto, la escala espacial y temporal en la que están ocurriendo estos cambios. Para entender esta dinámica, aquí uso marcadores nucleares parasitarios y datos de radiotelemetría del hospedero vertebrado para explorar la genética de poblaciones, aspectos demográficos y relaciones filogenéticas de nuevas cepas de *Trypanosoma terrestris*; una especie recientemente descrita y aislada de tapires de Brasil. Los estudios filogenéticos mostraron por primera vez que el clado *T. terrestris* está asociado a la historia evolutiva de sus hospedadores *Perissodactyla*. De igual modo *T. terrestris* es el clado hermano del clado *T. grayi*, corroborando el 'ecological host fitting' como principal mecanismo evolutivo en los tripanosomas.

Las reconstrucciones demográficas mostraron una fuerte reducción en los tamaños poblacionales del parásito durante el último período glacial en el Pleistoceno, demostrando la influencia de los hospederos y las fluctuaciones climáticas sobre la dinámica poblacional de los aislados de *T. terrestris*. A razón de esto, no hubo evidencia de estructura genética en los aislados parasitarios procedentes de los biomas estudiados, excepto por un haplotipo fuertemente diferenciado en una escala espacial microgeográfica en el Pantanal de Nhecolândia. Así pues, aquí se proporciona evidencia de que el vector está promoviendo la diferenciación del parásito mediante 'ecological host-fitting' y esto puede ocurrir a distintas escalas espaciales. Sin embargo, los mecanismos ecológicos y genéticos encargados de promover especialización y divergencia en poblaciones de parásitos aún son materia de investigación y de debate. Estudios genómicos comparados en amplia escala, que combinen enfoques metodológicos como aquellos destinados a estudiar la genética del paisaje en unión con la filogeografía histórica, serán de gran utilidad para entender la

extensa radiación de los tripanosomas, incluidos los tripanosomas patógenos del hombre.

Palabras clave: *Trypanosoma terrestris*, ecological host fitting, divergencia microgeográfica, cuello de botella, relaciones filogenéticas.

ABSTRACT

Notwithstanding the trypanosomes are a widespread group of parasites, little is known on evolutionary mechanisms promoting divergence over their natural populations and thereby, the spatial and temporal scales at which these changes are happening. To understand this dynamics, I use parasite nuclear markers and host telemetric data to explore parasite population genetics, phylogenetic relationships, divergence time estimation and coalescent demographic history of *Trypanosoma terrestris*, a recently described clade isolated from tapirs in Pantanal and Atlantic Forest biomes of South America. Phylogenetic relationships and divergence times showed: i) *T. terrestris* clade is a basal clade of trypanosomes diverged from an ancient *Perissodactyla* host during early Eocene and ii) *T. terrestris* isolated from *Perissodactyla* hosts and *T. grayi* clade isolated from crocodiles in Africa and caimans from South America are sister clades. Therefore these results support the 'ecological host fitting' as driving mechanism in parasite phylogenetic diversification and illustrate the complex evolutionary dynamics of trypanosomes.

EBSPs showed a sharp reduction (population bottleneck) in parasite populations during late Pleistocene. Along with that, Bayesian clustering analysis, AMOVA results and barrier tests did not show evidence of population genetic structure except by one haplotype from Nhecolândia landscape in Pantanal, strongly differentiated from its dispersal neighborhood and those isolates from Atlantic Forest (~14Km and $F_{ST}= 0.808$). In conjunction with host dispersal, provided by telemetric and genetic data, here I confirm that invertebrate host is promoting parasite divergence through colonization of new hosts at fine spatial scales (microgeographic). Thus, these microevolutionary trends are in agreement with 'ecological host fitting' as driving mechanism in trypanosome evolution. To understand general mechanisms shaping genetic variation and adaptation within and among parasite populations is necessary incorporate comparative genome

wide scale studies and useful methodological approaches, like those combining historical phylogeography and landscape genetics, both at fine and wide spatial scales.

Keywords: *Trypanosoma terrestris*, ecological host fitting, microgeographic divergence, population bottle-neck, phylogenetic relationships.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	18
1. MARCO TEÓRICO	22
1.1 CLASIFICACIÓN Y FILOGENIA DE LOS TRIPANOSOMAS.....	22
1.1.1 La Familia Trypanosomatidae.....	22
1.2 EL GÉNERO TRYPANOSOMA	23
1.2.1 El Clado <i>T. terrestris</i>	27
1.3 DIFERENCIACIÓN Y ESPECIACIÓN EN PARÁSITOS	29
1.3.1 Ecología y Evolución de Parásitos.	31
1.3.1 Modos De Especiación En Parásitos.	34
1.3.2 Los Parásitos y el Concepto Biológico de Especie.....	34
1.3.3 ¿Cuándo un Parásito se Diferencia En Alopatria y Cuándo en Simpatria?.....	36
1.3.4 “HOST-SWITCHING” Y “ECOLOGICAL FITTING”	38
1.3.5 Ecological Fitting Y Su Mecanismo.	39
1.4 TIEMPO Y MODO DE EVOLUCIÓN EN LOS TRIPANOSOMAS.....	43
1.5 MARCADORES MOLECULARES USADOS EN ESTE ESTUDIO	45
2. OBJETIVOS	48
2.2 OBJETIVO GENERAL.....	48
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
3. MATERIALES Y MÉTODOS	50
3.1 AISLAMIENTO Y ORIGEN GEOGRÁFICO DE LOS AISLADOS DE T. TERRESTRIS.....	50
3.2 CRECIMIENTO Y MANUTENCIÓN DE CULTIVOS AXÉNICOS Y EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO.....	51

3.3	OBTENCIÓN DE DATOS MOLECULARES	52
3.4	ALINEAMIENTOS.....	53
3.5	ANÁLISIS EN GENÉTICA DE POBLACIONES.....	55
3.6	TEST DE AISLAMIENTO	56
3.7	FILOGENIA MOLECULAR Y ESTIMACIÓN DE TIEMPOS DE DIVERGENCIA	57
3.8	RECONSTRUCCIÓN DEMOGRÁFICA	59
4.	RESULTADOS.....	64
4.1	DIVERSIDAD, ESTRUCTURA GENÉTICA Y TEST DE AISLAMIENTO.....	64
4.2	RELACIONES FILOGENÉTICAS Y ESTIMACIÓN DE TIEMPOS DE DIVERGENCIA	70
4.3	HISTORIA DEMOGRÁFICA	73
5.	DISCUSIÓN	75
5.1	‘HOST-SWITCHING I’: NUEVOS REPORTES Y RELACIONES EVOLUTIVAS EN EL CLADO T. TERRESTRIS.....	75
5.2	‘HOST-SWITCHING II’: EL HOSPEDERO INVERTEBRADO ESTÁ PROMOViendo LA DIFERENCIACIÓN DEL PARÁSITO EN UNA ESCALA ESPACIAL FINA	79
5.3	TENDENCIAS DEMOGRÁFICAS.....	86
6.	CONCLUSIÓN	90
	REFERENCIAS	92

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Medios de cultivo	52
Tabla 2 Regiones amplificadas y condiciones de amplificación.	54
Tabla 3 Aislados de <i>T. terrestris</i> obtenidos y empleados en este estudio con la información de los datos telemétricos del hospedero y la procedencia geográfica.	61
Tabla 4 Estadísticos resumen para índices de diversidad genética y pruebas de neutralidad.	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árbol filogenético con las secuencias concatenadas de los genes SSU rDNA y gGAPDH obtenido mediante métodos bayesianos y de máxima parsimonia, ubicando las relaciones filogenéticas del clado <i>Trypanosoma</i> (Los soportes de bootstrap están seguidos de la probabilidad posterior, en los nodos del árbol). El clado <i>T. terrestris</i> está resaltado.....	28
Figura 2. Diagrama esquemático del gen ribosomal.	47
Figura 3. Aislados positivos de <i>T. terrestris</i> de acuerdo al bioma de procedencia. AM: Amazonía, CE: Cerrado, PA: Pantanal, AF: Mata Atlántica, P: Pampa, CA: Caatinga.	64
Figura 4. Red de haplotipos de ITS1 construida mediante el método MSN (<i>Minimum-spanning Network</i>) implementado en el software popART. El tamaño de los círculos corresponde a la frecuencia de los CBTs por haplotipo y las líneas verticales que conectan la red representan el número de mutaciones.	66
Figura 5. Número de diferencias moleculares entre haplotipos de ITS1, obtenida del número promedio de diferencias pareadas de Nei, en Arlequin.....	67
Figura 6. Resultados del análisis de clustering bayesiano en STRUCTURE. A) Modelo Admixture, B) Modelo no-Admixture. Los colores vendrían a representar el número más probable de clústeres genéticos (K=4). Los outgroups corresponden a los aislados parasitarios de rinocerontes de Malasia y fueron definidos como grupos externos por ser un análisis poblacional.	69
Figura 7. Resultados del test de BARRIER basado en el bootstrapping de 100 matrices de distancias genéticas K2P (<i>Kimura 2-parameter</i>) obtenidas del remuestreo aleatorio de los haplotipos de ITS1. Las líneas azules y verdes representan la teselación/triangulación de Voronoi/Delaunay y los puntos corresponden al origen geográfico de los haplotipos de ITS1 del Pantanal de Nhecolândia. Finalmente, el grosor de las líneas rojas es equivalente a la robustez de la barrera, identificada mediante el algoritmo de máxima diferencia	

de Monmonier; en este caso, la muestra 8 que posee un valor de bootstrap del 86% es la barrera genética que corresponde al H9.	70
Figura 8. Árbol bayesiano consenso (maximum clade credibility tree) mostrando las relaciones filogenéticas y los tiempos de divergencia (tMRCA) de los tripanosomas estudiados. La probabilidad posterior para cada nodo se indica en valores de 0 a 1 y los tiempos de divergencia están en millones de años. Las barras azules horizontales representan el 95% de los intervalos de credibilidad posterior (HPD) para los estimados de divergencia.....	72
Figura 9. Diagramas de horizonte bayesiano extendidos (EBSPs) con la distribución total de la probabilidad posterior de las tendencias demográficas de los aislados de <i>T. terrestris</i> empleados en este estudio. La figura de la derecha es la ampliación de la primera, a una escala de 500ky. Las líneas punteadas representan el tamaño poblacional de las muestras y las líneas continuas los intervalos de credibilidad posterior (95% HPD). El eje y está en escala logarítmica y el eje x en millones de años antes del presente.....	73
Figura 10. Histograma de eventos coalescentes presentes en la reconstrucción demográfica de los aislados de <i>T. terrestris</i>	74

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Haplotipos de ITS1 con sus CBTs asociados, considerando únicamente los sitios polimórficos.....	115
Anexo B. Tasas mutacionales empleadas en la reconstrucción demográfica.	116
Anexo C. Resultados de los análisis de varianza molecular (AMOVAs) bajo los dos diferentes esquemas de agrupamiento.	117
Anexo D. Fotomicrografía de epimastigotes en formas de cultivo (CBT199) teñidos con Giemsa, mostrando el agrupamiento en roseta distintivo de <i>T. terrestris</i> , derivados de la fase logarítmica tras once días de crecimiento en medio LIT (K: kinetoplasto, N: núcleo).....	118
Anexo E. Árboles de genes gGAPDH (derecha) y V7V8 SSU rDNA (izquierda) inferidos en el análisis *BEAST. En ambos casos los valores de divergencia para los aislados del clado <i>T. terrestris</i> son altos (PP= 1) así como los valores de probabilidad posterior que soportan a los clados hermanos <i>T. grayi</i> / <i>T. terrestris</i>	119
Anexo F. Diagrama de horizonte bayesiano extendido (EBSP) sin los CBTs 94-97-98 con la representación del 95% de los intervalos de la probabilidad posterior (HPD) para el tamaño poblacional de los aislados de <i>T. terrestris</i> . Las tendencias demográficas ilustran el mismo declive en los aislados de <i>T. terrestris</i> ~100mil años A.P., proveyendo evidencia de que las tendencias demográficas no están influidas por estructura genética. El tiempo está en millones de años antes del presente y los tamaños poblacionales están en escala logarítmica.....	120
Anexo G. EBSP con la distribución posterior de las tendencias demográficas de los aislados de <i>T. terrestris</i> en ausencia de información temporal. El eje 'x' está en tasas mutacionales (sustituciones/sitio) y el eje 'y' corresponde al tamaño poblacional * tasa mutacional (en escala logarítmica).	121

LISTA DE ABREVIATURAS

BAB	Medio Agar Sangre ('Blood Agar Base')
BSP	Diagrama de Horizonte Bayesiano
CBT	Colección Brasileña de Tripanosomátidos
DMSO	Dimetil Sulfoxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleótidos Trifosfato
EBSP	Diagrama de Horizonte Bayesiano Extendido
EDTA	Ácido Etilendiaminotetracético
ExoSAP	Exonucleasa Fosfatasa Alcalina
gGAPDH	Glicosomal Gliceraldehído 3-Fosfato Deshidrogenada
HPD	Highest Posterior Density
ITS1	Espaciador Transcrito Interno 1
Ky bp	Miles de años antes del presente
LIT	Medio de Cultivo Triptosa Infusión de Hígado
MCC	Maximum Clade Credibility
mL	Mililitro
mM	Milimolar
my bp	Millones de años antes del presente
Pb	Pares de bases
PBS	Tampón Fosfato Salino
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PP	Probabilidad posterior
rDNA	DNA ribosomal
SE	Solución salina Tris-EDTA
SFB	Suero Fetal Bovino
SSU	Subunidad pequeña
TAE	Tampón Tris acetato-EDTA

TE	Tampón Tris-EDTA
tMRCA	Edad del Ancestro Común más reciente
UV	Radiación ultravioleta

INTRODUCCIÓN

El parasitismo es uno de los modos de vida más exitosos sobre la Tierra. Al menos un 40% de todas las especies animales son parásitos y se estima que dentro de los metazoos el parasitismo por lo menos ha evolucionado independientemente unas 223 veces (Weinstein y Kuris, 2016). Entender los mecanismos que gobiernan la extraordinaria diversificación de parásitos es uno de los principales retos que constituyen la ciencia de la biología evolutiva (Koop et al., 2014).

Dado que el hospedero representa un ambiente rápidamente cambiante y además un sitio para la reproducción, a fin de sobrevivir, los parásitos deben adaptarse continuamente. Esto hace que los factores que promueven la diversificación de los parásitos sean potencialmente mayores que en los organismos de vida libre. La variación en los factores ecológicos, la vagilidad del hospedero, la enorme complejidad de sus ciclos de vida, su carácter clonal, sus aspectos demográficos y sus mecanismos de dispersión, son sólo piezas de un mismo rompecabezas. Visto de este modo, entonces, los parásitos representan modelos ideales para estudiar procesos de diversificación y especiación (de Meeûs et al., 1998). Sin embargo, éstos han sido casi en su totalidad ignorados en la literatura referente a temas de especiación; incluso en la literatura parasitológica los estudios confinados a estudiar procesos que originan nuevas especies son virtualmente escasos (Huyse et al., 2005).

Los tripanosomas (género *Trypanosoma*), a pesar de ser organismos altamente exitosos que parasitan todas las clases de vertebrados en todos los continentes (Hamilton y Stevens, 2010), tampoco constituyen la excepción. De hecho, la mayor parte de los estudios evolutivos sobre el género se han enfocado principalmente en especies de importancia médica o veterinaria, como en los casos de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei* (vg. Machado y Ayala, 2001;

Llewellyn et al., 2009abc, Marcili et al., 2009abc; Kaboré et al., 2011; Llewellyn et al., 2011; Lewis et al., 2011; Messenger et al., 2012; Pyana et al., 2015; Siström et al., 2016). Los trabajos destinados a abordar la inmensa variedad de tripanosomas de hospederos selváticos siguen constituyendo un verdadero vacío en el conocimiento.

Apenas en los últimos años, reportes de nuevas especies han ayudado a comprender significativamente las relaciones y orígenes dentro del clado (Hamilton et al., 2004; Simpson et al., 2006; Hamilton et al., 2007; Fermino et al., 2013; Acosta et al., 2013). El estudio molecular y las relaciones filogenéticas de los tripanosomas de murciélagos, por ejemplo, ha descubierto nuevas especies y linajes, y ha sido determinante en el establecimiento de hipótesis sobre los posibles orígenes de *T. cruzi* (Marcili et al., 2009b; Cavazzana et al., 2010; Lima et al., 2012; Hamilton et al., 2012). No obstante, estos trabajos (exceptuando aquellos destinados a estudiar la dinámica de los tripanosomas de importancia médica en hospederos selváticos), lejos de explorar los aspectos microevolutivos de las poblaciones de parásitos, se caracterizan esencialmente por abordar patrones biogeográficos y macroevolutivos.

Este enfoque macroevolutivo y biogeográfico, si bien puede ser útil en la medida en que los árboles filogenéticos proveen un registro indirecto de los eventos de especiación que llevaron a la distribución actual de las especies, no necesariamente son un indicador confiable sobre su rango histórico y geográfico, porque la actual distribución geográfica de las especies puede ser resultado de cambios considerables durante cortos períodos de tiempo, como en el caso, por ejemplo, de las expansiones post-glaciales seguidas de las edades de hielo durante el Cuaternario (Huyse et al., 2005).

Si extendemos estas observaciones a la literatura disponible sobre tripanosomas, pronto nos damos cuenta que poco o nada sabemos sobre el grado de diferenciación y aislamiento de las poblaciones de tripanosomas que

infectan hospederos selváticos. Menos aún sobre patrones demográficos e hipótesis filogeográficas que señalen los mecanismos de distribución y adaptación de estas especies.

En un intento por hacer frente a estos vacíos y, puesto que los factores ecológicos e historia de vida de las poblaciones de parásitos generalmente dan forma a los patrones microevolutivos, y éstos, a su vez pueden reforzar las tendencias macroevolutivas (Nadler, 1995; Criscione y Blouin, 2004; Huyse et al., 2005); en esta tesis me propongo estudiar aspectos sobre la microevolución y macroevolución de nuevas cepas de *Trypanosoma terrestris* (un clado y una nueva especie recientemente descrita por Acosta et al., en 2013), aisladas de poblaciones selváticas de dantas (*Tapirus terrestris*) en diferentes biomas de Sudamérica.

En el apartado microevolutivo de este trabajo, haré uso de marcadores nucleares y de la información genética contenida en estos para observar la diversidad genética y estructura genética de los aislados de *T. terrestris*. Adicionalmente mediante métodos multilocus coalescentes, elucidaré la historia demográfica de estos aislados y/o poblaciones en busca de expansiones o de reducciones poblacionales. Finalmente, en la sección macroevolutiva, mediante un enfoque de reloj molecular y teniendo en cuenta el desarrollo de recientes herramientas computacionales elaboraré una filogenia molecular (medida en tiempo) para resolver las relaciones filogenéticas de estos aislados con los demás miembros del clado *Trypanosoma*.

Con lo anterior, en esta tesis, abordo las siguientes preguntas, a saber: (i) ¿Cuál es el grado de diferenciación genética de los aislados de *T. terrestris*? (ii) ¿Se relacionaría esta diferenciación con la presencia de alguna barrera geográfica, biológica (hospedero) o ecológica? (iii) ¿Influyeron las fluctuaciones climáticas del pleistoceno sobre las poblaciones de *T. terrestris*? (iv) ¿Cómo se relacionan estos aislados con los demás miembros del clado *Trypanosoma*?, y por último,

(v) ¿Qué nos puede aportar la edad del ancestro común más reciente (tMRCA) a la historia evolutiva del clado *T. terrestris*?

Los resultados y conclusiones que de aquí se derivan, son de especial importancia en el entendimiento de la evolución del clado *T. terrestris* y el clado *Trypanosoma* sensu lato.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 CLASIFICACIÓN Y FILOGENIA DE LOS TRIPANOSOMAS

1.1.1 La Familia *Trypanosomatidae*. La familia *Trypanosomatidae* comprende protozoos flagelados pertenecientes al orden *Kinetoplastida* (Honigberg, 1963). Los kinetoplástidos junto con los euglénidos (Orden Euglenida) constituyen el filo *Euglenozoa* (Cavalier-Smith, 1981, 1993). Los organismos del orden *Kinetoplastida* están divididos en dos subórdenes; el primero, comprende especies de vida libre, *Bodonina*; y el segundo, *Trypanosomatina*, presenta apenas una familia –*Trypanosomatidae*– cuyos miembros son todos parásitos. Varias especies de la familia *Trypanosomatidae* son de importancia médica y veterinaria y son de interés ecológico y ambiental. Este grupo de protozoos se encuentra dentro de un gran clado de flagelados posicionado en los árboles filogenéticos como *Excavata*, que es formado además del filo *Euglenozoa*, por protozoos que no poseen mitocondria (ejemplos, *Giardia* y *Trichomonas*) y por los flagelados denominados “Jakobida” (Cavalier-Smith, 2004).

Los tripanosomátidos presentan una enorme diversidad de hospederos, infectando a animales vertebrados e invertebrados de prácticamente todos los órdenes. Después de los nematodos, estos organismos son los eucariotas que presentan una mayor diversidad de hospederos y la más amplia distribución geográfica (Vickerman, 1976; 1994; Stevens et al., 2001; Simpson et al., 2002). Estos pueden ser parásitos monoxenos o heteroxenos, de acuerdo a las formas presentadas durante su desarrollo: Cinco géneros comprenden protozoos monoxenos que parasitan insectos (*Herpetomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Leptomonas* y *Rynchoidomonas*); cuatro géneros albergan especies heteroxenas en cuyos ciclos ocurre alternancia entre hospederos invertebrados (generalmente artrópodos hematófagos) y vertebrados (*Trypanosoma*, *Leishmania* y *Endotrypanum*) o entre los invertebrados, insectos fitófagos y un

hospedero vegetal (*Phytomonas*) (Wallace, 1966; Hoare, 1972; Vickerman, 1976; Camargo, 1998). Dos géneros de especies monoxenas fueron propuestos en 2007: *Wallaceina* y *Sergeia* (Svobodova et al., 2007; Podlipaev, 1990). Los géneros *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Leptomonas* y *Herpetomonas* son polifiléticos y requieren revisiones taxonómicas.

El género *Endotrypanum* presenta especies exclusivas de perezosos encontradas en Brasil, Colombia, Guayana Francesa y Centroamérica. Las especies de este género, así como algunas especies de *Leishmania*, son transmitidas por flebotominos (*Diptera: Psychodidae*). Perezosos, osos hormigueros, armadillos, roedores y marsupiales son reservorios de *Leishmania* (Lainson y Shaw, 1980). Algunas especies del género *Leishmania* y *Endotrypanum* están genéticamente muy relacionadas, generando controversia acerca de la posición filogenética de estos organismos (Cupolillo et al., 2000). Sin embargo, recientemente Marcili et al. (2014) aportaron a la discusión e introdujeron una revisión taxonómica del género *Leishmania* y especies afines. Especies de clasificación dudosa como *L. hertigi* y *L. equatoriensis* que habían sido clasificadas originalmente dentro del género *Leishmania* fueron ubicadas dentro del género *Endotrypanum*. Adicionalmente, el análisis filogenético del gen SSU del rDNA y el gen gGAPDH ubicó a *Leishmania (L.) enriettii* en la parte basal del clado que componen las especies de *Leishmania* del nuevo y viejo mundo, aportando sobre el posible origen austral de las especies de *Leishmania*. Desde un punto de vista filogenético, *L. infantum chagasi* de Brasil por primera vez fue claramente diferenciado de *L. infantum* (responsable de leishmaniasis en el viejo mundo), corroborando taxonómicamente la posible introducción europea de *L. infantum* en las Américas (Marcili et al., 2014).

1.2 EL GÉNERO TRYPANOSOMA

Todos los tripanosomas (género *Trypanosoma*) son parásitos que infectan a todas las clases de vertebrados (peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos) en

todos los continentes. La inmensa mayoría de los tripanosomas son transmitidos por artrópodos hematófagos (principalmente insectos) y sanguijuelas, aunque algunas especies como *Trypanosoma evansi* y *Trypanosoma equiperdum* se transmiten mecánicamente. Estas especies presentan diversos estadios en diversas combinaciones, ya sea en la sangre y/o tejidos de los hospederos vertebrados e invertebrados (Hoare, 1972; Vickerman, 1994; Stevens et al., 2001; Simpson et al., 2002).

Aquellos que parasitan mamíferos han sido tradicionalmente separados en dos secciones: Salivaria y Stercoraria, esto según el desarrollo del hospedero invertebrado, y consecuentemente, con la vía de eliminación de las formas infectantes del parásito por el vector. La sección Stercoraria abarca los subgéneros *Schizotrypanum* (especie tipo *T. cruzi*), *Herpetosoma* (*T. lewisi*) y *Megatrypanum* (*T. theileri*), cuyas formas infectantes son transmitidas por las heces del insecto vector (Hoare, 1972). De igual modo, la sección Salivaria comprende tripanosomas cuyas formas infectantes son transmitidas por la saliva del insecto y se compone de los subgéneros *Duttonella* (*T. vivax*), *Nannomonas* (*T. congolense*), *Pycnomonas* (*T. suis*) y *Trypanozoon* (*T. brucei*) (Hamilton y Stevens, 2010).

Con respecto al origen y evolución de los parásitos tripanosomas, los estudios preliminares basados en la SSU del rDNA apuntaron a un origen parafilético (Maslov y Simpson, 1995). Sin embargo, posteriores análisis que incluyeron un mayor número de taxa, sugirieron un origen monofilético de estos organismos. Por tanto, la monofilia del género *Trypanosoma* se tornó en la hipótesis más aceptada en filogenias derivadas de las secuencias de los genes SSU rDNA y gGAPDH (Haag et al., 1998; Ferreira et al., 2007; Viola et al., 2009a; García et al., 2012). Así pues, estos trabajos indicaron que todas las especies de tripanosomas de peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos se originaron de un ancestro común (Hamilton et al., 2004).

La confirmación de la monofilia de los tripanosomas evidenció agrupamientos clave y posteriormente fueron descritos por diversos estudios (Stevens et al., 2001; Hamilton et al., 2007; Ferreira et al., 2007; Viola et al., 2009ab; Deschamps et al., 2011). En consecuencia, las inferencias filogenéticas más recientes dividieron a los tripanosomas en diversos clados (Hamilton et al., 2004, 2007; Ferreira et al., 2008; Viola et al., 2009ab). El clado acuático está compuesto por dos subclados, uno de ellos formado por tripanosomas aislados de peces, y el otro por tripanosomas aislados de ornitorrincos, probablemente transmitido por sanguijuelas acuáticas, y otro clado formado por tripanosomas de anuros, transmitidos por vectores flebotominos y sanguijuelas (Jakes et al., 2001ab; Hamilton et al., 2007; Ferreira et al., 2008; Ferreira et al., 2007, 2008). En un reciente esfuerzo por comprender las relaciones evolutivas dentro del clado acuático, Ferreira et al. (2015) hicieron un muestreo de tripanosomas aislados de anuros y encontraron tan sólo en Brasil evidencia de nuevos clados, por lo que concluyen que la diversidad de tripanosomas aún está subestimada, toda vez que estudios en hospederos selváticos y procedentes de otras áreas del planeta son muy escasos o inexistentes.

El clado squamata está constituido por algunos tripanosomas de lagartos y cobras transmitidos por insectos flebotominos (Hamilton et al., 2007; Ferreira et al., 2008; Viola et al., 2008, 2009ab). El clado *T. avium/T. corvi* está compuesto por tripanosomas de aves, aparentemente generalistas y transmitidos por numerosos artrópodos (Votypka et al., 2002, 2012). El clado *T. cyclops*: Formado por tripanosomas de monos de Malasia (*T. cyclops*), uno de marsupial australiano, *Wallabia bicolor* y especies de tripanosomas obtenidas de sanguijuelas terrestres de la familia *Haemadipsidae* de Australia. La presencia de sanguijuelas en este grupo sugiere que estos organismos son sus principales vectores (Weinmann, 1972; Hamilton et al., 2005a).

El clado *T. lewisi* lo conforman tripanosomas encontrados principalmente en los órdenes *Lagomorpha*, *Rodentia* e *Insectívora* además de representar el grupo de

tripanosomas del subgénero *Herpetosoma*. Son transmitidos por pulgas y poseen especificidad por el hospedador vertebrado. Adicionalmente se han registrado infecciones en conejos, humanos y otros primates (Hamilton et al., 2005b, 2007; Sarataphan et al., 2007; Maia da Silva et al., 2004ab). El clado *T. brucei* está compuesto por mamíferos exclusivamente africanos y asociados con moscas tsé-tsé (Stevens et al., 2001; Hamilton et al., 2007; Van den Bossche et al., 2010). El clado *T. grayi* aborda tripanosomas de *Crocodylia* de África y las Américas (Viola et al., 2009b, Fermino et al., 2013).

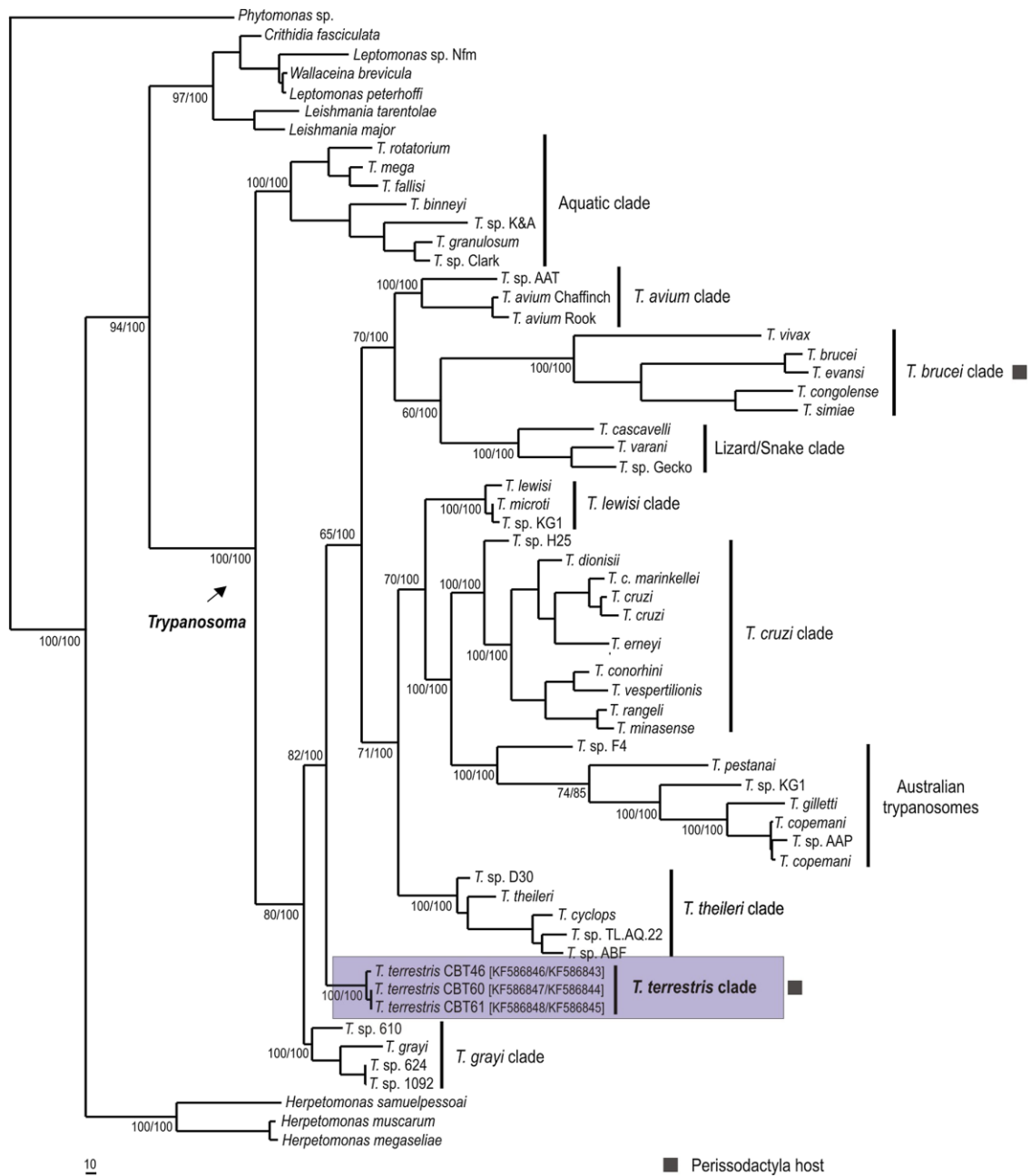
El clado *T. theileri* comprende tripanosomas de mamíferos ungulados del orden Artiodactyla, bóvidos domésticos (bueyes, búfalos y ovejas), silvestres (antílopes) y cérvidos, con gran especificidad por el hospedero vertebrado y transmitido por tabánidos (Rodrigues et al., 2006).

El clado *T. cruzi* está formado por las especies del subgénero *Schizotrypanum* (*T. cruzi*) y tripanosomas exclusivos de murciélagos del viejo y nuevo mundo (*T. dionissi*, *T.c. marinkellei*, *T. erneyi*, *T. livingstonei*, entre otros), *T. conorhini* aislado de ratas y otro aislado de canguros de Australia. En este caso, *T. rangeli* y *T. rangeli-like* conforman un grupo más homogéneo, relacionado con las especies de *Schizotrypanum* (Stevens et al., 1999ab, 2001; Briones et al., 1999; Hamilton et al., 2004, 2007, 2009; Maia da Silva et al., 2004b, 2007).

1.2.1 El Clado *T. terrestris*. Recientemente, una nueva especie de tripanosoma fue aislada de *Tapirus terrestris* (*Perissodactyla: Tapiridae*) y fue descrita y nombrada por Marcili y colaboradores como *Trypanosoma terrestris* (Acosta et al., 2013). Esta especie posee diversas diferencias morfológicas con las demás especies de tripanosomas, tales como la ausencia de flagelos libres en las formas epimastigotes de cultivo. El posicionamiento filogenético basado en la secuencia completa de los genes SSU rDNA y gGAPDH demostró que se trata de una nueva especie con altos valores de divergencia comparado con los clados ya descritos para el género *Trypanosoma*, siendo propuesta como un nuevo clado: *Trypanosoma terrestris*, a fin de albergar a todos sus miembros, en posteriores estudios. Por lo demás, los vectores, patogenicidad y potencial estructura filogeográfica de posibles representantes de otras regiones, permanecen desconocidos y pueden ser de carácter informativo para definir y mejorar la comprensión de los tripanosomas *sensu lato*.

Con respecto a la amplia distribución de *Tapirus terrestris* en Sudamérica, *Trypanosoma terrestris* es una especie muy poco conocida, pues la descripción inicial estuvo basada en apenas tres aislados de dantas capturadas en el bioma Mata Atlántica del Estado de Espírito Santo, en Brasil (Acosta et al., 2013). Esta constituyó la primera descripción de una especie de tripanosoma aislada de tapires o dantas sudamericanas. De ahí que, nuevos aislados y exámenes procedentes de otros biomas hayan sido obtenidos para este estudio.

Figura 1. Árbol filogenético con las secuencias concatenadas de los genes SSU rDNA y gGAPDH obtenido mediante métodos bayesianos y de máxima parsimonia, ubicando las relaciones filogenéticas del clado *Trypanosoma* (los soportes de bootstrap están seguidos de la probabilidad posterior, en los nodos del árbol). El clado *T. terrestris* está resaltado.



Fuente: Acosta et al. (2013).

1.3 DIFERENCIACIÓN Y ESPECIACIÓN EN PARÁSITOS

No hay especie viva que no esté vinculada de algún u otro modo con el parasitismo, o albergue especies parásitas. Por ello, el parasitismo es uno de los modos de vida más exitosos sobre la Tierra y constituye una larga porción de la diversidad de la vida (Price, 1980). El más reciente estimado sobre las veces que el modo de vida parásito evolucionó de forma independiente entre metazoos figura en unas 223 veces. Es decir, alrededor de la mitad de todos los animales conocidos son parásitos (Weinstein y Kuris, 2016). Huelga decir que los metazoos componen apenas un estrecho porcentaje de la biodiversidad y el parasitismo también abarca a organismos procariotas (bacterias y arqueobacterias) y a los eucariotas que abordamos en este trabajo (protozoos), además de plantas y hongos.

En suma, la extraordinaria diversificación de parásitos está presente en todos los dominios de la vida. No obstante, pese al éxito de este modo de vida, es poco lo que se conoce sobre los mecanismos que gobiernan su diversificación y las veces que el parasitismo ha evolucionado a lo largo del árbol de la vida (Weinstein y Kuris, 2016). Por esta razón, la comprensión de estos mecanismos es uno de los mayores retos de la biología evolutiva contemporánea (Koop et al. 2014).

Aun así, hay una tendencia patente entre muchos biólogos evolutivos a ignorar la cuestión de la especiación en parásitos. Por ejemplo, de Meeûs, Durand y Renaud (2003) advertían sobre la necesidad de incluir a los parásitos en los estudios y construcciones conceptuales sobre especiación; a pesar de que los microorganismos han recibido una mayor atención en los últimos años, los parásitos debido a sus características biológicas y ecológicas, pueden mejorar enormemente nuestra comprensión sobre estos procesos (de Meeûs et al., 2003). En ese mismo sentido, la revisión más reciente (Shapiro, Leducq y Mallet, 2016) si bien incorpora importantes variaciones a estos procesos en

microorganismos, todavía sigue ignorando el rol de los parásitos en la formación de nuevas especies, aun cuando muchos de los elementos conceptuales y pruebas empíricas que allí revisan los autores, también son aplicables a poblaciones de parásitos (tanto macroparásitos como microparásitos).

A pesar del desconocimiento anterior y del potencial que tienen estos organismos para diferenciarse y producir con ello nuevas especies, incluida su enorme diversidad e importancia médica, se han hecho notables esfuerzos por consolidar un cuerpo teórico destinado a la ecología y evolución de parásitos.

1.3.1 Ecología y Evolución de Parásitos. Los parásitos exhiben una serie de características, que a diferencia de los organismos de vida libre, los hace más susceptibles de sufrir variación en sus poblaciones. La variación es la condición indispensable para que cualquier cambio evolutivo tenga lugar (Darwin, 1859). El primero en tratar de dar una síntesis sobre la ecología y biología evolutiva de los parásitos fue Price en 1977 y 1980, y merece especial atención. Allí, aplicó sus observaciones en insectos fitófagos e identificó una serie de condiciones relacionadas con su posibilidad de desarrollar cambio evolutivo, que bien pueden ser aplicables a los demás organismos parásitos (Price, 1977).

Con esto, los parásitos: (1) son organismos de pequeño tamaño (microparásitos o macroparásitos) (2) Experimentan complejos y cortos ciclos de vida, con distintos sistemas reproductivos (carácter clonal, reproducción sexual y asexual) (3) Tienden a la especialización (vg., especificidad de hospedero) (4) Explotan recursos menos predecibles que los organismos de vida libre (5) Experimentan grandes cambios y fluctuaciones demográficas (6) Poseen hospederos con una distribución más fragmentada, de ahí que (7) Tengan una mayor tendencia al aislamiento entre poblaciones (como consecuencia son ampliamente homocigotos y podrían experimentar bajas en su diversidad genética) (8) Poseen tiempos generacionales cortos (de horas en el caso de los microorganismos o días en algunos macroparásitos) y por ende una mayor tasa evolutiva, esto es, evolucionan más rápido que los organismos de vida libre (por ejemplo, el tiempo generacional en humanos es de unos 30 años) (Price, 1977).

Estas observaciones hicieron posible que Price (1977) hiciera estas generalizaciones conceptuales: (1) Los parásitos están adaptados para explotar hábitats pequeños y discontinuos (2) Los hospederos representan un ambiente variable en tiempo y en espacio, lo que hace que los parásitos tiendan a formar razas geográficas y un grado de polimorfismo mucho mayor (3) Sus tasas de evolución y de especiación son altas (4) La radiación adaptativa es muy extendida (probablemente entre las más extendidas de la naturaleza) y depende

de: a) La diversidad del hospedero que está explotando (por ejemplo el número de especies y los grados de diferencias entre estas), b) La dimensión del hospedero que es blanco de potenciales colonizadores parásitos (tamaño del cuerpo, tamaño poblacional, distribución geográfica, etc.), c) El tiempo evolutivo disponible para la colonización de nuevos hospederos (vg., la formación de razas geográficas es el resultado del tiempo que lleva esto y la oportunidad ecológica otorgada por el hospedero una vez el parásito coloniza nuevos huéspedes), d) La presión selectiva para la modificación coevolutiva (por ejemplo, especialización) y e) La movilidad del hospedero (vg. si el hospedero es poco vágil el parásito puede especializarse y sufrir especiación en un área geográfica restringida) (5) Price elucida la especiación simpátrica en parásitos como un modelo tanto o más importante que la especiación alopátrica. Esta simpatría puede producirse por medio de *host-switchings* (o colonización de nuevos huéspedes) (Price 1977, 1980)

Dado lo anterior, se intuye que las poblaciones de parásitos tienden a experimentar fuertes variaciones en sus estructuras genéticas, promoviendo con esto rápida divergencia entre sus poblaciones y llevándolas posteriormente a una eventual especialización y especiación (Price, 1977; Kunz, 2002). Así pues, la estructura genética de los parásitos estará influenciada por los factores ecológicos de las especies con los que interactúan, incluyendo su demografía (tamaño efectivo poblacional o N_e), ciclo de vida, mecanismos de dispersión y la especificidad del hospedero (Nadler, 1995; Criscione y Blouin, 2004).

Huyse, Poulin y Théron (2005) ubicaron la importancia de la fragmentación espacial y la necesidad de emplear un enfoque microevolutivo y macroevolutivo en poblaciones naturales de parásitos para elucidar los motores detrás de su diversificación. De este modo, el uso de marcadores genéticos neutrales puede ser útil para evaluar los parámetros demográficos de los parásitos, que son relevantes en su estructura genética (Huyse et al., 2005).

Parámetros microevolutivos tales como los patrones de diferenciación genética en poblaciones fragmentadas, informan sobre la dispersión y la dinámica evolutiva de los parásitos, que a su vez afectan sus procesos macroevolutivos (Huyse et al., 2005). Así por ejemplo, un pequeño tamaño efectivo poblacional aunado a otros procesos como la transmisión vertical, puede conducir a un proceso de especiación por efecto fundador (Huyse et al., 2005). Es bien sabido que las poblaciones pequeñas (pequeño N_e) verán afectadas su heterocigosidad por un alto coeficiente de endogamia; a este punto dichas poblaciones experimentarán cambios aleatorios en sus frecuencias alélicas como resultado de la varianza muestral (esto es, deriva génica) (Nadler, 1995). En cambio poblaciones más estables, con grandes tamaños poblacionales podrían verse modeladas principalmente por procesos de selección (Huyse et al., 2005).

La migración o flujo de genes es otro factor esencial en la delimitación de la arquitectura genética de los parásitos y puede informar sobre el grado de especialización y/o diferenciación entre sus poblaciones (Combes, 2001). De hecho, uno de los puentes fundamentales entre los procesos ecológicos y evolutivos a escalas espaciales pequeñas y grandes es la asociación entre la dispersión y el flujo de genes. La teoría en genética de poblaciones predice que el grado de diferenciación entre subpoblaciones es inverso a la cantidad de flujo de genes. Con esto, también, la ecología del paisaje implica que el grado de conectividad del paisaje entre subpoblaciones está ligado a la capacidad de dispersión de las especies; así pues, se asume por regla general que a altos niveles de flujo de genes entre estas subpoblaciones, se prevendrá especialización y divergencia (adaptación local) en escalas geográficas pequeñas (Richardson et al., 2014). Sin embargo, en poblaciones de parásitos estos procesos de dispersión se ven interrumpidos una vez más por la naturaleza de su ciclo de vida (directo o indirecto), además de especialización y especiación ecológica debida a host-switchings (véase siguiente apartado) y diversos modos de especiación (Huyse, 2006).

1.3.1 Modos De Especiación En Parásitos. Los parásitos representan modelos ideales para estudiar diversificación, especialización y especiación no sólo por las características que se enumeraron arriba, sino porque pueden ayudar a comprender nuestro panorama general sobre estos procesos, toda vez que los parásitos violan las asunciones conceptuales sobre el modo en que las especies se producen (de Meeûs et al., 1998).

1.3.2 Los Parásitos y el Concepto Biológico de Especie. Toda la teoría sobre especiación producida luego de la síntesis neo-darwiniana estuvo principalmente enfocada en organismos de vida libre, especialmente en vertebrados terrestres (McCoy, 2003). En ese sentido, el concepto biológico de especie (BSC, por sus siglas en inglés) a lo largo de más de medio siglo ha sido uno de los principales paradigmas en biología evolutiva (Noor, 2002). Este implica que una especie es una población de individuos o un conjunto de poblaciones cuyos miembros tienen el potencial de cruzarse entre sí y de producir descendencia fértil y variable, que está reproductivamente aislada de otros grupos y cuya descendencia no puede producir descendencia fértil si se cruza con miembros de otras especies (revisado en De Meeûs et al., 2003). Visto de este modo, se entiende que el concepto biológico de especie es aplicable sólo a poblaciones que se reproducen sexualmente (apareamiento biparental) e implica además la existencia de aislamiento reproductivo, o a lo sumo, ausencia en el flujo de genes entre una población y otra (Mayr, 1942; de Meeûs et al., 2003)

Ahora bien, hechos como la disposición agregada y fragmentada de las poblaciones de parásitos, además de tener varios sistemas reproductivos y un complejo ciclo de vida con alternancia entre reproducción sexual y asexual, partenogénesis, autofecundación y apareamiento entre hermanos (sib-mating) configuran en toda su expresión excepciones serias al concepto biológico de especie, mostrando su inutilidad en la mayoría de los casos (de Meeûs et al., 1998; de Meeûs et al., 2003). Para citar tan sólo un ejemplo, se ha demostrado el rol que la clonalidad ha desempeñado en la evolución de *Trypanosoma* y

Leishmania. La evolución de *Trypanosoma cruzi* está dominada por un carácter casi exclusivamente asexual en su estructura genética, en donde la reproducción sexual ha desempeñado una influencia muy limitada (Machado y Ayala, 2001). El intercambio genético entre linajes distantemente relacionados de cepas clonales de *T. cruzi* comprobó en numerosos estudios la existencia de linajes enteramente híbridos (Machado y Ayala, 2001; Brisse, 2003; Tibayrenc y Ayala, 2013). Por tanto, dada la alta variabilidad genética y radiación en los linajes de *T. cruzi* es evidente que el intercambio genético en cepas distantemente relacionadas y la clonalidad elimina la premisa del aislamiento reproductivo y la sexualidad propuesta en el concepto biológico de especie. A pesar de esto, en poblaciones de *T. cruzi* la evidencia empírica también comprueba la existencia de sexualidad críptica contemporánea (Ramírez et al., 2013), haciendo el escenario aún más complejo.

Cualesquiera sean las alternativas, ya sea clonalidad o sexualidad, de Meeûs et al. (1998) desmienten la viabilidad del concepto biológico de especie para poblaciones de parásitos. En protozoos patógenos hay una emocionante discusión sobre el rol de la sexualidad y la clonalidad en la evolución, por ejemplo, de tripanosomas (Tibayrenc y Ayala, 2002; Ramírez y Llewellyn, 2014, 2015; Tibayrenc y Ayala, 2015).

Ya sea en uno u otro caso, es patente el poco alcance y perspectiva de este concepto. De hecho, la divergencia entre linajes, sin invocar la transferencia horizontal de genes, puede mantenerse en organismos de reproducción sexual a la luz del flujo de genes, eliminando la premisa del aislamiento reproductivo (Harrison y Larson, 2014; Shapiro et al., 2016).

1.3.3 ¿Cuándo un Parásito se Diferencia En Alopatría y Cuándo en Simpatria?

La idea de simpatria en parásitos se basa en el hecho de que el hospedero representa una parte fundamental de sus necesidades ecológicas (fuente de alimento, de reproducción, etc.) (Price, 1980). Por tanto, el hospedero configuraría un escenario ideal de especiación simpátrica (de Meeûs et al., 1998).

Lo anterior permite establecer que el hospedero per se, en los términos tradicionales que se asume los conceptos de simpatria y alopatria, constituiría una especie de barrera, análoga a la ausencia (simpatria) o presencia (alopatria) de barreras geográficas para los organismos de vida libre. Esto también permite apuntar que la clásica definición de simpatria (ausencia de barreras geográficas) no se ajusta de manera amplia a poblaciones de parásitos (McCoy, 2003). Así pues, según McCoy (2003) la especiación simpátrica en una población de parásitos puede tener lugar vía colonización de un nuevo hospedero (host-switching). Es decir, no importa si el hospedero colonizado está o no en el mismo rango del parásito. El aspecto determinante para clasificar la especiación como simpátrica o alopátrica es si esta barrera al flujo de genes es extrínseca (=alopatria; un parásito que corresponde a un determinado hospedero no puede mezclarse con un parásito de otro hospedero debido a la presencia de factores extrínsecos como la geografía y la especificidad del vector) o intrínseca (=simpatria; el parásito puede escoger su compañero sexual o nivel de emparejamiento dentro de un mismo hospedero u hospederos –host choice- o bien desarrollar fuerte especialización genética asociada con el sistema de emparejamiento entre los hospederos) (McCoy, 2003; Giraud, 2006).

Vale anotar que estas definiciones aún están en discusión y no constituyen un consenso en la comunidad científica. Por ejemplo, Giraud (2006) cuestiona la acepción tradicional de especiación alopátrica en parásitos, que consiste en la especiación del parásito luego de un host switching seguida de la especiación del hospedero (Huyse et al., 2005 citado por Giraud, 2006). Allí Giraud (2006) afirma que un host-switching o la especiación de un mismo hospedero a lo largo

de un rango geográfico no llevan automáticamente hacia la alopatría. De este modo, los parásitos que infectan las dos especies de huéspedes luego del host-switching estarán en alopatría sólo cuando: “1) Los hospederos están en alopatría (vg., esto es una barrera geográfica al flujo de genes); o bien cuando 2) los hospederos son simpátricos y los parásitos no pueden diseminarse hacia otros hospederos por causa de barreras extrínsecas diferentes a las geográficas; los ejemplos incluyen aquellos casos en donde la transmisión de los parásitos es vertical (de la línea parental hacia la descendencia) o en aquellos casos en donde diferentes especies de vectores son compartidas entre las diferentes especies de hospederos” (p.151)

En este mismo orden de ideas, Le Gac y Giraud (2004) cuestionan los puntos de vista de McCoy (2003) sobre la capacidad de elección del parásito sobre el tipo de hospedero para definir la simpatría. Los autores afirman que las condiciones que permiten, por ejemplo, la especiación alopátrica en parásitos que poseen hospederos simpátricos pueden ser posibles, pero no son generalizadas: “La mayor parte de los eventos de especiación en parásitos que tienen hospederos simpátricos poseen los mismos problemas para organismos de vida libre: ¿de qué manera un pool genético puede ser separado en dos pools sin la existencia de barreras extrínsecas?: La respuesta es siempre la misma: los parásitos deben evolucionar barreras intrínsecas que impidan el flujo de genes entre las especies incipientes” (p. 207). Por tanto Le Gac y Giraud (2004) y McCoy (2004) afirman en líneas generales que en vez de ajustar los parásitos a categorías fijas y limitadas como simpatría y alopatría, es más útil concentrarse en los mecanismos y procesos que llevan a las especies a diferenciarse, por ejemplo es más útil centrar la atención en aquellos procesos que impedirían el flujo de genes entre dos o más poblaciones. Dada la enorme diversidad de parásitos y de ciclos de vida es importante entonces optar por preguntarse sobre los mecanismos responsables del mantenimiento de la diversidad, adaptación, especialización y divergencia. Esta perspectiva puede ayudar a mejorar el panorama sobre el

criterio con el que operan y piensan los biólogos evolutivos (de Meeûs et al., 2003; Le Gauc y Giraud, 2004; McCoy, 2004).

1.3.4 “HOST-SWITCHING” Y “ECOLOGICAL FITTING”. Para hablar de estos dos importantes procesos, vale la pena empezar con la pregunta que Mehlhorn (2008) se hace en su enciclopedia de parasitología: “¿Cuando un sistema parásito-hospedero es fragmentado en dos o más partes, por ejemplo, debido a eventos geológicos, la población de parásitos diverge más rápido que el hospedero, o al contrario? ¿[Ambos sistemas] evolucionan en sincronía?” (p.1322).

Esta pregunta es importante porque refleja un modo de pensar tradicional que ya está empezando a abandonarse. Primero, ya hemos visto que los parásitos tienen una tendencia a evolucionar más rápido que el hospedero. Sin embargo, de aquí se desprende lo segundo, ¿los parásitos y el hospedero co-evolucionan en sincronía? En otras palabras, ¿los parásitos y el hospedero experimentan coespeciación? Si pensamos en los parásitos como entes “pasivos” del proceso evolutivo que dependen del hospedero para evolucionar, entonces la respuesta es que tan pronto los hospederos se aíslan y sufren procesos de especiación, los parásitos lo harán con ellos; si el huésped se extingue, entonces el parásito también lo hace. Ahora bien, esta acepción no es universal (Hoberg y Brooks, 2008).

El problema no es si la coespeciación ocurre o no, sino la tendencia a definirla como único modo de divergencia en los parásitos. La idea de coespeciación o especiación en sincronía dominó el modo de pensamiento de los parasitólogos a lo largo del siglo XX (revisado en Brooks y McLennan, 2002); aun así, la evidencia empírica indica lo contrario. La “paradoja parasitológica”, discutida en los últimos años, implica que los parásitos están fuertemente especializados a los recursos que explotan (hospederos) y por tanto poseen rangos limitados, restringidos a sus hospederos. No obstante, desplazamientos hacia hospederos (*host*

switchings) relativamente no relacionados son muy comunes a lo largo de la diversificación filogenética de los parásitos y se pueden observar directamente en el tiempo ecológico (Agosta et al., 2010; Hoberg y Brooks, 2015).

El mecanismo que permite explicar estas colonizaciones de nuevos hospederos es el *Ecological fitting* (ajuste ecológico) (Agosta et al., 2010). Ecological fitting es el proceso en que los organismos colonizan y poseen la capacidad de persistir en nuevos ambientes, usar nuevos recursos y formar nuevas asociaciones con otras especies como resultado de rasgos que ya poseen al momento de encontrar las nuevas condiciones (Agosta y Klemens, 2008). Este proceso de *ecological fitting* como resultado de un *host switching* constituye un primer paso necesario en el proceso de colonización de un nuevo hospedero. Así mismo, también es un paso clave en la formación de nuevas relaciones coevolutivas y de procesos adaptativos, esto es, que los parásitos sean sometidos a regímenes de selección y con esto se diferencien de sus especies ancestrales y sufran procesos de radiación y especiación (Agosta et al., 2010).

El éxito de un host switching, depende de: a) Oportunidad ecológica: El parásito debe coexistir en tiempo y espacio con el hospedero para que haya una oportunidad de desplazamiento, b) Compatibilidad: El parásito debe ser capaz de derribar las barreras que impone el hospedero (vg. inmunológicas) para sobrevivir y establecer relaciones durante largos periodos de tiempo, y c) Resolución de conflicto: La probable mortalidad del hospedero como resultado de la nueva asociación con el parásito debe superarse y llegar a un punto en que, tanto parásito como hospedador, se co-adaptan o co-acomodan. La disminución de la mortalidad del hospedero puede ser resultado de adaptaciones recíprocas o unilaterales (Araujo et al., 2015).

1.3.5 Ecological Fitting Y Su Mecanismo. La definición original de ecological fitting la propuso Janzen (1985) y merece la pena centrar atención sobre ella:

Inicialmente, una especie es una población pequeña [y lábil] ocupando un área pequeña. Dicha ocupación restringida se produce por medio del establecimiento y colonización en un área nueva, expuesta o abandonada, o por fragmentación del hábitat, etc. Esta población evolutivamente pasa a través de una sucesión de genotipos. Este cambio ocurre porque el hábitat ocupado cambia y porque la población pequeña está siendo evolutivamente **bien ajustada** (*fine-tuned*) por medio de selección, hacia los rasgos particulares del hábitat que ocupa. Entonces, al cabo de unas pocas generaciones la población se expande abruptamente, sobrepasando su hábitat local. La expansión ocurre porque la población que está evolucionando alberga algún **genotipo** que es accidentalmente **más robusto** con respecto a los cambios que implica la supervivencia en algún área geográfica grande. Esto también puede ocurrir porque alguna barrera geográfica ha sido flexibilizada (u omitida), o porque grandes cambios abióticos convirtieron un hábitat reducido en uno de amplia distribución. Así pues, la especie ahora está ampliamente distribuida.

En virtud de ser ahora una especie con una población grande y muy extendida, en medio de un pico adaptativo, y en una etapa en la que está sujeta a una multitud de presiones selectivas que se presentan a una escala finamente contradictoria y heterogénea, la especie, se vuelve evolutivamente estática [período de quiescencia evolutiva]. Sólo son probables nuevos cambios evolutivos cuando nuevos genotipos aparecen e **incrementan el *fitness*** a lo largo del rango que ocupa la especie. Entonces continúa siendo una especie de amplia distribución hasta que algún tipo de perturbación importante se produce, con la cual se extingue o es reducida a una población pequeña, que es **de nuevo evolutivamente lábil**. Igualmente, durante su etapa de quiescencia y amplia distribución

puede ocurrir que la población de la especie se aisle ocasionalmente, haciendo que esta población fragmentada inicie el ciclo nuevamente. (p. 308)

Teniendo en cuenta esto ¿Qué ocurre cuando una especie rompe su estatus local y coloniza un hábitat nuevo? ¿Es necesario que estas especies hayan cambiado previamente para poder adaptarse a las nuevas condiciones?

En breve, nuestro recién llegado tendrá una distribución irregular, variablemente abundante y tendrá diferentes interacciones con diferentes organismos en varios hábitats (...) **Ningún cambio evolutivo** fue necesario o probable para que nuestra especie incorpore este nuevo hábitat dentro de su rango, así mismo para desarrollar la microdistribución y microexpresión heterogénea que ahora tiene su *fitness*. Por otra parte, no hay ninguna razón para esperar que los residentes establecidos hicieran otra cosa que no sea **ecológicamente reajustarse** a este acto de **ajuste ecológico** [*there is no reason to expect that the established residents did anything other than ecologically readjust to this act of ecological fitting*] Pueden ocurrir todos los niveles imaginables de reajuste a este nuevo hábitat, desde extinguirse hasta no tener respuesta. Casi todas las complejas interacciones en Santa Rosa [un parque nacional de Costa Rica donde Janzen hizo las investigaciones que lo llevaron a estas conclusiones] no son más que consecuencia de una larga sucesión de *ecological fittings* de una especie ampliamente distribuida tras otra. (p. 309)

En definitiva, ecological fitting es un proceso frecuente e inevitable en la naturaleza, resultado de la interacción entre “genotipos robustos o flexibles” (plasticidad fenotípica) que portan los organismos y sus especies al momento de interactuar con una serie de factores bióticos y abióticos (Janzen, 1985). Es

evidente que la dispersión y el rol que desempeñan factores biogeográficos históricos y ecológicos son determinantes en la modelación de los procesos de colonización de nuevos ambientes. La plasticidad fenotípica desempeña un rol clave aquí, porque las especies no precisan estar previamente adaptadas al momento de llegar o de ser sometidas a nuevas condiciones. Sin embargo, nuevas asociaciones pueden generar nuevos genotipos e incrementar la eficacia biológica de las especies (fitness), esto es, que los organismos sean sometidos a nuevos regímenes de divergencia y selección (Agosta et al. 2010).

En este mismo orden de ideas, Agosta y Klemens (2008) definieron teóricamente dos modalidades complementarias de ajuste ecológico, que no son mutuamente excluyentes. Este puede presentarse vía *resource tracking*: colonización de nuevos hábitats y hospederos (en el caso de los parásitos) con condiciones iguales o muy similares al del hábitat u hospedero ancestral. También puede presentarse vía *sloppy fitness*: Colonización de una nueva área o un nuevo hospedero que está fuera del rango del hospedero o ambiente ancestral. A diferencia del *resource tracking*, aquí, los organismos explotan condiciones completamente nuevas. La plasticidad fenotípica implica que los rasgos que posee el organismo son cooptados para nuevas funciones y nuevas relaciones. De este modo, el parásito o la especie bajo estudio, realiza su fitness y se ajusta ecológicamente a las nuevas condiciones (Agosta y Klemens, 2008).

En conclusión, no importa que tan especializada o co-adaptada pueda estar una especie de parásito frente al recurso (hospedero) que explota. La plasticidad fenotípica y el conservatismo filogenético en aquellos rasgos relacionados con el uso de los recursos explican los *host switchings* y la alta variabilidad y diversificación de los parásitos. Las oscilaciones climáticas y los cambios biogeográficos que afectan la dinámica de expansión y aislamiento de las poblaciones de parásitos (vg., cuellos de botella), son determinantes en la predicción y el éxito de estas colonizaciones de nuevos hospederos, así como

en los mecanismos detrás de su diversificación (Brooks y Hoberg, 2007; Hoberg y Brooks, 2008; Agosta et al. 2010; Araujo et al. 2015; Hoberg y Brooks, 2015).

1.4 TIEMPO Y MODO DE EVOLUCIÓN EN LOS TRIPANOSOMAS

La evidencia soporta que los tripanosomas, al ser un grupo monofilético, descendieron todos ellos, de un tripanosoma ancestral de insecto, que posteriormente fue incorporado al ciclo de vida de los vertebrados terrestres (Hoare, 1972; Hamilton et al., 2004). Un escenario plausible indica que los tripanosomas se adaptaron al parasitismo a partir del consumo de bodónidos de vida libre por parte de insectos; la infección y transmisión por medio de sanguijuelas parece ser secundaria a lo largo de su diversificación filogenética (Simpson, 2002; Hamilton et al., 2004). En este sentido, los tripanosomas son un grupo de parásitos diverso y antiguo, pues los insectos (*Hexapoda*) datan sus orígenes hace unos 479 millones de años, en el ordovícico temprano (Misof et al., 2014).

Considerando las asociaciones de los tripanosomas con los hospederos vertebrados e invertebrados en sus relaciones filogenéticas, se ha evidenciado que la coespeciación ha desempeñado un rol muy poco importante en la evolución de este clado. En contraste, la colonización de nuevos hospederos (*host switchings*) mediante ajustes ecológicos (*ecological fittings*) ha sido el motor más importante en la radiación y evolución de los tripanosomas (Hamilton et al., 2007).

Por ejemplo, la hipótesis más aceptada sobre el origen de *T. cruzi* implica que *T. cruzi* se originó en un clado ancestral de murciélagos y después mediante un *host switching* *T. cruzi* colonizó mamíferos terrestres, incluido el hombre (Marcili et al. 2009b; Cavazzana et al., 2010; Lima et al., 2012, 2013; Hamilton et al., 2012). Asimismo, estudios microevolutivos en poblaciones selváticas de *T. cruzi*

dan cuenta del papel del host switching y el ecological fitting en la modelación de la estructura genética del parásito (Messenger et al., 2015).

En los estudios filogenéticos, las consecuencias genéticas que implica el potencial de diversificación de los parásitos puede permitir el abordaje de diversas hipótesis evolutivas, sobre el tiempo y el modo de evolución de los parásitos y la diversificación de linajes (de Meeûs et al., 1998). Sin embargo, estudios de divergencia y datación molecular son escasos entre tripanosomas. Esto constituye una seria dificultad, toda vez que el conocimiento de los tiempos de divergencia (métodos de reloj molecular) de las especies constituye una de las piedras fundamentales sobre las que se edifica la ciencia de la biología evolutiva y ha ayudado a resolver infinidad de problemas biológicos, desde el entendimiento de los mecanismos de dispersión y especiación hasta la caracterización de la riqueza de especies y los patrones de evolución en una diversa gama de patógenos (revisado en Ho y Duchêne, 2014; Yang y Donoghue, 2016).

En una escala poblacional, la teoría de la coalescencia constituye uno de los principales progresos en genética de poblaciones en las últimas décadas (Fu y Li, 1999; Ho y Shapiro, 2011). Los métodos basados en el coalescente (Kingman, 1982) permiten estimar la historia demográfica de una población a partir de información genética, con una gran precisión matemática. De este modo, es posible estimar los tamaños poblacionales pasados y actuales mediante la construcción de una genealogía que va hacia atrás en el tiempo, hasta que los linajes muestreados coalescen en su ancestro común más reciente (*Most Recent Common Ancestor* o MRCA, por sus siglas en inglés) (Grünwald y Goss, 2011). Así pues, los enfoques coalescentes son de extrema importancia, pues en una misma población, pueden determinar la presencia de cuellos de botella y expansiones poblacionales, informar sobre las tasas de migración y de entrecruzamiento; todos estos criterios muy útiles en la evaluación de hipótesis sobre las tasas de diversificación y especiación-extinción y su relación con

eventos paleoclimáticos, hasta el seguimiento y la dinámica de transmisión de virus y otros patógenos (revisado en Ho y Shapiro, 2011; Chang y Shapiro, 2016). Esta tesis es uno de los pocos trabajos que aborda en una escala macroevolutiva la datación de un clado de tripanosomas recientemente descrito y distinto a tripanosomas de importancia médica. Asimismo, al momento de escribir, es el primer trabajo que reconstruye la historia demográfica de una población de parásitos tripanosomas (*T. terrestris*) aislados de hospederos selváticos (*Tapirus terrestris*), que no están relacionados directamente con tripanosomas patógenos. Las discusiones y conclusiones que propongo aquí son de importancia fundamental para el entendimiento de la evolución del clado *Trypanosoma* sensu lato.

1.5 MARCADORES MOLECULARES USADOS EN ESTE ESTUDIO

Un amplio rango de genes han sido empleados para evaluar hipótesis filogenéticas y para hacer estudios taxonómicos en tripanosomas (Hamilton y Stevens, 2010). En ese sentido, a partir de los primeros análisis basados en secuencias de genes ribosómicos (Sogin et al., 1986; Fernandes et al., 1993) se han ido utilizando cada vez una gran variedad de marcadores para la construcción de la historia evolutiva de estos parásitos.

En este trabajo fueron usados tres marcadores nucleares, a saber: La región V7V8 de la subunidad pequeña del rDNA (18S o SSU), el espaciador transcrito interno 1 (*Internal Transcribed Spacer*, ITS1) y el gen glicosomal gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (gGAPDH).

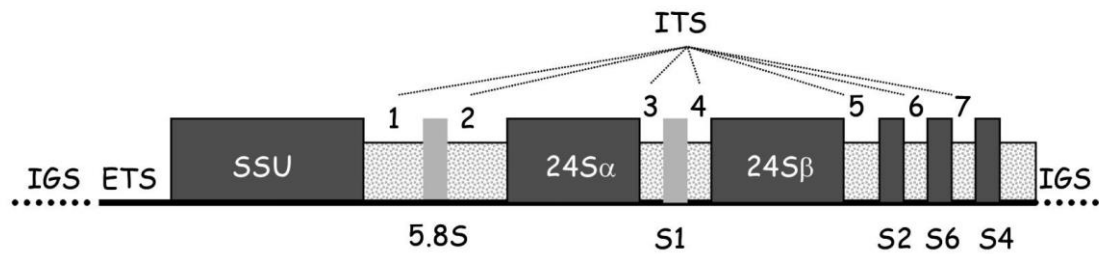
-Gen ribosómico (rDNA). Las secuencias de este gen han sido ampliamente usadas para inferir relaciones filogenéticas entre tripanosomátidos y otros miembros del filo Euglenozoa. Los genes del DNA ribosomal (rDNA) poseen una estructura compleja, con complejos patrones de moléculas maduras de RNA. La estructura del rDNA comprende una unidad de repetición compuesta por

unidades de transcripción (cistrones ribosomales) y espaciadores intergénicos (IGS, por sus siglas en inglés “Intergenic Spacer”) que se repiten en tándem más de 100 veces en el genoma. Estos genes son procesados en una única unidad de transcripción o pre-rRNA, seguido por diversas etapas de procesamiento, originando tres moléculas de RNA maduros: 18S (por sus siglas en inglés, “Small Subunit” o SSU), 5.8S y 24S (por sus siglas en inglés, “Large Subunit” o LSU) (Sogin et al., 1986; Hernández et al., 1990; Dietrich et al., 1993). En los tripanosomátidos, la subunidad 24S se ve flanqueada por un espaciador interno, que su vez origina dos moléculas, 24S β y 24S α .

Las regiones transcritas no conservadas del pre-rRNA corresponden a los espaciadores transcritos internos (ITS) y externos (ETS). La SSU de los genes de rDNA de los tripanosomátidos posee ocho regiones universalmente conservadas (U1-U8) y nueve regiones variables (V1-V9) (Hernandez *et al.*, 1990). De éstas últimas, la región V7V8 es la más variable y es frecuentemente llamada la región *barcoding*, porque es útil en la identificación y discriminación de especies (Hamilton y Stevens, 2010).

La región ITS está compuesta por dos subregiones de DNA no codificante: ITS1 e ITS2, éstas delimitan entre la subunidad pequeña y la subunidad grande del rDNA. ITS1 está localizado entre los genes SSU y 5.8S e ITS2 está entre 5.8S y la subunidad 24S α de la LSU del rDNA. Estos espaciadores ITS1 e ITS2 poseen una rápida tasa evolutiva (son muy variables) y difieren inter e intraespecíficamente. Por esta razón son muy valiosos para el estudio de organismos filogenéticamente próximos y han sido empleados en una amplia variedad de estudios en tripanosomas, por ejemplo en la distinción de genotipos de *T. cruzi* (Mendonça et al., 2002; Cuervo et al., 2002; Santos et al., 2002), y variabilidad inter e intraespecífica de *T. rangeli* (Maia da Silva et al., 2004a) y *T. theileri* (Rodrigues et al., 2006), entre otros.

Figura 2. Diagrama esquemático del gen ribosomal.



Fuente: Marcili (2008)

-Gen gGAPDH (glicosomal gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa). Las especies de la familia de *Trypanosomatidae* presentan un organelo denominado glicosoma que contiene enzimas involucradas en el metabolismo de la glucosa y el glicerol (vía glucolítica). La glucosa es la principal fuente de energía utilizada por los tripanosomas sanguíneos de los mamíferos (Hannaert et al., 1998).

En los tripanosomas se encuentran dos genes que codifican para la enzima glicosómica (gGAPDH) semejante a los eucariotas en general y un gen que codifica una enzima citosólica (cGAPDH) relacionada con los genes bacterianos (Kendall et al., 1990). Las divergencias de las secuencias de estos genes permitieron el diseño de cebadores (primers) para la amplificación específica de gGAPDH (Hamilton et al., 2004). El gen gGAPDH ha mostrado ser un marcador de mucha utilidad para inferir las relaciones en las raíces de la filogenia de los tripanosomas y la evaluación de hipótesis evolutivas, por evolucionar más lento que la SSU del rDNA. También ha sido de utilidad en la descripción de nuevas especies (Hamilton et al., 2004; Hamilton et al., 2007; Hamilton y Stevens, 2010).

2. OBJETIVOS

Esta tesis tiene dos componentes, uno macroevolutivo y otro microevolutivo. Ergo, los objetivos están sujetos a estos.

2.1 OBJETIVO GENERAL

Inferir patrones macroevolutivos y microevolutivos en el clado *Trypanosoma terrestris* a partir del estudio de nuevas cepas aisladas de dantas (*Tapirus terrestris*) procedentes de los biomas brasileños Pantanal y Mata Atlántica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Microevolución

- Estimar la diversidad y el grado de diferenciación genética de los aislados de *T. terrestris* con base en estadísticos poblacionales (estadísticos-F, AMOVAs, matrices de distancias genéticas y redes de haplotipos) y en índices de diversidad genética (número de haplotipos, h ; diversidad haplotípica, dH ; número de sitios polimórficos, S ; y diversidad nucleotídica, π).
- Determinar las posibles barreras al flujo de genes entre las poblaciones de *T. terrestris* con base en la información proporcionada por los estadísticos-F y otros tests poblacionales.
- Inferir la historia demográfica de las poblaciones de *T. terrestris* a partir de métodos multilocus coalescentes.

Macroevolución

- Estimar las relaciones filogenéticas de los aislados de *T. terrestris* con otros miembros del clado *Trypanosoma* a partir de la construcción de una filogenia molecular.
- Estimar la edad del ancestro común más reciente (*tMRCA*) del clado *T. terrestris* y miembros cercanos, con base en métodos bayesianos de reloj molecular.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 AISLAMIENTO Y ORIGEN GEOGRÁFICO DE LOS AISLADOS DE *T. terrestris*

Todos los aislados tripanosomas de este trabajo fueron obtenidos de *Tapirus terrestris* entre los años 2012-2015 por miembros de la *Iniciativa para la Conservación del Tapir de tierras bajas* en Brasil, del *Tapir Specialist Group* (coordinadora, Dr. Patrícia Medici). Las dantas fueron capturadas en los biomas de Mata Atlántica, Cerrado y Pantanal mediante radiotelemetría, a partir de la instalación de collares telemétricos. Información sobre las áreas de captura, especímenes colectados y datos de infección se resumen en la Tabla 3.

Para la colecta y aislamiento de parásitos tripanosomas, se tomaron muestras sanguíneas por venopunción cefálica de las dantas capturadas. Las muestras de sangre fueron inoculadas en tubos vacutainer suplementados con un medio bifásico constituido de una fase sólida (BAB -*Blood Agar Base*- +10% de sangre de carnero desfibrinada); y una fase líquida compuesta de medio LIT (suplementado con glucosa, suero fetal bovino y antibióticos). Los reactivos y los medios de cultivo fueron preparados en el Laboratorio de Enfermedades Parasitarias del Departamento de Medicina Veterinaria Preventiva y Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de São Paulo (en adelante VPS/FMVZ-USP) (Tabla 1).

Los hemocultivos fueron incubados a 28°C y examinados a partir del cuarto día, cada dos días, durante 30 días.

3.2 CRECIMIENTO Y MANUTENCIÓN DE CULTIVOS AXÉNICOS Y EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO

Las muestras positivas fueron transferidas a frascos de cultivo con medio LIT (Camargo, 1964) a 28°C. Una vez en las fases logarítmica y estacionaria, la masa de parásitos fue obtenida por centrifugación (3200 rpm a 22°C por 10 min) y luego criopreservada en N₂ líquido en la Colección Brasileña de Tripanosomátidos del VPS/FMVZ-USP. Los aislados de este estudio fueron enumerados de acuerdo al orden de ingreso de material a la colección, como aparece en la Tabla 3.

Las muestras de DNA genómico fueron extraídas de pellets de aproximadamente 10⁶ parásitos (centrifugados a 5000 y 12000 rpm a 4-5°C por 2-10min), previamente cultivados en medio LIT (suplementado con 10% de SFB y 10% de glucosa) a 28°C. Posteriormente el DNA fue extraído mediante el método de fenol-cloroformo (Sambrook y Russell, 2001). El DNA precipitado fue lavado con etanol al 70%, y el pellet resultante fue secado a 56°C por 15 minutos y resuspendido en TE (10 mM de Tris- HCl, pH 7.4., 1 mM de EDTA pH 8.0).

Por último, las muestras de DNA fueron cuantificadas en espectrofotómetro (Thermo Scientific® NanoDrop 2000/2000c) y diluídas a 100 ng/μl.

Todos los CBTs de este estudio (Tabla 3) son compatibles morfológicamente con *T. terrestris*. Aún así, para fines demostrativos, se hicieron extensiones con algunos CBTs, crecidos y alimentados en medio LIT en las fases logarítmica y estacionaria. Las extensiones fueron fijadas en metanol y teñidas con Giemsa, para microscopía óptica (Figura A1).

Tabla 1 Medios de cultivo

Medio de cultivo	Composición	Cantidad/litro	Preparación / Almacenamiento
LIT Camargo (1964)	Triptosa	5.00 g	Esterilizado en Autoclave
	Infusión de Hígado	5.00 g	
	NaCl	4.00 g	
	KCl	0.40 g	
	Na ₂ HPO ₄	8.00 g	
	Dextrosa	2.00 g	
	Hemina ¹	0.01 g	
	SFB (Suero Fetal Bovino) ²	100 mL	Almacenado a - 20°C
BAB/Sangre	Medio BAB (Blood Agar Base) a 4%	850 mL	Sangre estéril y desfibrinada
	Sangre de carnero	150 mL	Almacenado a 4°C

¹ Hemina disuelta en NaOH 0.1 N; ² SFB, Suero Fetal Bovino inactivo a 56°C por 30 min.

3.3 OBTENCIÓN DE DATOS MOLECULARES

A partir de la extracción de DNA genómico, protocolos estándares de PCR fueron usados para la amplificación de las regiones nucleares deseadas (Tabla 2). Para las reacciones de PCR se empleó la siguiente mezcla: 50 µl con 100 ng de DNA genómico, 100 ng de cada primer, 200 mM de cada dNTP, 5 µl de solución tampón (200 mM Tris- HCl, Ph 8.4, 500 mM KCl y 1.5 mM MgCl₂), 2.5 U de DNA Taq pol y agua bidestilada desionizada estéril. Los ciclos de amplificación y las temperaturas de anillamiento según cada cebador aparecen descritos en la Tabla 2. Posteriormente, los amplicones fueron separados por electroforesis (buffer de carga: 50% de glicerol; 0,4% de azul de bromofenol; 0,4% de xilenocianol) en gel de agarosa/TAE 1x (40 mM de Tris-acetato, 2 mM de EDTA, pH 8.0) al 1,5% y teñidos con SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) y se dejaron correr

aproximadamente 40 min a 100v/50 mA en una cámara de electroforesis submarina. Los amplicones se visualizaron y documentaron en un Transiluminador-UV y en el programa Alphamager-HP 2000 (Protein Simple). Los productos de PCR fueron purificados mediante ExoSAP-It® (Affymetrix) con el objeto de eliminar los posibles inhibidores de la amplificación y el exceso de dNTPs y primers, para la aplicación posterior de la secuenciación del DNA. A cada reacción de ExoSAP-It® se siguieron las instrucciones del fabricante y paso seguido las muestras fueron colocadas en el termociclador a temperaturas de 37°C por 15 min y 80°C durante otros 15 min.

Las muestras purificadas fueron sometidas a reacciones de secuenciamiento con base en el kit BigDye® Terminator v3.1-Cycle sequencing (Thermo Scientific) según las instrucciones del fabricante. Una vez secuenciadas (30 ciclos: 15 s 96°C; 15 s 50°C; 4 min 60°C, con un ciclo inicial de 1 min 96°C), las muestras fueron precipitadas mediante protocolo de precipitación EDTA-Etanol y posteriormente llevadas al secuenciador automático (Applied Biosystems®/Perkin Elmer, model ABI Prism 3500 Genetic Analyzer, Foster City, California) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los cromatogramas fueron checados manualmente en SeqScape® 2.6.0 (Applied Biosystems).

3.4 ALINEAMIENTOS

Las secuencias obtenidas, con los tamaños esperados para cada marcador, fueron sometidas a alineamientos múltiples en los programas ClustalX (Thompson et al., 1997) alterando los parámetros relativos a la inserción de “indels” (peso de inserción=1, Extensión=1) y ajustadas manualmente en el programa GeneDoc v.2.6.01 (Nicholas et al., 1997). Asimismo los alineamientos fueron comparados con diversas secuencias de otros tripanosomátidos disponibles en el banco de datos del GenBank y en el algoritmo BLAST-n para construir alineamientos para análisis filogenéticos. De este modo, tres sets de alineamientos fueron empleados para este estudio: i) un alineamiento

concatenado con las secuencias de gGAPDH y la región v7v8 de la SSU del rDNA para estudios de datación y filogenia ii) tres alineamientos con las secuencias de los tres marcadores por separado (ITS1, gGAPDH y v7v8 SSU rDNA) para estudios poblacionales y demográficos y iii) dos alineamientos con las secuencias de gGAPDH y v7v8 para evaluar e inspeccionar topologías en los estudios filogenéticos.

Tabla 2 Regiones amplificadas y condiciones de amplificación.

Región amplificada y nombre del cebador	Ciclos de amplificación	Tamaño (pb)	Referencia
V7V8 SSU rDNA ¹ 609F (5' CAC CCG CGG TAA TTC CAG C 3') 706R (5' TTG AGG TTA CAG TCT CAG 3')	1 ciclo: 3 min 94 °C 29 ciclos: 1 min 94 °C; 2 min 60 °C; 1 min 72 °C 1 ciclo: 10 min 72 °C	~900pb	Maia da Silva et al., 2004b Rodrigues et al., 2006
ITS 1 rDNA T-ITSF (5' GAT ATT TCT TCA ATA GAG GAA GC 3') 5.8SR (5' GGA AGC CAA GTC ATC CAT C 3')	1 ciclo: 3 min 94°C 29 ciclos: 1 min 94 °C; 1 min 55 °C; 1 min 72 °C 1 ciclo: 10 min 72 °C	~266pb	Souto et al., 1996; Rodrigues et al., 2006; Marcili et al., 2009b
gGAPDH GA Try F (5'CGC GGA TCC ASG GYC TYM TCG GBA MKG AGAT 3') ² GA Try R (5' CGC GGA TCC CBA CVG CYT TSG CSG GRC CAGT 3') ³	1 ciclo: 3 min 94 °C 29 ciclos: 1 min 94 °C; 2 min 60 °C; 1 min 72 °C 1 ciclo: 10 min 72 °C	~700pb	Hannaert et al., 1998; Hamilton et al., 2004

¹ cebadores de secuenciación: 1156F (5' CGT ACT GGT GCG TCA AGA GG 3'); 1156R (5' CCT CTG ACG CAC CAG TAC G 3')

^{2,3} códigos IUPAC/IUB: R= A o G; Y= C o T; M= A o C; S= C o G; K= G o T; V= A, C o G.

3.5 ANÁLISIS EN GENÉTICA DE POBLACIONES

La variación genética en los marcadores fue caracterizada mediante índices de diversidad genética en DNAsp v.5.10.01 (Librado y Rozas, 2009) y se determinó el número de haplotipos, h ; diversidad haplotípica, dH ; número de sitios polimórficos, S ; y diversidad nucleotídica, π . Debido a que sólo fueron empleados datos nucleares diploides, se empleó el software PHASE v2.1 (Stephens et al., 2001) a fin de determinar el número de haplotipos por cada locus (umbral de probabilidad, 0.8). Los datos con la información alélica y haplotípica fueron preparados y visualizados usando SeqPHASE (Flot, 2010). Ya que la región ITS1 es la más polimórfica e informativa para estudios a nivel intraespecífico, se construyeron redes de haplotipos con este marcador en el software popART (Leigh y Bryant, 2015).

El grado de aislamiento y diferenciación genética dentro y entre poblaciones fue estimado con base en los estadísticos-F y en matrices de distancias genéticas en Arlequin v.3.5.2.2 (Excoffier y Lischer, 2010) a partir de los haplotipos de ITS1. Los CBTs fueron subdivididos en dos estrategias de agrupamiento: i) Agrupando los haplotipos por procedencia geográfica, ii) Agrupando los haplotipos según el patrón observado en redes de haplotipos. La significancia estadística fue evaluada en un análisis de varianza molecular (AMOVA) con base en tres réplicas de 20,000 permutaciones aleatorias, en Arlequin. Algunos de los parámetros y funciones poblacionales fueron representados en R v.3.2.5 (R Development Core Team, 2008), a través de R-lequin (Excoffier y Lischer, 2010). Los valores-p fueron corregidos y ajustados en el paquete SGoF, en R (Castro-Conde y de Uña-Álvarez, 2014).

Adicionalmente, para determinar el número clústeres poblacionales genéticamente distintos (K) y asignar qué aislados de nuestros datos corresponden a éstos, se empleó el software de clustering bayesiano STRUCTURE v.2.3.4 (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2003). Este método encuentra el

número más probable de clústeres genéticos (poblaciones K) y asigna probabilísticamente cada aislado (CBT) a su correspondiente población con base en los datos de las frecuencias alélicas para cada locus. Se evaluaron los siguientes modelos: Admixture (flujo de genes) vs. No-admixture (ausencia de flujo de genes); ambos asumiendo que las frecuencias alélicas están correlacionadas. Para cada corrida en STRUCTURE se usó un periodo de burn-in de 5,000 MCMC (Markov Chain Monte Carlo) generaciones, seguidas de 100,000 generaciones para $K= 1$ a 8, con 10 réplicas para cada K . Los resultados de STRUCTURE fueron analizados en el programa STRUCTURE HARVESTER (Earl y vonHoldt, 2012) y se determinó el número más probable de poblaciones K , a través del método de Evanno et al. (2005). Los resultados de cada réplica fueron combinados usando el software CLUMPP (Jacobson y Rosenberg, 2007) y visualizados en DISTRUCT v.1.1 (Rosenberg, 2004).

3.6 TEST DE AISLAMIENTO

Cada vez un mayor número de estudios poblacionales ha demostrado el papel que el flujo de genes desempeña en los procesos de especiación y divergencia (Zarza et al., 2016). Históricamente ha habido dos enfoques para estudiar las tasas de migración entre especies e individuos, ya sea a través de métodos directos que emplean observaciones directas obtenidas de radiotelemetría, o mediante métodos indirectos, con base en datos genéticos (vg., estadísticos-F y métodos basados en coalescencia y estadística bayesiana) (Beerli, 1998). Ya que las poblaciones de parásitos ven modelada su estructura genética por causa de varios factores distintos a aquellos observados en organismos de vida libre, en este trabajo hago uso de ambos enfoques. Mediante los datos de captura-recaptura obtenidos en campo observo el rol que el hospedero desempeña en la dispersión y transmisión de las cepas de parásitos y haplotipos estudiados. A partir de los datos moleculares observo la asociación entre haplotipos según su procedencia geográfica y la posible existencia de barreras geográficas y/o

genéticas que informen sobre un posible aislamiento de las poblaciones bajo estudio.

Para obtener una asunción realista de las posibles barreras genéticas en el paisaje, fue empleado el software BARRIER v.2.2 (Manni et al., 2004). Este software implementa el algoritmo de máxima diferencia de Monmonier (Monmonier, 1973) sobre una matriz de distancias genéticas en una red geométrica con el objeto de identificar límites y diferencias entre las distancias pareadas de haplotipos en una población de individuos. La significancia estadística (robustez de la barrera) fue evaluada mediante el *bootstrapping* de las distancias genéticas de los haplotipos de ITS1, generando un archivo de 100 matrices aleatorizadas con las distancias genéticas K2-P en el paquete PHYLIP (Felsenstein, 1989), usando DNADIST y SEQBOOT.

3.7 FILOGENIA MOLECULAR Y ESTIMACIÓN DE TIEMPOS DE DIVERGENCIA

La estimación de los tiempos de divergencia y las topologías de los árboles fueron calculadas en el paquete bayesiano BEAST v.2.2.1 (Bouckaert et al., 2014) y fueron empleados los alineamientos con los genes concatenados de gGAPDH y V7V8 de la SSU rDNA. Los modelos de evolución de DNA para cada marcador y cada análisis fueron inferidos simultáneamente con el análisis filogenético en BEAST, mediante bModelTest (Bouckaert, 2015).

Para estimar la edad del ancestro común más reciente (tMRCA) del clado *T. terrestris*, se emplearon dos estrategias de calibración. Un punto de calibración a 479 millones de años [distribución Normal, σ 15.4 ma] en la raíz de la filogenia de los tripanosomas con base en el origen de los insectos, según estudios filogenómicos (Misof et al., 2014) y asumiendo la hipótesis del insecto como la más aceptada para el origen de los tripanosomas (Hamilton et al., 2004); y un segundo punto de calibración a 60 millones de años [distribución Normal, σ 2.0 ma] fue designado para el clado *T. terrestris* con base en el origen de los

Perissodactyla (Rose et al., 2014). Debido a que la elección de *priors* y modelos no es tarea sencilla en el análisis filogenético bayesiano, varias corridas exploratorias de 10-20, 000,000 MCMC generaciones fueron realizadas asumiendo varios modelos evolutivos. La hipótesis del reloj molecular global (*strict clock*) fue rechazada (el 95% HPD para el coeficiente de variación incluyó valores cercanos a uno en todos los análisis relajados). Un modelo de reloj molecular relajado con distribución exponencial (*uncorrelated relaxed exponential clock*) y un modelo de especiación de Yule (*Yule tree prior*) fueron designados como los más apropiados en el análisis final. Dos corridas independientes, cada una de 70, 000,000 MCMC generaciones fueron realizadas, muestreando cada 7,000 pasos. La convergencia de la cadena fue inspeccionada en Tracer v.1.6 (Rambaut et al., 2014) y los análisis fueron combinados en LogCombiner v.2.2.1 (Bouckaert et al., 2014) eliminando las primeras 7, 000,000 de generaciones como burn-in. Los resultados fueron resumidos en un árbol de máxima credibilidad (*maximum clade credibility tree*) en TreeAnnotator v.2.2.1 (Bouckaert et al., 2014) y visualizado y editado en FigTree v.1.4.2 (Rambaut, 2014).

Adicionalmente, para corroborar la consistencia del método concatenado vs árbol de especies/árbol de genes y resolver la topología relacionada con la monofilia del clado *T. terrestris*, análisis independientes fueron implementados en *BEAST (Heled y Drummond, 2010). Árboles de genes y árboles de especies fueron construidos bajo diferentes condiciones, asumiendo ligamiento y desligamiento en ambos loci bajo estudio; de igual modo, con y sin nodos de calibración, sin forzar la monofilia de ninguno de los clados. Todos los análisis fueron consistentes y corroboraron la monofilia del clado *T. terrestris* y la topología del árbol consenso.

3.8 RECONSTRUCCIÓN DEMOGRÁFICA

Para inferir señales genéticas de expansión o contracción poblacional, fueron implementados métodos multilocus coalescentes; particularmente, fue construido un Diagrama de Horizonte Bayesiano Extendido (en adelante EBSP, *EXTENDED BAYESIAN SKYLINE PLOT*, por sus siglas en inglés) (Heled y Drummond, 2008). Este método permite la construcción de gráficos del tamaño efectivo poblacional a través del tiempo, proporcionando una referencia temporal de los eventos demográficos como cuellos de botella o expansiones poblacionales. Los EBSPs incorporan de manera directa datos multilocus e independientes y estiman el número de intervalos y grupos coalescentes en los cambios en el tamaño efectivo de las poblaciones, lo que permite reducir considerablemente el error y por tanto la incertidumbre en el 95% en los rangos de intervalos de confianza en un factor de $\sqrt{2}$ (Heled y Drummond, 2008), todas estas, ventajas sobre las construcciones demográficas basadas en BSPs (*BAYESIAN SKYLINE PLOTS*), que incluyen información con un solo locus (Drummond et al., 2005; Heled y Drummond, 2008). De ahí que con los tres marcadores nucleares en este estudio, se tenga una fuente confiable en la estimación de las tendencias demográficas de los aislados de *T. terrestris*.

Los EBSPs fueron calibrados configurando el prior correspondiente a las tasas de mutación con base en análisis independientes para cada marcador (Tabla A2), calibrando el nodo *T. terrestris* según el origen de *Tapirus terrestris* aproximadamente hace 3 millones de años, con base en anteriores estudios moleculares para el hospedero (Steiner y Ryder, 2011). Debido a que la hipótesis de reloj molecular estricto puede ser adecuada para la evolución a nivel intraespecífico (Yang, 2006 citado por Fujita et al., 2010), en este análisis fue designado el reloj molecular estricto para simplificar el modelo coalescente y ayudar el análisis a converger, también, por esta misma razón fue empleado un nodo de calibración ~3ma basado en los datos del hospedero de donde se aislaron todas las cepas de *T. terrestris* aquí empleadas.

Dos análisis replicados de 150, 000,000 MCMC generaciones fueron realizados, muestreando cada 5,000 pasos en BEAST v.2.2.1. La convergencia de la cadena de Markov Monte Carlo fue inspeccionada en Tracer v.1.6 y los análisis fueron combinados en LogCombiner v.2.2.1 asumiendo el primer 10% como burn-in. El output de BEAST fue directamente analizado y graficado en R v3.2.5 (R Development Core Team, 2008) con las funciones demográficas y un script facilitado por los autores.

Para validar el EBSF, los marcadores fueron sometidos a pruebas de neutralidad (D de Tajima y F^* de Fu y Li) en DNAsp y los CBTs 94, 97 y 98 fueron retirados y se repitió el análisis, a fin de observar que las tendencias demográficas generales no estuvieran influidas por estructura genética o procesos de selección (Heller et al., 2013). Por último, la función *Sample From Prior* (en ausencia de los datos de secuencia y de calibración) fue empleada para examinar si los priors y demás parámetros poblacionales usados en el análisis influyeron sobre la distribución de los datos.

Tabla 3 Aislados de *T. terrestris* obtenidos y empleados en este estudio con la información de los datos telemétricos del hospedero y la procedencia geográfica.

Datos del hospedero (<i>Tapirus terrestris</i>)				<i>T. terrestris</i>				
ID/Nombre (captura/recaptura)	Fecha de captura	Sexo/Edad	Infectividad	CBT	Localidad geográfica/Bioma		Coordenadas Latitud/Longitud	
32 Paulinho	24.09.2012	♂/Juvenil	Positivo	94	Nhecolândia	P	-19.26476	-55.7590207
15 Morena	20.09.2012	♀/Subadulto	Positivo	97	Nhecolândia	P	-19.317085	-55.7535439
31 Jordano	20.09.2012	♂/Subadulto	Positivo	98	Nhecolândia	P	-19.299746	-55.8188741
31 Jordano	27.10.2014	♂/Subadulto	Negativo					
08 Benjamin Martlet	18.11.2012	♂/Adulto	Positivo	101	Nhecolândia	P	-19.309075	-55.7542613
20 Sy	15.07.2014	♀/Adulto	Negativo					
34 Carijó	21.11.2012	♂/Subadulto	Positivo	102	Nhecolândia	P	-19.262074	-55.8020845
28 Duda	15.11.2012	♀/Adulto	Positivo	103	Nhecolândia	P	-19.308302	-55.7628135
28 Duda	20.08.2014	♀/Adulto	Negativo					
33 Gabriela	21.11.2012	♀/Juvenil	Positivo	104	Nhecolândia	P	-19.309905	-55.8095123
35 Guilherme	08.12.2012	♂/Adulto	Positivo	109	Nhecolândia	P	-19.308506	-55.8125679
21 Caio	25.05.2013	♂/Subadulto	Positivo	133	Nhecolândia	P	-19.301669	-55.7640435
29 Karin Schwartz	29.05.2013	♀/Adulto	Positivo	134	Nhecolândia	P	-19.308506	-55.8125679
37 Justine	30.05.2013	♀/Subadulto	Positivo	135	Nhecolândia	P	-19.317085	-55.7535439
38 Cassandra	21.07.2013	♀/Adulto	Positivo	140	Nhecolândia	P	-19.297808	-55.8210674
39 Manfredo	25.07.2013	♂/Subadulto	Positivo	141	Nhecolândia	P	-19.297808	-55.8210674

Datos del hospedero (<i>Tapirus terrestris</i>)				<i>T. terrestris</i>				
ID/Nombre (captura/recaptura)	Fecha de captura	Sexo/Edad	Infectividad	CBT	Localidad geográfica/Bioma		Coordenadas Latitud/Longitud	
15 Morena	28.07.2013	♀/Subadulto	Positivo	142	Nhecolândia	P	-19.317085	-55.7535439
16 Dora	28.07.2013	♀/Adulto	Positivo	143	Nhecolândia	P	-19.303632	-55.7524182
19 Sérgio	20.10.2013	♂/Adulto	Positivo	164	Nhecolândia	P	-19.282518	-55.7567555
30 Nelsão Chester	20.10.2013	♂/Adulto	Positivo	165	Nhecolândia	P	-19.303632	-55.7524182
41 Tinoco	18.12.2013	♂/Subadulto	Positivo	167	Nhecolândia	P	-19.319946	-55.7703877
43 Jujuba	05.05.2014	♀/Juvenil	Negativo					
42 Renatinha	04.05.2014	♀/Juvenil	Positivo	180	Nhecolândia	P	-19.279424	-55.7938988
38 Cassandra	07.05.2014	♀/Adulto	Positivo	181	Nhecolândia	P	-19.297808	-55.8210674
29 Karin Schwartz	12.07.2014	♀/Adulto	Positivo	188	Nhecolândia	P	-19.297808	-55.8210674
36 Michele	03.07.2014	♀/Subadulto	Positivo	189	Nhecolândia	P	-19.301669	-55.7640435
33 Gabriela	06.07.2014	♀/Subadulto	Positivo	190	Nhecolândia	P	-19.297808	-55.8210674
44 Gabrielzinho	13.07.2014	♂/Juvenil	Positivo	191	Nhecolândia	P	-19.299746	-55.8188741
34 Carijó	06.07.2014	♂/Adulto	Positivo	192	Nhecolândia	P	-19.265268	-55.8081984
38 Cassandra	18.10.2014	♀/Adulto	Positivo	198	Nhecolândia	P	-19.308506	-55.8125679
23 Rick Barongi	21.10.2014	♂/Adulto	Positivo	199	Nhecolândia	P	-19.281909	-55.7913114
45 Dona Jô	22.10.2014	♀/Adulto	Positivo	200	Nhecolândia	P	-19.308506	-55.8125679
Raféra	20.12.2015	♂/Subadulto	Negativo		Nova Alvorada	C	-21.613892	-53.8908584
Juscelino	20.12.2015	♂/Adulto	Negativo		Casa verde	C	-21.617315	-53.8927992

Datos del hospedero (<i>Tapirus terrestris</i>)				<i>T. terrestris</i>			
ID/Nombre (captura/recaptura)	Fecha de captura	Sexo/Edad	Infectividad	CBT	Localidad geográfica/Bioma		Coordenadas Latitud/Longitud
				46	Linhares	MA	-19.083333 -39.96667
				60	Pinheiros	MA	-18.3425 -40.1466675
				61	Marechal Flor.	MA	-20.412778 -40.683056

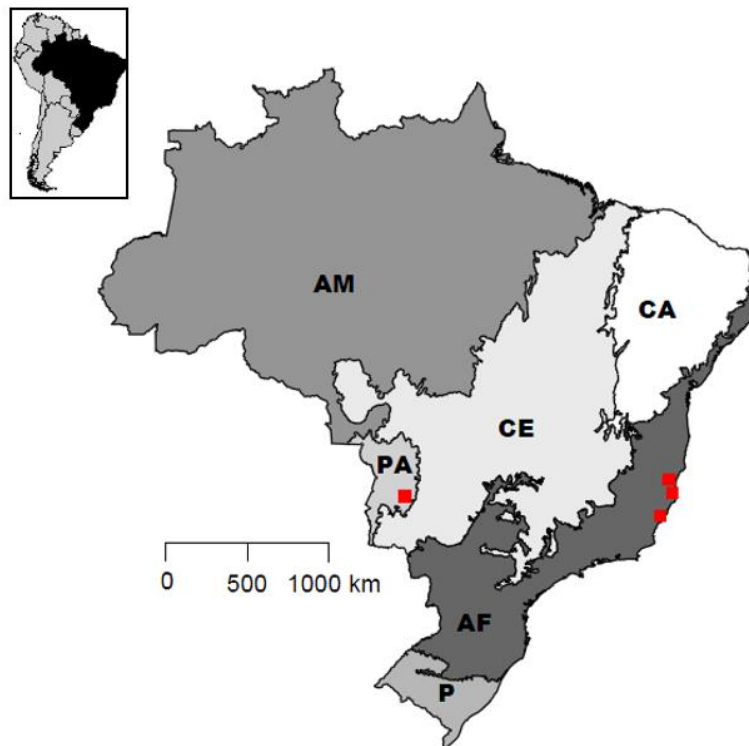
Los especímenes sombreados de la primera columna de izquierda a derecha corresponden a datos de captura/recaptura y tienen su respectivo aislado asociado. CBT: Colección Brasileña de Tripanosomátidos, P: Pantanal, C: Cerrado, MA: Mata Atlántica.

4. RESULTADOS

4.1 DIVERSIDAD, ESTRUCTURA GENÉTICA Y TEST DE AISLAMIENTO

En este estudio se emplearon 31 aislados de *Trypanosoma terrestris*. De 34 tapires capturados y monitoreados por radiotelemetría, 28 hemocultivos resultaron positivos para tripanosomas y los restantes aislados (CBTs 46, 60 y 61) corresponden a la descripción original de *T. terrestris* del bioma Mata Atlántica. Durante el periodo de muestreo sólo 6 hemocultivos fueron negativos; a saber, 4 del bioma Pantanal y las 2 únicas muestras procedentes del bioma Cerrado (Tabla 3, Figura 3).

Figura 3. Aislados positivos de *T. terrestris* (■) de acuerdo al bioma de procedencia. AM: Amazonía, CE: Cerrado, PA: Pantanal, AF: Mata Atlántica, P: Pampa, CA: Caatinga.



Fuente: autor

El marcador más altamente polimórfico y con mayor diversidad entre los aislados obtenidos fue ITS1 y por tanto fue el más informativo para hacer estudios poblacionales (Tabla 4).

Tabla 4 Estadísticos resumen para índices de diversidad genética y pruebas de neutralidad.

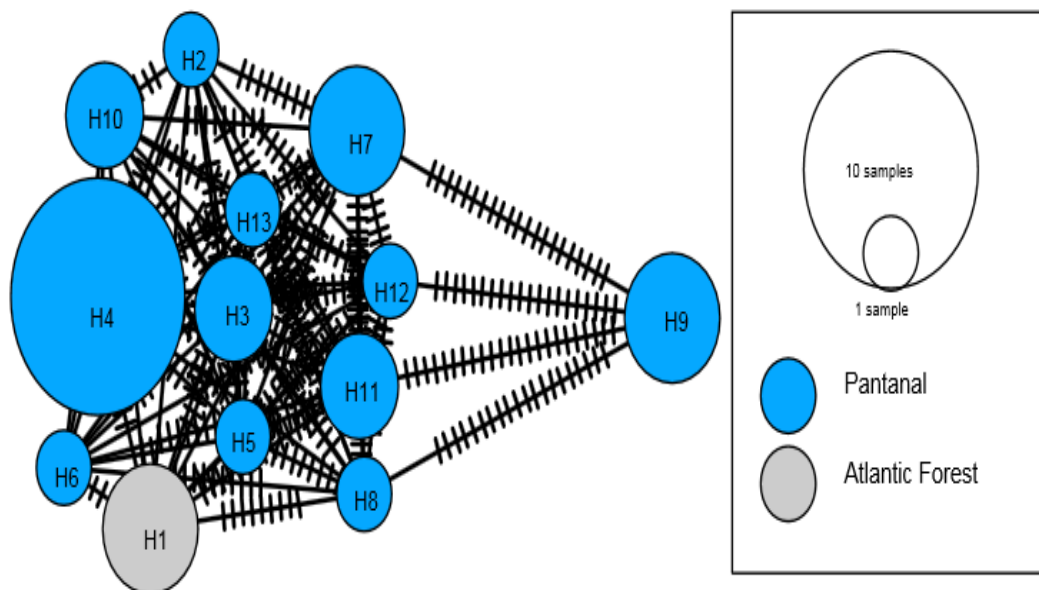
Índices de diversidad						Prueba de neutralidad	
ITS1 (266pb)							
	n	S	h	dH	π	Fu and Li's F*	Tajima's D
Pantanal+ Mata Atlántica	31	32	13	0.877	0.0348	1.265 (P>0.10)	0.00199 (p>0.1)
gGAPDH (695 pb)							
	n	S	h	dH	Π	Fu and Li's F*	Tajima's D
Pantanal+ Mata Atlántica	31	4	5	0.570	0.0009	-1.111(P >0.1)	-0.894(p>0.1)
V7V8 SSU rDNA (728 pb)							
	n	S	h	dH	π	Fu and Li's F*	Tajima's D
Pantanal+ Mata Atlántica	31	5	3	0.529	0.0010	-2.32896(P>0.1)	-1.08769(p>0.1)

En la tabla aparece el tamaño obtenido para cada fragmento de DNA amplificado (pares de bases, pb). S: Número de sitios polimórficos, h: número de haplotipos, n: número de secuencias, dH: diversidad de haplotipos, π : diversidad nucleotídica. El nivel de significancia α para las pruebas de neutralidad equivale a 0.05.

De los haplotipos de ITS1, 12 haplotipos correspondieron a los aislados de Pantanal, y sólo uno fue identificado para Mata Atlántica (CBTs 46, 60, 61) y es altamente homogéneo comparado con los demás aislados. Por esta razón, los análisis de diversidad genética fueron realizados con la información de los aislados de ambos biomas (Tablas 3,5; Tabla A1).

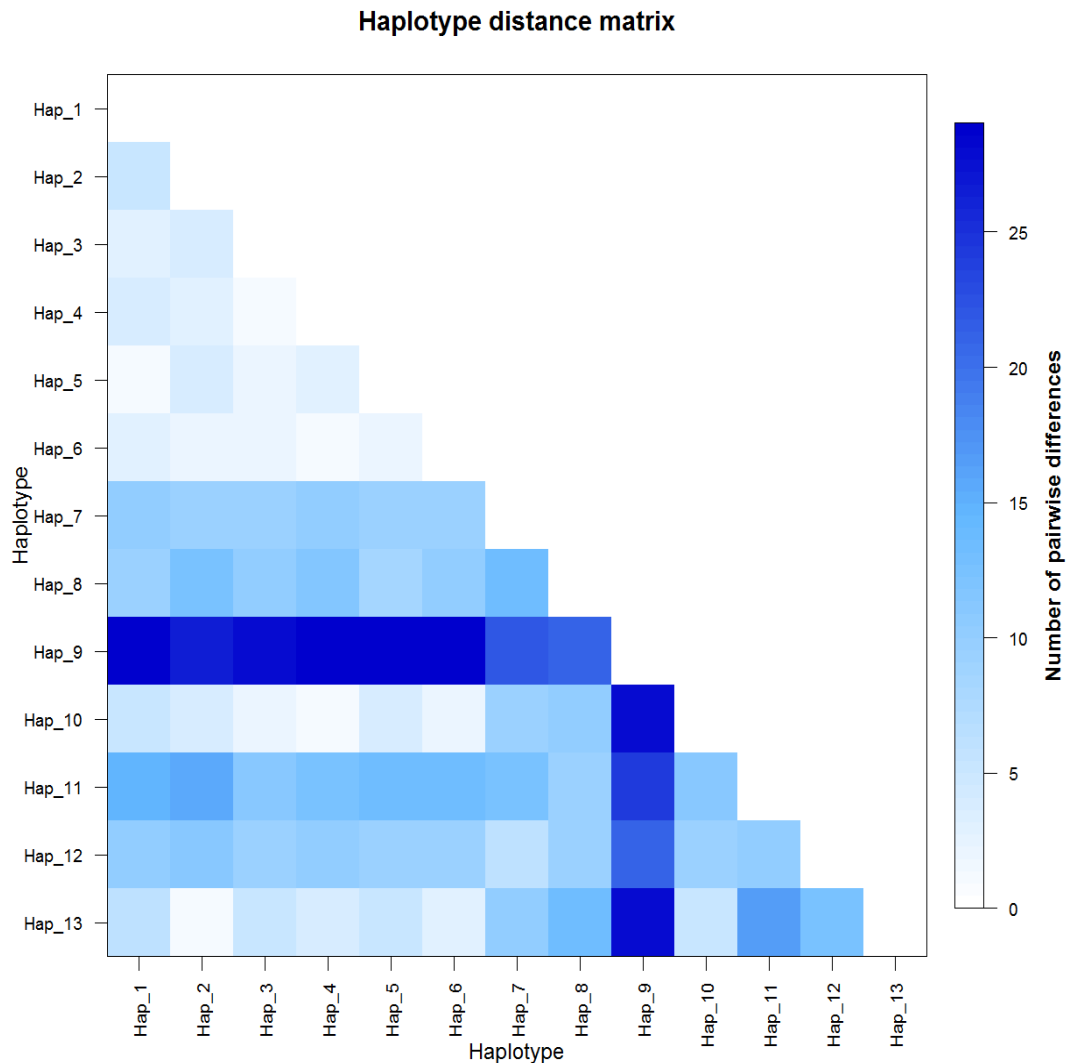
La red de haplotipos y las matrices de distancias genéticas no mostraron un patrón predecible de estructura genética con respecto al bioma de origen de los CBTs. Todos los haplotipos fueron agrupados en un solo haplogrupo excepto por el haplotipo 9 (**H9**, CBTs 94, 97 y 98), que está fuertemente diferenciado de los demás (Figuras 4,5).

Figura 4. Red de haplotipos de ITS1 construida mediante el método MSN (Minimum-spanning Network) implementado en el software popART. El tamaño de los círculos corresponde a la frecuencia de los CBTs por haplotipo y las líneas verticales que conectan la red representan el número de mutaciones.



Fuente: autor

Figura 5. Número de diferencias moleculares entre haplotipos de ITS1, obtenida del número promedio de diferencias pareadas de Nei, en Arlequin.



Fuente: autor

El análisis de clustering bayesiano en STRUCTURE mostró que globalmente los aislados obtenidos de Pantanal y Mata Atlántica carecen de variabilidad genética suficiente para ser asignados a un clúster genético determinado. Así pues, aunque el número más probable de poblaciones K sería 4, no hay suficiente variabilidad genética, porque por lo menos el 25% de los genotipos de los

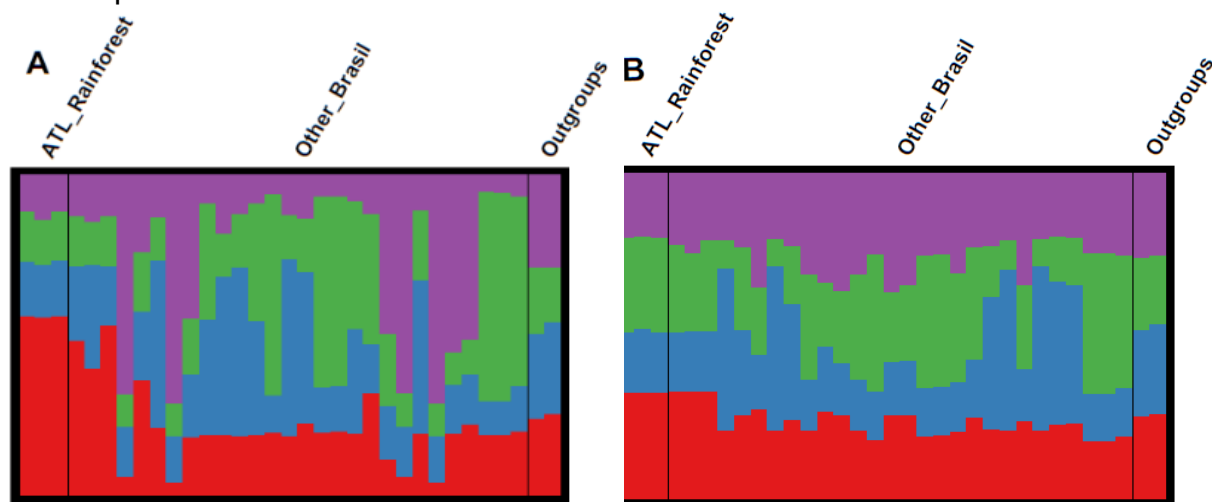
aislados sigue perteneciendo a cada uno de éstos grupos (por ejemplo, un color) (Figura 6). A la luz de la homogeneidad presente entre los aislados, el programa no pudo asignar a qué poblaciones o clústeres pertenece cada uno de éstos. El mismo patrón fue observado en ambos modelos estudiados (admixture vs no-admixture); incluso, dadas las condiciones del análisis poblacional, incorporando aislados parasitarios de otra especie de tripanosoma aislada de rinocerontes malayos (*Dicerorhinus sumatrensis*, *Perissodactyla: Rhinocerotidae*), no fue posible asignar los individuos a ninguno de los cuatro clústeres genéticos (Figura 6).

De manera similar a lo anterior, los resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA) no mostraron diferencias significativas entre los tripanosomas de ambos biomas estudiados ($F_{ST}= 0.171$, $p>0.049$). Del porcentaje de variación total, la mayor parte de la variación es debida a diferencias dentro de poblaciones (aislados por bioma) y no entre poblaciones (entre biomas). Esto indica por lo menos que los aislados parasitarios procedentes del bioma de Pantanal estarían explicando una buena parte de la variación total. En ese sentido, al agrupar todos los aislados en una población y al separarlos con respecto del H9 (CBTs 94, 97 y 98), se observa que éstos poseen un extraordinariamente alto grado de estructura genética y están efectivamente aislados de las demás cepas procedentes de los biomas Pantanal y Mata Atlántica ($F_{ST}= 0.808$, $p<0.0001$). Los resultados siguieron siendo significativos después de ajustar los valores p (Tabla A3).

Así con esto, a pesar de la homogeneidad y poca variabilidad genética observada entre parásitos y cepas parasitarias procedentes de biomas distintos, por lo menos hay un haplotipo del Pantanal de Nhecolândia que está fuertemente aislado y diferenciado de los demás (H9) (Tabla A3, Figura 7). Esto no deja de ser interesante, pues a pesar de que no hay diferencias entre dos biomas distintos, hay fuerte estructura genética en una escala espacial fina, es decir, en una misma localidad geográfica, cuyo rango muestreado no excede los 14Kms.

Asimismo, el test de *Barrier* implementado en el software BARRIER evidencia la presencia de una fuerte barrera genética que corresponde a los aislados del H9 (Figura 7). Las matrices de las distancias genéticas aleatorizadas muestran fuertes valores de *bootstrap* para la barrera (Figura 7). Sin embargo, esta barrera genética no se corresponde con una barrera geográfica que pueda estar ocasionando divergencia alopátrica en escalas espaciales finas entre los aislados, debido a las características de paisaje del Pantanal de Nhecolândia. Tampoco corresponde con el hospedero, ya que el H9 fue aislado de tres diferentes especímenes tapires durante los períodos de captura y al mismo tiempo estos tapires albergan otras cepas de parásitos (Tabla 3). De otro lado, los datos telemétricos muestran que los tapires se movilizan a lo largo de toda la zona muestreada (Tabla 3).

Figura 6. Resultados del análisis de clustering bayesiano en STRUCTURE. A) Modelo Admixture, B) Modelo no-Admixture. Los colores vendrían a representar el número más probable de clústeres genéticos ($K=4$); los aislados parasitarios (CBTs) no pudieron asignarse a ninguno de los clústeres por las razones explicadas arriba. Los outgroups corresponden a los aislados parasitarios de rinocerontes de Malasia y fueron definidos como grupos externos por ser un análisis poblacional.



Fuente: autor

propuesto, con altos valores de divergencia (probabilidad posterior de 1.0) comparados con las demás especies y miembros representativos de los tripanosomas (Figura 8). A pesar de la monofilia de los nuevos miembros representativos del clado *T. terrestris* y aunque los aislados trataron de agrupar en varios subclados, hay poco soporte para los valores de probabilidad posterior en los nodos más externos del clado, como se muestra en la Figura 8. Esto indica por lo menos que no hay suficiente variación en nuestras cepas como para ser separadas en varios linajes. Esta topología de nuestro grupo interno (*ingroup*) es consistente con los resultados del análisis de clustering bayesiano.

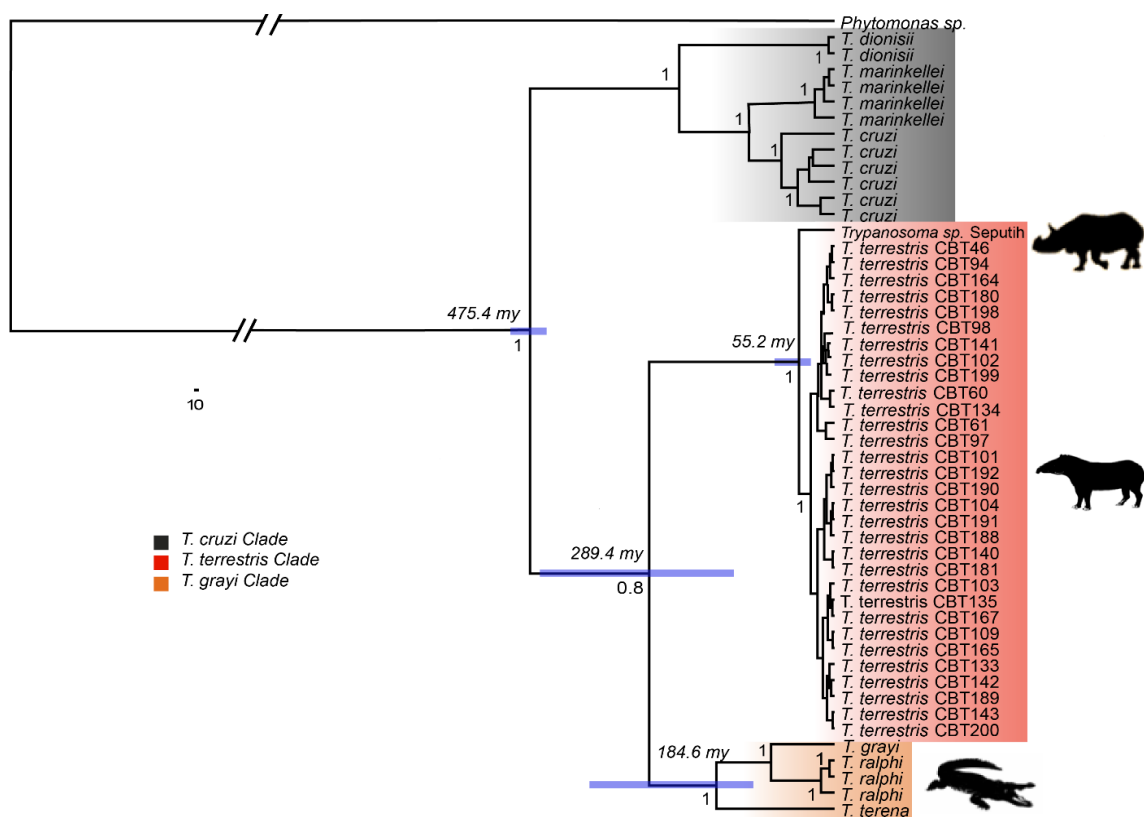
Basado en la búsqueda en el algoritmo Blast-n, en esta filogenia se incluyeron aislados de otros hospederos *Perissodactyla*. Interesantemente, el aislado de una especie de tripanosoma recientemente descrita y aislada de rinocerontes de Malasia (*Dicerorhinus sumatrensis*) cayó en la parte basal del clado *T. terrestris* (Figura 8). Esto quiere decir que dada la topología del árbol consenso, esta especie de tripanosoma de rinoceronte de Asia hace parte del clado *T. terrestris* y divergió primero que los aislados procedentes de tapires sudamericanos. También muestra que la historia evolutiva del clado *T. terrestris* no sólo estaría restringida a miembros de la familia *Tapiridae* (vg. *Tapirus terrestris*) sino a los representantes del orden *Perissodactyla*.

De otro lado, los tripanosomas de cocodrilos y caimanes de África y Sudamérica que conforman el clado *T. grayi* son filogenéticamente muy próximos a los tripanosomas que constituyen el clado *T. terrestris*, procedente este último de mamíferos *Perissodactyla*. Así pues, esta topología indica que los clados *T. grayi*/*T. terrestris* son clados hermanos (Figura 8).

La topología aquí descrita corresponde al árbol consenso. El análisis en *BEAST arrojó valores consistentes con las topologías y la monofilia del clado *T. terrestris*. El árbol de especies es equivalente al árbol concatenado y los árboles de genes

soportaron de igual modo fuertemente la monofilia de los aislados de *T. terrestris*, así como la proximidad filogenética de los clados *T. grayi*/*T. terrestris* (Figura A2).

Figura 8. Árbol bayesiano consenso (*maximum clade credibility tree*) mostrando las relaciones filogenéticas y los tiempos de divergencia (tMRCA) de los tripanosomas estudiados. La probabilidad posterior para cada nodo se indica en valores de 0 a 1 y los tiempos de divergencia están en millones de años. Las barras azules horizontales representan el 95% de los intervalos de credibilidad posterior (HPD) para los estimados de divergencia.



Fuente: autor

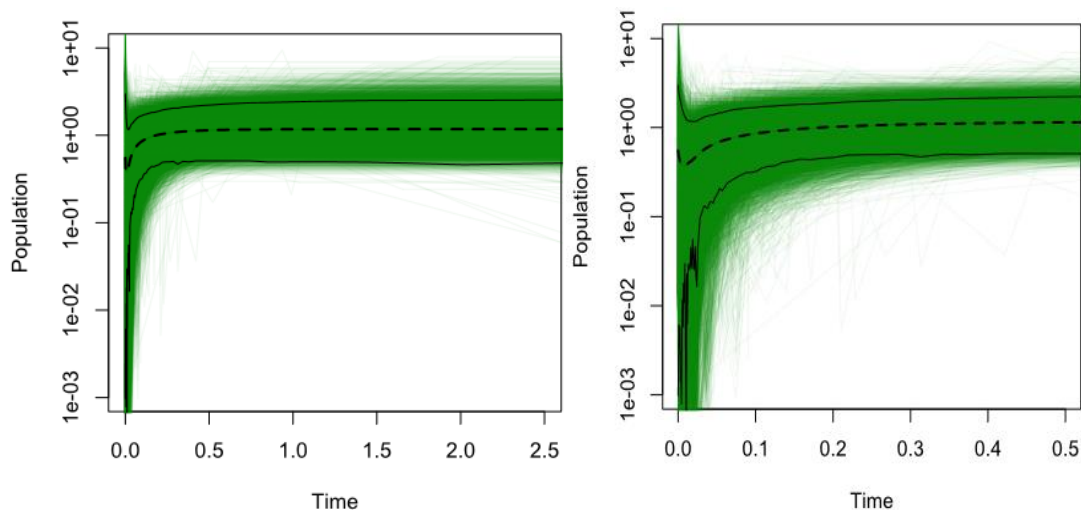
De acuerdo a la estimación de los tiempos de divergencia, el clado *T. terrestris* divergió alrededor de hace 55my (95% HPD –*Highest Posterior Density*–: 58.99my ± 51.19my) durante el Eoceno temprano. Asimismo su clado hermano, el clado *T. grayi* divergió ~184my (95% HPD: 330.47my ± 74.46my) durante la transición del periodo Jurásico temprano-medio en el Mesozoico. Ambos clados

T.grayi/*T.terrestris* comparten su ancestro común más reciente hacia el Pérmico, hace unos 289my bp (95% HPD: 453.19my $\pm$ 150.53my) (Figura 8).

4.3 HISTORIA DEMOGRÁFICA

Los Diagramas de Horizonte Bayesiano Extendidos (EBSPs) mostraron que los aislados de *T. terrestris* experimentaron una marcada reducción en sus tamaños poblacionales (cuello de botella) hace aproximadamente unos 100mil años antes del presente, durante el último período glacial en el Pleistoceno tardío. Desde este declive poblacional, no se observó una señal genética contundente de recuperación o expansión poblacional (Figura 9).

Figura 9. Diagramas de horizonte bayesiano extendidos (EBSPs) con la distribución total de la probabilidad posterior de las tendencias demográficas de los aislados de *T. terrestris* empleados en este estudio. La figura de la derecha es la ampliación de la primera, a una escala de 500ky. Las líneas punteadas representan el tamaño poblacional de las muestras y las líneas continuas los intervalos de credibilidad posterior (95% HPD). El eje y está en escala logarítmica y el eje x en millones de años antes del presente.

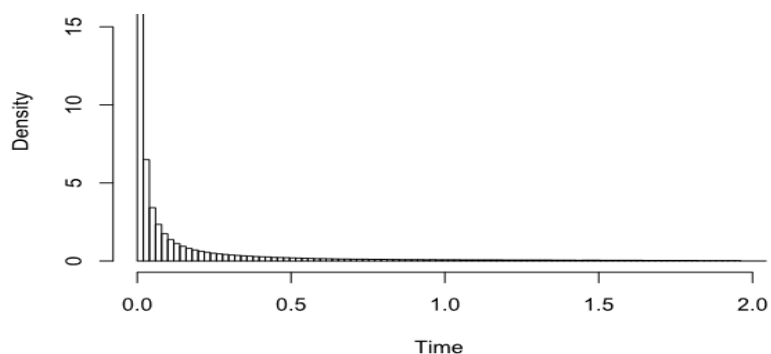


Fuente: autor

De otra parte, aunque el histograma de eventos coalescentes es consistente con la fuerte señal genética de reducción poblacional observada durante el pleistoceno, no fue posible recuperar tendencias demográficas más allá de 500mil años antes del presente (500ky-1my), como se observa en la Figura 10. A pesar de que con los tres loci empleados trate de recuperarse información anterior a este punto temporal, la señal genética sigue siendo bastante débil (Figura 10). Por esta razón, más allá de 500ky el programa asume un tamaño poblacional constante.

Finalmente, la función 'sampling from prior' en ausencia de datos de secuencia mostró que las tendencias demográficas no estuvieron influidas por los priors (tamaño poblacional constante en todos los puntos temporales). Cuando se repitió el análisis en ausencia de información temporal (tasas mutacionales medidas en tiempo), se observó el mismo declive poblacional (Figura A4), aunque este sea levemente más patente que incorporando información temporal. Asimismo, las pruebas de neutralidad D de Tajima y F^* de Fu y Li indicaron una variación neutral en los tres loci ($P > 0.10$, Tabla 4) y al retirar los CBTs 94-97-98 las tendencias demográficas permanecieron igual, por lo que los EBSPs no estuvieron influidos ni por procesos de selección ni por estructura genética (Figura A3).

Figura 10. Histograma de eventos coalescentes presentes en la reconstrucción demográfica de los aislados de *T. terrestris*.



Fuente: autor

5. DISCUSIÓN

5.1 'HOST-SWITCHING I': NUEVOS REPORTES Y RELACIONES EVOLUTIVAS EN EL CLADO *T. terrestris*

Desde la descripción inicial de *T. terrestris* (Acosta et al., 2013), a partir del análisis de las secuencias completas de los genes gGAPDH y SSU rDNA tan sólo tres aislados tripanosomas (CBTs 46-60-61) procedentes de *Tapirus terrestris* del bioma Mata Atlántica soportaron fuertemente la monofilia y la existencia de un nuevo clado con altos valores de divergencia, comparados con los demás clados de tripanosomas reportados hasta entonces (Acosta et al., 2013). Esta es la primera vez, que se añaden nuevos miembros representativos para el clado. Así pues, este estudio reconfirma la propuesta del clado *T. terrestris* como un clado monofilético e independiente del resto de los tripanosomas, con su propia historia evolutiva.

Las relaciones filogenéticas del árbol bayesiano consenso (Figura 8) y de los árboles de genes (Figura A2) confirman que los tripanosomas aislados de *Tapirus terrestris* están estrechamente vinculados con la historia evolutiva de sus hospederos *Perissodactyla*. A pesar de la amplia distancia geográfica entre Sudamérica y el sudeste Asiático, un nuevo aislado de tripanosoma de rinocerontes de Malasia, recientemente descrito (*Trypanosoma* sp. Seputih), cayó en la parte basal del clado *T. terrestris*. Esta topología incluida la edad calculada para el ancestro común más reciente del clado *T. terrestris* (55.2my - 95% HPD: 58.99my $\pm$ 51.19my-) coincide con la radiación y posterior diversificación de los actuales miembros del orden *Perissodactyla*, alrededor de 54-56my bp, durante el Eoceno temprano (Prothero y Schoch, 1989; Steiner y Ryder, 2011; Rose et al., 2014). Este orden de mamíferos es diverso y antiguo y desde su apogeo en el Eoceno, se distribuyó ampliamente a lo largo de Asia, Europa, Norte América y Centro-Sur de América (Hooker, 2005). Según esta

filogenia (Figura 8), el tripanosoma aislado de *D. sumatrensis* (*Rhinocerotidae*) pareció haber divergido primero que los aislados de *T. terrestris* procedentes de tapires brasileños. Esto también es consistente con la radiación de las familias *Rhinocerotidae* y *Tapiridae* en las filogenias multilocus del hospedero (Steiner y Ryder, 2011).

Los métodos filogenéticos bayesianos empleados en este trabajo también evidencian que pese a que los miembros del clado *T. terrestris* están fuertemente asociados a sus hospederos *Perissodactyla*, con relación a los otros miembros y clados del género *Trypanosoma*, el clado *T. grayi* aislado de cocodrilos de África y caimanes de Sudamérica (Viola et al., 2009b, Fermino et al., 2013) es el clado hermano de *T. terrestris*. Esto muestra que respecto a sus hospederos *Perissodactyla* y con los otros tripanosomas, el clado *T. terrestris* es un clado basal de tripanosomas que divergió temprano, de acuerdo a la historia de los mamíferos *Perissodactyla*. Adicionalmente, comparte un ancestro común con los tripanosomas de cocodrilos y caimanes (Figura 8). Esta doble evidencia confirma la hipótesis y observaciones preliminares de Acosta et al., 2013 sobre las relaciones evolutivas de los parientes cercanos al clado *T. terrestris*.

Con base en las dos estrategias de calibración, el clado *T. grayi* parece haber divergido mucho antes, hace aproximadamente 184my (95% HPD: 330.47my $\pm$ 74.46my). Esta fecha es consistente con la extensa historia evolutiva de los *Crocodylia* (Brochu, 2003; Janke et al., 2005; Roos et al., 2007; Oaks, 2011). Sin embargo, los amplios intervalos de credibilidad bayesianos reportados para la edad calculada del nodo *T. grayi*, subrayan la necesidad de evaluar hipótesis sobre la filogeografía histórica de los parásitos tripanosomas que corresponden con sus actuales hospederos crocodilianos, que incorpore aislados parasitarios de varios especímenes a distintas escalas espaciales y a un nivel intraespecífico, a diferencia de lo previamente reportado por Fermino et al., 2013.

La cercanía filogenética entre *T. grayi* y *T. terrestris* se explica porque los tripanosomas han sido capaces de colonizar hospederos distantemente relacionados a lo largo de su diversificación filogenética (Hamilton et al., 2007). Por consiguiente estas relaciones descritas en la figura 8 indican, bajo un escenario macroevolutivo, que la colonización de nuevos hospederos (*host switching*) mediante ajuste ecológico (*ecological fitting*) está dirigiendo la evolución de los clados *T. terrestris*/*T. grayi*. Estas observaciones soportan la previa evidencia sobre el *host switching* mediante *ecological fitting* como principal mecanismo de evolución en los tripanosomas (Hamilton et al., 2004, 2007; Llewellyn et al., 2009bc; Marcili et al., 2009abc; Maia da Silva et al., 2010). *T. cruzi* por ejemplo infecta a una gran variedad de órdenes mamíferos distantemente relacionados y recientes estudios filogenómicos con base en *T. grayi* confirmaron que *T. cruzi* está más emparentado filogenéticamente a *T. grayi* que a *T. brucei* (Kelly et al., 2014). En nuestra filogenia basada en gGAPDH y la región V7V8 confirmamos con fuertes valores de probabilidad posterior que *T. terrestris* está más emparentado a *T. grayi* que este respecto a *T. cruzi* (Figura 8, Figura A2). Sin embargo, el resultado filogenómico confirma todo esto que hemos venido diciendo. Bajo este escenario descrito *T. grayi* estaría más emparentado a los tripanosomas que infectan mamíferos de lo que se suponía. Previos estudios han puesto al clado *T. grayi* como un clado independiente de *T. cruzi*, *T. brucei* y otros tripanosomas, relacionándolo más con los tripanosomas de aves y otros reptiles (Stevens et al., 2001; Hamilton et al., 2004; Hamilton et al., 2007). Sin embargo previas asociaciones han sido descritas: El aislado F4 (*T. grayi* like) (Hoare, 1929) siempre cae en la raíz de los tripanosomas australianos del clado 'Mammalia' (Stevens et al., 1999b, 2001; Hamilton et al., 2007; Acosta et al., 2013) y *T. brucei* ha sido capaz de infectar natural y experimentalmente hospederos reptiles y aves (vg. Njagu et al., 1999).

Por lo anterior, si *T. terrestris* y *T. grayi* son clados hermanos como describimos aquí, el escenario más probable de origen de *T. terrestris* es que un tripanosoma ancestral de reptil colonizó (*ecological host fitting*) un hospedero ancestral

Perissodactyla durante el Eoceno (Figura 8). Posteriormente, *T. terrestris* sufrió un proceso de diversificación mediante la radiación de los *Perissodactyla*. Este escenario es elegante, ya que los miembros existentes de los órdenes *Perissodactyla* y *Crocodylia* comparten hábitats similares y muchas veces se sobreponen (vg. cuencas hidrográficas y planicies inundables de Pantanal y Amazonia). Lo más probable es que el hospedero invertebrado (vector) haya pasado una cepa parasitaria de un hospedero vertebrado a otro. Aunque el vector de *T. terrestris* permanezca desconocido, el vector de *T. grayi* son las moscas *tse-tse* y se especula que los vectores de *T. ralphi* y *T. terena* sean sanguijuelas (Fermino et al., 2013). En Sudamérica, tripanosomas que infectan caimanes se han aislado de varias regiones (Lainson, 1977; Viola et al., 2009b, Fermino et al., 2013). Acorde con esto, recientemente se describió una nueva especie de tripanosoma (*T. clandestinus*), agrupada en el clado acuático pero capaz de infectar caimanes reservorios del clado *T. grayi* en los biomas Amazonía y Pantanal de Brasil, debido a la mediación del vector hematófago (sanguijuelas, *Haementeria* sp.) en el ciclo de transmisión del parásito (Fermino et al., 2015).

Teniendo en cuenta lo anterior, no se puede negar un escenario de transmisión que involucre sanguijuelas como posibles vectores del clado *T. terrestris*. Como se ha observado previamente, la ausencia de especificidad para muchas especies de sanguijuelas y vectores artrópodos puede facilitar la colonización de diversos hospederos (Haag et al., 1998; Hamilton et al., 2004). De las tres especies de tapires existentes *T. terrestris* (*Tapiridae*), es la más ampliamente difundida y exclusiva de Sudamérica y abarca una gran variedad de hábitats, desde el nivel del mar hasta los 4,500 metros de elevación (Emmons, 1990; Wilson y Reeder, 2005). Por tanto, se requieren evaluaciones sobre la presencia de tripanosomas en potenciales vectores para confirmar la presencia de *T. terrestris*, como se ha sugerido previamente (Acosta et al., 2013).

De otro lado, aunque estos resultados indiquen que el clado *T. terrestris* es un clado basal de tripanosomas relacionado filogenéticamente al clado *T. grayi*,

debido a la asociación estrecha de los miembros del clado *T. terrestris* con sus hospederos *Perissodactyla* observada en la topología del árbol y en la estimación de los tiempos de divergencia, no podemos eliminar del todo la premisa coevolutiva. Bajo esta premisa, coevolución y diferenciación por ajuste ecológico no serían dos procesos mutuamente excluyentes. Estudios co-filogenéticos comparados y el abordaje de varias hipótesis, en conjunción con evaluaciones sobre la presencia de *T. terrestris* en otros hospederos *Perissodactyla* ayudarán a resolver estas cuestiones.

Aún se tiene mucho desconocimiento sobre la amplia gama de tripanosomas que pueden estar infectando hospederos selváticos. Aunque numerosos estudios estén siendo dirigidos a abordar esta carencia en el conocimiento (vg. Cavazzana et al., 2010; Lima et al., 2012, 2013, 2015; Ferreira et al., 2015), los resultados que aquí se exponen, indican que la radiación de los tripanosomas puede ser más extensa, intrincada y difundida de lo que se pensaba, y hoy permanece infravalorada. Estudios sobre aislados de otras regiones no muestreadas que abarquen la inmensa variedad de potenciales reservorios selváticos son necesarios. En esta dirección, el uso herramientas genómicas mejorará significativamente nuestra comprensión sobre la sistemática y evolución de los tripanosomas.

5.2 'HOST-SWITCHING II': EL HOSPEDERO INVERTEBRADO ESTÁ PROMOVRIENDO LA DIFERENCIACIÓN DEL PARÁSITO EN UNA ESCALA ESPACIAL FINA

Es poco lo que se conoce sobre los mecanismos evolutivos que están promoviendo la divergencia en las poblaciones naturales de parásitos, y con esto, la escala espacial y temporal en la que están ocurriendo estos cambios (Nadler, 1995; de Meeûs et al., 1998; Huyse et al., 2005; McCoy, 2003). Esta es la primera vez, a nuestro conocimiento, que se examina la demografía histórica y aspectos sobre la genética de poblaciones de un tripanosoma recientemente descrito y

aislado de un reservorio selvático, que no está directamente ligado con tripanosomas de importancia en la salud humana.

De conjunto, la poca variación y falta de estructura genética en los aislados de *T. terrestris* de Pantanal y Mata Atlántica se explica por la reducción en el tamaño poblacional (cuello de botella) que sufrió el parásito desde el Pleistoceno (sección 6.3). Esto también permite explicar el patrón observado en las Figura 6 y 8 (diagrama Structure y nodos más externos del clado *T. terrestris*) del presente estudio.

El extraordinariamente alto grado de aislamiento y estructura genética observado en el haplotipo 9 (H9) ($F_{ST}= 0.808$, $p<0.0001$) es una fuerte evidencia de que el vector de *T. terrestris* en el Pantanal de Nhecolândia está promoviendo la colonización y posterior divergencia del parásito en nuevos hospederos, a una escala espacial fina, esto es, micro geográfica (rango de 14Km).

Los datos telemétricos y de captura-recaptura muestran que los hospederos tapires aunque influyen en la dispersión de los parásitos en la zona muestreada, éstos no constituyen una barrera que promueva el aislamiento del H9 porque durante los períodos de captura se observó que el H9 puede ser dispersado por más de un espécimen tapir a lo largo del paisaje de Nhecolândia y de igual modo, los tapires albergan varias cepas de parásitos (Tabla 3), eliminando la hipótesis de aislamiento en simpatría por un mismo individuo tapir, dada la relativamente poca vagilidad y sociabilidad del hospedero, comparada con otras especies de mamíferos más gregarias (Pinho et al., 2014).

En otra instancia, a pesar de la amplia distancia geográfica entre los biomas Pantanal y Mata Atlántica, no hubo evidencia de estructura genética entre los aislados de ambos biomas, excepto por el H9 de Pantanal. Si el hospedero y el bioma estuviesen influyendo en la estructura genética de los parásitos, se hubiese observado un típico patrón de aislamiento por distancia (IBD), como ha

sido reportado previamente en estudios genético poblacionales y filogeográficos del hospedero vertebrado (Gonçalves da Silva, 2007; De Thoisy et al., 2010; Ruiz-García et al., 2016).

Así pues, dado que las dantas muestreadas tienen escaso contacto entre sí durante su dispersión por el paisaje de Nhecolândia, lo que permiten afirmar estos datos es que una especie de vector o más se están alimentando al mismo tiempo de los tapires y otros hospederos del paisaje, favoreciendo con esto la posterior diferenciación de los parásitos en nuevos hospederos. Este patrón, observado a una escala geográfica muy fina (~14Km) es fuertemente consistente con que el principal mecanismo que promueve la divergencia en los aislados de este parásito es la colonización de nuevos hospederos (host switching) mediante ajuste ecológico (ecological fitting).

Similar a lo esbozado arriba, en un esfuerzo por examinar los procesos que están determinando la estructura genética de *T. cruzi*, Messenger et al., 2015 hallaron que las poblaciones selváticas de TcI están subdivididas por ecotopo. Los autores encontraron que hay un elevado grado de estructura genética (F_{ST} = 0.42 y 0.35) entre ecotopos vecinos a cortos rangos geográficos (tierras montañosas altas y tierras bajas arbóreas) (~220Km) pero un muy bajo grado de estructura genética (F_{ST} = 0.016-0.084) entre ecotopos similares, a pesar de la amplia distancia geográfica (465Km), indicando así que el host switching mediante ajuste ecológico está determinando la diversidad genética de TcI en Bolivia (Messenger et al., 2015). Nuestros resultados con estos aislados de *T. terrestris* corroboran el mismo mecanismo evolutivo y acuerda con lo previamente reportado y sugerido para otras especies de tripanosomas (Hamilton et al., 2007; Llewellyn et al., 2009abc; Marcili et al., 2009c; Maia da Silva et al., 2010).

Previamente se ha indicado que la oportunidad ecológica desempeña un papel preponderante en la colonización de nuevos hospederos por parte de las poblaciones de parásitos y posteriormente en su ajuste ecológico (Price, 1977,

1980; Brooks y Hoberg, 2007; Hoberg y Brooks, 2008; Agosta y Klemens, 2008; Agosta et al., 2010; Araujo et al. 2015; Hoberg y Brooks, 2015). Esta oportunidad en tripanosomas está generalmente dada por la capacidad que tiene el vector de infectar con varias cepas de parásitos a diversos hospedadores vertebrados durante las ingestas de sangre (Hamilton et al., 2007). El bioma Pantanal es un hotspot de diversidad biológica y es la planicie inundable más extensa del planeta con un patrón de inundamiento estacional que se extiende y prolonga desde enero hasta junio y varía espacial y temporalmente de acuerdo a las características geomorfológicas que distinguen al bioma (Junk et al., 2006ab).

La topografía del bioma y las características del hospedero permiten predecir el patrón de divergencia microgeográfica encontrado en el H9. El paisaje de Nhecolândia, que ocupa cerca del 20% del total de pantanal exhibe la mayor parte de la diversidad de especies del bioma, pues es la subregión más heterogénea y posee características únicas e intrigantes con respecto a las demás zonas inundables y humedales del planeta: está rodeado de más de diez mil lagos y lagunas superficiales que varían en salinidad y tiene un sistema de flujo permanente y estacional de agua (*vazantes* y *corixos*) que alimenta varias de estas lagunas y meandros y varían mediante un sistema de lluvias monomodal (Evans y Costa, 2013; Assine et al., 2016). Los datos de radiotelemetría derivados de este estudio indican que los tapires se movilizan a lo largo de todo el paisaje y superan varias de estas ‘barreras ecológicas’, llevando consigo varias cepas de parásitos (Tabla 3). De hecho, *T. terrestris* es una especie de tapir que se caracteriza por ser excelente nadadora y recientes estudios genéticos muestran que grandes barreras como ríos no impiden el flujo de genes entre sus poblaciones (Pinho et al., 2014; Ruíz-García et al., 2016).

No sabemos qué tipo de vector o vectores están promoviendo este patrón de divergencia, pero las relaciones filogenéticas (sección 6.1 de este trabajo), que reafirman el resultado genético poblacional que tenemos aquí, permiten intuir que probablemente el vector de *T. terrestris* sean sanguijuelas. Sin embargo, dada la

amplia variedad de ectoparásitos que infectan tapires, no se puede descartar que garrapatas, dípteros hipobóscidos, flebotominos y probablemente culícidos y tabánidos actúen como posibles vectores de estos tripanosomas (Acosta et al., 2013). Asimismo, los tripanosomas que infectan ungulados artiodáctilos como *T. theileri*, *T. evansi* y *T. vivax* son transmitidos por varios dípteros hematófagos y por vía mecánica (Rodrigues et al., 2006, 2010).

Los procesos que llevan a la divergencia en poblaciones naturales en escalas espaciales finas han sido muy poco estudiados en la naturaleza (Richardson et al., 2014). La divergencia microgeográfica ocurre cuando hay diferencias de rasgos (fenotípicos y genéticos) entre muestras e individuos que corresponden a un mismo escenario o vecindario de dispersión (dispersal neighborhood) (Richardson et al., 2014), como el presentado aquí. A diferencia de la adaptación microgeográfica, este concepto no presume una asunción adaptativa en el rasgo o los rasgos que están promoviendo divergencia (Richardson et al., 2014).

Aunque el marcador ITS1 ha sido muy útil para examinar la variabilidad intraespecífica en poblaciones de parásitos tripanosomas y ha sido empleado en la determinación de linajes y genotipos de *T. cruzi* (Marcili et al., 2009b), que luego fueron confirmados en estudios multilocus (Lima et al., 2015b) así como el descubrimiento de patrones crípticos de diversidad en tripanosomas (vg. Maia da Silva et al. 2004; Marcili et al., 2009ac; Lima et al., 2015b). Debido al cuello de botella, no fue posible agrupar estos aislados en linajes o clústeres (Figuras 6 y 8) con ninguno de los marcadores, pero sí fue posible observar en el AMOVA (valores F_{ST}) y en el test de Barrier (Figura 7) la existencia de este haplotipo fuertemente aislado y diferenciado (H9). Por tanto aquí, en un contexto de genética del paisaje, estamos proveyendo evidencia de divergencia microgeográfica promovida por el vector, mediante colonización de otros hospederos. Para determinar si existe adaptación microgeográfica o alguna barrera selectiva que promueva el aislamiento de estos parásitos, es necesario un estudio mucho más complejo que examine la presencia de *T. terrestris* en

otros hospederos de Pantanal y otros biomas, así como el uso de herramientas multilocus. Aun así, este es quizás el primer caso documentado de divergencia microgeográfica para una especie de tripanosoma recientemente descrita y no relacionada directamente con tripanosomas patógenos del hombre.

Se ha indicado que la plasticidad fenotípica es un componente fundamental del ecological fitting (Janzen, 1980; Agosta y Klemens 2008). Bajo estas condiciones, los parásitos del H9 que estarían diferenciándose también serían capaces de seguir explotando sus hospedadores 'ancestrales', en este caso las dantas; tal como fue observado en el presente trabajo. Este patrón que observamos es contemporáneo, pero desconocemos cómo y en qué medida, procesos históricos y ecológicos estarían modelándolo. Estudios multilocus y filogeográficos históricos (por ejemplo filogeografía bayesiana) y a distintas escalas espaciales son necesarios para determinar el flujo histórico y contemporáneo de genes así como la determinación de especies putativas en *T. terrestris*, que indiquen posibles escenarios de especiación. Esto es una tarea desafiante y pese a que el 'ecological host fitting' sea el mecanismo señalado para la evolución de los tripanosomas sensu lato, los procesos adaptativos y ecológicos detrás de su divergencia permanecen en total desconocimiento.

Por otra parte, esta no es la primera vez que se observa un patrón similar de divergencia en parásitos. Previos autores ya han documentado la tendencia a la fragmentación espacial en poblaciones naturales de parásitos (vg. Price, 1977, 1980; Huyse et al., 2005; Huyse, 2006). El clásico ejemplo de adaptación local y formación de razas geográficas (especies incipientes) como resultado de la especialización ecológica luego de la colonización de un nuevo hospedero lo ofrece un insecto fitófago, *Rhagoletis pomonella* (Filchak, Roethele y Feder, 2000). Recientemente, Booth et al., 2015 confirmaron la presencia de razas geográficas en *Cimex lectularius* asociadas a sus hospederos (humanos y murciélagos) en condiciones de simpatría ($F_{ST} = 0.683$). De igual manera, estos fenómenos también pueden ocurrir a distintas escalas espaciales y en presencia

de fuertes barreras geográficas y oceánicas, como islas, en donde las aves promueven el aislamiento de poblaciones de piojos en las Galápagos ($F_{ST}=0.429$) (Koop et al., 2014).

En este mismo sentido, *T. cruzi* ofrece un excepcional ejemplo, se ha documentado una extraordinaria diversidad genética dentro un mismo hospedero mamífero (*Didelphis marsupialis* y *Philander opossum*), sugiriendo un mecanismo de selección diversificadora (Llewellyn et al., 2011). Por ende, aunque históricamente se asuma que la especiación es un fenómeno geográfico (Mayr, 1942; Coyne y Orr, 2004), el hospedero configura también un escenario de especialización y especiación en parásitos (Price, 1977; De Meeûs et al., 1998; McCoy, 2003).

Los datos radiotelemétricos del hospedero vertebrado en unión con estudios genéticos pueden ayudar a elucidar la compleja dinámica que involucra el ciclo de dispersión, transmisión y diferenciación en poblaciones de parásitos. Sin embargo, teniendo en cuenta la amplia distribución y compleja estructura genética de los tapires (De Thoisy et al., 2010; Ruíz-García et al., 2016) también es necesario evaluar la variación genética y la filogeografía del parásito en una escala continental, que incorpore un mayor número de loci y un mayor esfuerzo de muestreo, a fin de develar otros aspectos sobre la evolución e historia de vida del clado *T. terrestris*. Esta tarea será desafiante, toda vez que es necesario el desarrollo de nuevos cebadores específicos para secuenciar otras regiones del genoma de *T. terrestris* (en este trabajo se intentó secuenciar sin éxito un total de seis marcadores) y los hospederos tapires son solitarios y difíciles de observar y capturar en estado salvaje, aparte de que son una especie vulnerable, cuyos tamaños poblacionales están decreciendo (Naveda et al., 2008) y como se describió, los parásitos exhiben un complejo ciclo de vida.

5.3 TENDENCIAS DEMOGRÁFICAS

Se ha caracterizado que los cambios ambientales y climáticos constituyen uno de los mayores motores de diversificación biótica (Fujita et al., 2010). De éstos, los cambios climáticos del Cuaternario, especialmente aquellos relacionados con las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno influyeron de manera determinante en la distribución y adaptación de la biota contemporánea de todo el planeta, donde la región Neotropical ha ocupado especial interés (Rull, 2011; Smith et al., 2014; Weigelt et al., 2016).

El bioma Pantanal de hoy día es el resultado de las fluctuaciones climáticas del Cuaternario. Antes de presentar las características de humedal inundable que posee hoy, la evidencia soporta que durante el Último Glacial Máximo (LGM) (~21ky bp) esta zona de Sudamérica sufrió un proceso de aridificación y desertificación (Whitney et al., 2011; McGlue et al., 2012), que afectó a su biota (vg. Lopes et al., 2007), similar al patrón del hemisferio Sur para el resto del planeta (Fujita et al., 2010). El bioma Mata Atlántica presentó un escenario más complejo y desigual, influido por los aumentos en el nivel del mar y la presencia de corredores y refugios entre zonas desérticas (Álvarez-Presas et al., 2014; Ramos-Fregonezi et al., 2015; Cabane et al., 2016; Prates et al., 2016). En concordancia, este proceso de desertificación, durante el LGM es consistente con el cuello de botella presentado en las poblaciones de *T. terrestris* desde el último período glacial (100ky bp, Figura 9).

Aunque como vemos hay una considerable cantidad de evidencia sobre los procesos históricos y climáticos que modelaron las poblaciones de organismos de vida libre (revisado en Rull, 2011), estos procesos no se han estudiado con la misma magnitud e intensidad en poblaciones de parásitos (vg. Hesse y Bucklin, 2016), y salvo *T. cruzi*, *T. brucei* y *Leishmania* (vectores incluidos) (Esseghir et al., 1997; Oberle et al., 2010; Leblois et al., 2011; Ramírez et al., 2013; Gómez-

Palacio y Triana, 2014) no se tiene documentado estos fenómenos para otros tripanosomátidos.

Así pues, nuestro resultado con *T. terrestris* contrasta con la historia demográfica de *T. cruzi*, que experimentó expansiones poblacionales durante el Holoceno a raíz de la expansión de los asentamientos humanos en Sudamérica (O'Fallon y Fehren-Schmitz, 2011; Ramírez et al., 2013) y con *Leishmania infantum chagasi*, que sufrió cuellos de botella luego de la colonización europea en las Américas (Leblois et al., 2011). Estas oscilaciones demográficas permiten explicar los patrones actuales de diversidad en estos parásitos, y su posterior radiación (vg. Lewis et al., 2011).

La historia demográfica del hospedero (*T. terrestris*, *Tapiridae*) indica que hubo descensos poblacionales durante el LGM, seguido por una tendencia general de expansiones poblacionales durante el Holoceno (Ruíz-García et al., 2016).

Acorde con esto y aunque con los tres marcadores empleados no se hayan detectado claras evidencias de recuperación poblacional a partir del cuello de botella (Figura 9), con base en más loci que puedan develar adicionales tendencias demográficas, tampoco debemos descartar una posible expansión poblacional del parásito en el Holoceno (12ky bp), que es el tiempo en que los biomas Pantanal y Mata Atlántica adquirieron las características que observamos actualmente (Assine et al., 2016). Sin embargo, los estudios más recientes indican que hacia 12ky bp, la fauna sudamericana sufrió un proceso de extinción promovido por la acción humana, combinado con un proceso de cambio climático (Metcalf et al., 2016) y dada la compleja dinámica de los tapires, la información demográfica corrobora que las poblaciones de *T. terrestris* del sur de Sudamérica sufrieron contracciones poblacionales hacia 6ky bp (Ruíz-García et al., 2016).

Así pues y acorde con los resultados derivados de este trabajo, todo esto confirma el rol que los hospederos y las oscilaciones climáticas, en conjunto con la acción humana, desempeñan sobre la historia demográfica y estructura

genética de las poblaciones de parásitos (Hoberg y Brooks, 2015). En consecuencia, lo más probable es que la acción humana contemporánea que está llevando a la extinción de las poblaciones de tapires también influya sobre la historia natural y ciclo de vida de los parásitos. En respuesta a esto y con la información de este estudio, las poblaciones de nuestros parásitos parecen no haberse recuperado del cuello de botella, que es consistente con la homogeneidad y poca diversidad genética presente en los aislados parasitarios (Figura 6).

En relación a lo anterior, las poblaciones de tapires se han extinto en estado salvaje en Mata Atlántica, que también es uno de los biomas más amenazados del planeta (Galindo-Leal y Câmara, 2003; Naveda et al., 2008). Interesantemente, los aislados tripanosomas de *D. sumatrensis* (otra especie de *Perissodactyla* en peligro de extinción) (van Strien et al., 2008) que fueron incluidos en el análisis de clustering bayesiano, tampoco fueron agrupados en ningún clúster (Figura 6). Lo más probable es que estos tripanosomas también hayan sufrido un severo cuello de botella como resultado de la extinción de su hospedero, pues estos parásitos fueron aislados de cuatro especímenes rinocerontes muertos en cautiverio, con altos niveles de parasitemia (Linda McInnes, comunicación personal).

De otro lado, hay una probable tendencia a que nuestras poblaciones de parásitos sufran cuellos de botella recurrentes. Esto se debe a que el histograma de eventos coalescentes (Figura 10) no consigue recuperar información más allá de 500ky. Una posible explicación a esto, más allá de la falta de diversidad genética presente en los aislados, es que durante este tiempo haya habido cuellos de botella. Aunque esto sea sólo una hipótesis, esta tendencia a cuellos de botella recurrentes ya se ha documentado para otros modelos microparásitos, por ejemplo en *Plasmodium* (Rich et al., 1998; Chang y Hartl, 2014). Un rasgo que define a los parásitos es su tendencia a experimentar constantes reflujos en sus tamaños poblacionales, debido a su naturaleza a fragmentarse (Price, 1977).

El hecho de que haya un haplotipo diferenciado explica que la dinámica de expansión-contracción poblacional puede llevar a escenarios de diferenciación de los parásitos en otros hospederos vía host switchings. Esto como vimos aquí, puede presentarse a escalas espaciales muy reducidas.

6. CONCLUSIÓN

En este estudio por vez primera exploro los patrones macroevolutivos y microevolutivos que están determinando la diferenciación de poblaciones de parásitos tripanosomas recientemente descritas y aisladas de hospederos selváticos, no relacionadas directamente con tripanosomas patógenos del hombre. De conjunto, la filogenia molecular bayesiana, la historia demográfica coalescente y los patrones de estructura genética permiten afirmar que la dispersión y colonización del parásito mediada tanto por el hospedero vertebrado como el hospedero invertebrado está promoviendo la evolución del clado *T. terrestris*. Este mecanismo de evolución es consistente con un 'ecological host fitting' y puede ocurrir a distintas escalas espaciales, microgeográficas. No obstante, aquí propongo con respecto a *T. terrestris*, que host-switching y coevolución no son dos procesos excluyentes. Debido a la estrecha asociación del clado *T. terrestris* con sus hospederos *Perissodactyla*, no se puede descartar una hipótesis coevolutiva. Así pues, la historia evolutiva de los parásitos tripanosomas en relación con sus hospederos vertebrados e invertebrados es compleja y dinámica.

Los estudios de datación molecular son escasos entre tripanosomas. Aquí propongo una referencia temporal basada en métodos de reloj molecular relajado para estimar los tiempos de divergencia de los clados *T. terrestris* y *T. grayi*, que a su vez, propongo como clados hermanos. A pesar de que se obtuvieron buenos estimados de divergencia en este estudio, nuevas cepas de otros *perissodactyla* y reportes de nuevas especies de tripanosomas contribuirán a asumir de una mejor manera la evolución del clado *T. terrestris* y parientes cercanos.

Aunque aquí tenemos ciertos patrones histórico-demográficos y macroevolutivos, aún permanece en total desconocimiento el tiempo y los mecanismos que están promoviendo la adaptación y la divergencia de estos

tripanosomas. Estudios de campo que contribuyan a examinar la biología y ecología del ciclo de vida de los tripanosomas, logrando identificar los vectores y hospederos del clado *T. terrestris* en conjunción con datos multilocus genómicos aclararán significativamente nuestra comprensión sobre los mecanismos que promueven la divergencia en los parásitos.

Este trabajo demuestra que los parásitos no sólo son importantes como modelos para estudiar procesos de divergencia, sino que un contexto de cambio climático y de enfermedades emergentes y en un mundo cambiante influido por las acciones del hombre, cambios importantes pueden estar ocurriendo a pequeña escala. Predecir futuros patrones de host-switchings en poblaciones naturales es de importancia fundamental en la salud pública. El estudio de otras especies de tripanosomas, especialmente de aislados selváticos ayudará como vemos, en la comprensión de la evolución de *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* y especies afines. Estudios filogeográficos comparativos que examinen la dinámica de los linajes de otros miembros tripanosomas en una escala continental deben apuntarse en esa dirección. La reciente propuesta de unión entre filogeografía y genética del paisaje (Rissler, 2016) será de gran utilidad para estudiar poblaciones naturales de parásitos. Finalmente, a nuestro modo de ver el estudio de los mecanismos ecológicos y genéticos que promueven adaptación y divergencia en las poblaciones de parásitos, aún permanecen en estado prematuro y configuran un área de futura investigación.

REFERENCIAS

- Acosta, L.C.I., Costa, A.P., Nunes, P.H., Gondim, M.F.N., Gatti, A., Rossi, J.L., Gennari, S.M., Marcili, A. (2013) Morphological and molecular characterization and phylogenetic relationships of a new trypanosome species in *Tapirus terrestris* (Brazilian tapir), *Trypanosoma terrestris* sp. nov., in Atlantic Rainforest of Southeastern Brazil. *Parasit. Vectors* (6):349.
- Agosta, S.J., Klemens, J.A. (2008) Ecological fitting by phenotypically flexible genotypes: implications for species associations, community assembly and evolution. *Ecol. Lett.* 11: 1123–1134. doi: 10.1111/j.1461-0248.2008.01237.x
- Agosta, S.J., Janz, N., Brooks, D.R. (2010) How specialists can be generalists: resolving the “parasite paradox” and implications for emerging infectious disease. *Zool (Curitiba, Impresso)*. (27): 151–162.
- Álvarez-Presas, M., Sánchez-Gracia, A., Carbayo, F., Rozas, J., Riutort, M. (2014) Insights into the origin and distribution of biodiversity in the Brazilian Atlantic forest hot spot: a statistical phylogeographic study using a low-dispersal organism. *Heredity*, 112: 656–665.
- Araujo, S.B.L., Braga, M.P., Brooks, D.R., Agosta, S.J., Hoberg, E.P., von Hartenthal, F.W., Boeger, W.A. (2015) Understanding Host-Switching by Ecological Fitting. *PLoS ONE* 10(10): e0139225. doi:10.1371/journal.pone.0139225.
- Assine, M.L., Merino, E.R., Fabiano, P.N., Warren, L.V., Guerreiro, R.L., McGlue, M.M. (2016) Ch. 2 - Geology and geomorphology of the Pantanal basin. In *Dynamics of the Pantanal wetland in South America*, Bergier I., Assine, M.L. (Eds.) *The handbook of environmental chemistry* 37: 23-50.
- Beerli, P. (1998) Estimation of migration rates and population sizes in geographically structured populations. G.R. Carvalho (Ed) in *Adv Mol Ecol*. IOS Press. Pp.39-54.

- Booth, W., Balvín, O., Vargo, E. L., Vilímová, J., Schal, C. (2015), Host association drives genetic divergence in the bed bug, *Cimex lectularius*. *Mol Ecol*, 24: 980–992. doi:10.1111/mec.13086
- Bouckaert, R., Heled, J., Kuhnert, D., Vaughan T., Wu C-H, Xie D., Suchard M.A., Rambaut A., Drummond A.J. (2014) BEAST 2: A software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Computation Biology*, 10(4), e1003537.
- Bouckaert R. (2015) bModelTest: Bayesian site model selection for nucleotide data. bioRxiv 020792; doi: <http://dx.doi.org/10.1101/020792>.
- Brisse, S., Henriksson J., Barnabe, C., Douzery, E.J., Berkvens, D., Serrano, M., De Carvalho, M.R., Buck, G.A., Dujardin, J.C., Tibayrenc, M. (2003) Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infect Genet Evol* 2: 173-183.
- Brochu, C.A. (2003) Phylogenetic approaches toward crocodylian history. *Annu. Rev. Earth. Planet Sci.* 31:357–397
- Brooks, D.R., McLennan, D.A. (2002) *The Nature of Diversity: An Evolutionary Voyage of Discovery*, University of Chicago Press.
- Brooks, D.R., Hoberg E.P. (2007) How will global climate change affect parasite-host assemblages? *Trends Parasitol.* 23 (12):571-574.
- Cabane, G.S., Calderón, L., Trujillo-Arias, N., Flores, P., Pessoa, R., D'Horta, F.M., Miyaki, C.Y. (2016) Effects of Pleistocene climate changes on species ranges and evolutionary processes in the Neotropical Atlantic Forest. *Biol. J Lin. Soc.*, doi: 10.1111/bij.12844.
- Camargo, E.P. (1998) *Phytomonas* and other Trypanosomatid parasites of plants and fruits. *Adv Parasit.*; 42:29-112.
- Camargo, E.P. (1964) Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi* I: Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Ins. Med. Trop. Sao Paulo* (6): 93-100.
- Castro-Conde, I., de Uña Álvarez, J. (2014). Sgof: An R package for multiple testing problems. *The R Journal* 6:96-113.

- Cavalier-Smith T. (1981) Eukaryote kingdoms: seven or nine? *Biosystems*; (14):461-81.
- Cavalier-Smith T. (1993) Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiol Rev.*; 57(4):953-94.
- Cavalier-Smith, T. (2004) Only six kingdoms of life. *Proceedings: Biological Sciences*, 271:1251-1262.
- Cavazzana, Jr M., Marcili, A, Lima, L, da Silva, F.M., Junqueira, A.C., Veludo, H.H., Viola, L.B., Campaner, M., Nunes, V.L., Paiva, F., Coura, J.R., Camargo, E.P., Teixeira, M.M.G. (2010) Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (ssrRNA and gGAPDH) and mitochondrial (Cyt b) genes of trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* parasitic in Brazilian bats. *Int J. Parasitol.* (40):345–55.
- Chang, H.H., Hartl, D.L. (2014) Recurrent Bottlenecks in the Malaria Life Cycle, Obscure Signals of Positive Selection. *Parasitol.* 142 (S1): S98–S107. doi:10.1017/s0031182014000067.
- Combes, C. (2001) *Parasitism: the Ecology and Evolution of Intimate Interactions*, University of Chicago Press
- Criscione, C.D., Blouin, M.S. (2004) Life cycles shape parasite evolution: comparative population genetics of salmon trematodes. *Evolution* (58): 198–202
- Cuervo, P., Cupolillo, E., Segura, I., Saravia, N. y Fernandes, O., (2002) Genetic diversity of Colombian sylvatic *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the ribosomal DNA. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 97(6): 877–880.
- Chang, D., Shapiro, B. (2016) Using ancient DNA and coalescent-based methods to infer extinction. *Biol. Lett.* (12) 20150822. <http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2015.0822>.
- Darwin, C. (1859). *On the origin of species by means of natural selection, or, the preservation of favoured races in the struggle for life*. London: J. Murray.

- De Meeûs, T., Michalakis, Y., Renaud, F. (1998) Santa Rosalia revisited or why are there so many kinds of parasites in the garden of earthly delights'? *Parasitol Today* 14(1):10-3.
- De Meeûs, T., Durand, P., Renaud, F. (2003) Species concepts: what for? *Trends. Parasitol.* 19 (10): 425 – 427.
- De Thoisy, B., da Silva, A., Ruiz-García, M., Tapia, A., Ramírez, O., Arana, M., Quse, V., Miño, C.P., Tobler, M., Pedraza, C., Lavergne, A. (2010) Population history, phylogeography, and conservation genetics of the last Neotropical mega-herbivore, the lowland tapir (*Tapirus terrestris*) *BMC Evol Biol.* 10:278.
- Dietrich, P., Soares, M.B., Affonso, M.H., Floeter-Winter, L.M., (1993) The *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA-encoding gene: analysis of promoter and upstream intergenic spacer sequences. *Gene.* 125(1): 103.
- Drummond, A.J., Rambaut, A., Shapiro, B., Pybus, O.G. (2005) Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol Biol Evol.* 22 (5):1185-1192. doi: 10.1093/molbev/msi103.
- Earl, D.A, vonHoldt, B.M. (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Res.*, 4:359-361.
- Esseghir, S., Ready, P. D., Killick-Kendrick, R. and Ben-Ismaïl, R. (1997) Mitochondrial haplotypes and phylogeography of *Phlebotomus* vectors of *Leishmania major*. *Insect Molecular Biology*, 6: 211–225. doi:10.1046/j.1365-2583.1997.00175.x
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol. Ecol.*, 14: 2611–2620.
- Evans, T.L., Costa, M. (2013) Landcover classification of the Lower Nhecolândia subregion of the Brazilian Pantanal Wetlands using ALOS/PALSAR, RADARSAT-2 and ENVISAT/ASAR imagery. *Remote Sens Environ* 128:118–137.

- Excoffier, L., H.E. L. Lischer (2010) Arlequin suite ver. 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Res.* (10): 564-567.
- Falush, D., Stephens, M., Pritchard, J.K. (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164: 567–1587.
- Felsenstein, J. (1989) Phylip ver. 3.6: Phylogeny inference package. *Cladistics*, 5:164–166.
- Fermino, B.R, Viola, L.B., Paiva, F., Garcia, H.A., 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. *Parasit. Vectors*. 6: 313. doi: 10.1186/1756-3305-6-313.
- Fermino, B.R., Paiva, F., Soares, P., Tavares, L.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. *Int J Parasitol.* 4(3): 368-378.
- Fernandes, A.P., Nelson, K., Beverley, S.M., 1993. Evolution of nuclear ribosomal RNAs in kinetoplastid protozoa: perspectives on the age and origins of parasitism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90 (24): 11608-12.
- Ferreira, R. C., Campaner, M., Viola, L. B., Takata, C. S., Takeda, G. F., Teixeira, M. M. G. (2007) Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. *Parasitol.* (19):1-16.
- Ferreira, R. C., De Souza, A. A., Freitas, R. A., Campaner, M., Takata, C. S., Barrett, T. V., Shaw, J. J., Teixeira, M. M. G. (2008) A phylogenetic lineage of closely related trypanosomes (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) of

- anurans and sand flies (*Psychodidae*, *Diptera*) sharing the same ecotopes in Brazilian Amazonia. *J. Euk. Microb.* (55): 427-435.
- Ferreira, J.I.S, da Costa, A.P., Ramírez, D., Roldan, J.A., Saraiva, D., Founier, G.F., Zambelli, E.R., Minervino, A.H., Verdade, V.K., Gennari, S.M., Marcili, A. (2015) Anuran trypanosomes: phylogenetic evidence for new clades in Brazil. *Syst. Parasitol.* 91(1):63-70. doi: 10.1007/s11230-015-9558-z.
- Filchak, K.E., Roethele, J.B., Feder, J.L. (2000) Natural selection and sympatric divergence in the apple maggot *Rhagoletis pomonella*. *Nature*, 407(6805):739-42.
- Flot, J.F. (2010) SeqPHASE: a web tool for interconverting PHASE input/output files and FASTA sequence alignments *Mol. Ecol. Res.* 10 (1): 162-166. doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02732.x
- Fu, Y.X., Li, W.H. (1999) Coalescing into the 21st Century: An Overview and Prospects of Coalescent Theory. *Theor. Pop. Biol.*, (56):1-10.
- Fujita, M. K., McGuire, J. A., Donnellan, S. C. and Moritz, C. (2010) Diversification and persistence at the arid–monsoonal interface: Australia-wide biogeography of the bynoe's gecko (*Heteronotia binoei*; *Gekkonidae*). *Evolution*, 64 (8):2293–2314. doi:10.1111/j.1558-5646.2010.00993.x.
- Galindo-Leal, C., Câmara, G.I. (2003) Eds. The Atlantic Forest of South America, Biodiversity status, threats and outlook. The center for applied biodiversity science at conservation international, Washington D.C. Island Press ISBN: 1–55963–988–1
- García, L., Ortiz, S., Osorio, G., Torrico, M.C., Torrico, F., Solari, A. (2012) Phylogenetic analysis of Bolivian bat trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* based on cytochrome B sequence and minicircle analyses. *PLoS One*, 7:e36578.
- Giraud, T. (2006) Speciation in parasites: host switching does not automatically lead to allopatry. *Trends Parasitol.* 22(4): 151-52.
- Gómez-Palacio, A., Triana, O. (2014) Molecular Evidence of Demographic Expansion of the Chagas Disease Vector *Triatoma dimidiata* (*Hemiptera*, *Reduviidae*, *Triatominae*) in Colombia. *PLoS Negl Trop Dis* 8(3): e2734.

- Gonçalves da Silva, A. (2007) Causes of spatial genetic structure in Mammals: A case study in the Atlantic Forest, Brazil [PhD Thesis]. Columbia University, NY., U.S.A.
- Grünwald, N.J., Goss, E.M. (2011) Evolution and population genetics of exotic and re-emerging pathogens: Novel tools and approaches. *Annu. Rev. Phytopathol.* (49):249–67 doi: 10.1146/annurev-phyto-072910-095246.
- Haag, J., O'huigin, C., Overath, P. (1998) The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for an early divergence of the Salivaria. *Molecular Biochemical Parasitology.* 91(1):37-49.
- Hamilton, P.B., Stevens, J.R., Gaunt, M.W., Gidley, J., Gibson, W.C. (2004) Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. *Int. J. Parasitol.* 34 (12):1393-404.
- Hamilton, P. B., Stevens, J. R., Gidley, J., Holz, P., Gibson, W. C. (2005a) A new lineage of trypanosomes from Australian vertebrates and terrestrial bloodsucking leeches (Haemadipsidae). *International Journal for Parasitology.* 35(4):431-443.
- Hamilton, P. B., Stevens, J. R., Holz, P., Cooke, B., Gibson, W. C. (2005b) The inadvertent introduction into Australia of *Trypanosoma nabiasi*, the trypanosome of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), and its potential for biocontrol. *Mol. Ecol.* (4):3167-3175.
- Hamilton, P.B, Gibson, W.C., Stevens, J.R. (2007) Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. *Mol. Phyl. Evol* 44(1):15-25.
- Hamilton, P.B, Adams, E.R, Njiokou, F., Gibson, W.C, Cuny, G., Herder, S. (2009) Phylogenetic analysis reveals the presence of the *Trypanosoma cruzi* clade in African terrestrial mammals. *Infect Genet Evol.* 9(1):81-6.
- Hamilton, P.B., Stevens, Jamie R. (2010) Ch.13 - Classification and Phylogeny of *Trypanosoma cruzi*, in *American Trypanosomiasis*, Elsevier, London, Pp. 321-338, ISBN 9780123848765, <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384876-5.00013-7>.

- Hamilton, P.B., Teixeira, M.M.G., Stevens, J.R. (2012) The evolution of *Trypanosoma cruzi*: the 'bat seeding' hypothesis. Trends Parasitol. 28(4): 136-141.
- Hannaert, V., Opperdoes, F.R., Michels, P.A. (1998) Comparison and evolutionary analysis of the glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from different Kinetoplastida. J Mol Evol; 47(6):728-38.
- Harrison, R.G., Larson, E.L. (2014) Hybridization, Introgression, and the Nature of Species Boundaries, Journal of Heredity 105:795–809.
- Heled, J., Drummond, A. (2008): Bayesian inference of population size history from multiple loci. BMC Evol Biol., 8 (1): 289.
- Heled, J., Drummond, A.J. (2010) Bayesian inference of species tree from multilocus data. Mol Biol Evol, 27(3):570-80.
- Heller, R., Chikhi, L., Siegmund, H.R. (2013) The Confounding Effect of Population Structure on Bayesian Skyline Plot Inferences of Demographic History. PLoS ONE 8(5): e62992.
- Hernández, R., Rios, P., Valdés, A.M., Piñero, D., (1990) Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small-subunit ribosomal RNA coding region: comparison with other trypanosomatids. Mol Biochem Parasitol. 41 (2): 207-12.
- Hesse, E., Buckling, A. (2016) Host population bottlenecks drive parasite extinction during antagonistic coevolution. Evol. 70(1): 235–240.
- Ho, S. Y. W., Shapiro, B. (2011) Skyline-plot methods for estimating demographic history from nucleotide sequences. Mol. Ecol. Res., (11):423–434. doi:10.1111/j.1755-0998.2011.02988.x
- Ho, S.Y.W., Duchêne S. (2014) Molecular-clock methods for estimating evolutionary rates and timescales. Mol. Ecol., 23, 5947–5965.
- Hoare, C.A., (1929) Studies on *Trypanosoma grayi* II. Experimental transmission to the crocodile. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 23: 449–484.
- Hoare, C.A. (1972) The trypanosomes of mammals: a zoological monograph. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

- Hoberg, E.P., Brooks, D.R. (2008) A macroevolutionary mosaic: episodic host switching, geographical colonization and diversification in complex host–parasite systems. *J. Biogeogr.* (35): 533–1550.
- Hoberg, E.P., Brooks, D.R. (2015) Evolution in action: climate change, biodiversity dynamics and emerging infectious disease. *Phil. Trans. R. Soc. B* (370): 20130553. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2013.0553>.
- Hooker, J. J. (2005) In *The Rise of Placental Mammals: Origins and Relationships of the Major Extant Clades* Eds. Rose K. D., Archibald J. D. Johns Hopkins Univ. Press. 199–214.
- Honigberg, B.M. (1963) A contribution to systematics of the non-pigmented flagellates. In: Ludvik J, Lom J, Vavra J. (Ed.) *Progress in Protozoology*. New York: Academic Press; p.68.
- Huyse, T., Poulin, R., Théron, A. (2005) Speciation in parasites: a population genetics approach. *Trends Parasitol* 21(10): 469-75.
- Huyse, T. (2006) Response to Giraud: Population genetics puts reproductive isolation back on track. *Trends Parasitol.* 22(4): 152-53.
- Jacobson, M., Rosenberg, N.A. (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23: 1801-1806.
- Jakes, K. A. O'donoghue, P. J. Adlard, R. D. (2001a) Phylogenetic relationships of *Trypanosoma chelodina* and *Trypanosoma binneyi* from Australian tortoises and platypuses inferred from small subunit rRNA analyses. *Parasitol.*, (123):483-7.
- Jakes, K. A. O'donoghue, P.; Munro, M. Adlard, R. (2001b) Hemoprotozoa of freshwater turtles in Queensland. *J. Wild life Dis.*, (37):12-19.
- Janke, A., Gullberg, A., Hughes, S., Aggarwal, R. K., Arnason, U. (2005) Mitogenomic analyses place the gharial (*Gavialis gangeticus*) on the crocodile tree and provide pre-K/T divergence times for most crocodilians. *J. Mol. Evol.* 61:620–626.
- Janzen, DH. (1985) On Ecological Fitting. *Oikos* 45(3):308-310.

- Junk, W.J., Cunha, C.N., Wantzen, K.M., Petermann, P., Strussmann, C., Marques, M.I., Adis, J. (2006a) Biodiversity and its conservation in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil. *Aquat Sci* 68: 279–309.
- Junk, W.J., Brown, M., Campbell, I.C., Finlayson, M., Gopal, B., Ramberg, L., Warner, B.G. (2006b) The comparative biodiversity of seven globally important wetlands: a synthesis. *Aquat Sci* 68: 400–414.
- Kaboré, J., MacLeod, J., Jamonneau, V., Ilboudo, H., Duffy, C., Camara, M., Camara, O., Belem, A.M.G., Bucheton, B., de Meeûs, T., (2011) Population genetic structure of Guinea *Trypanosoma brucei gambiense* isolates according to host factors. *Infect. Gen. Evol.* 11(5):1129-35, ISSN 1567-1348, <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.04.011>.
- Kendall, G., Wilderspin, A.F., Ashall, F., Miles, M.A., Kelly, J.M., (1990) *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase does not conform to the 'hotspot' topogenic signal model. *Eur. Mol. Biol. Org. J.* (9) 2751–2758.
- Kelly, S., Ivens, A., Manna, P.T., Gibson, W., Field, M. C. (2014) A draft genome for the African crocodilian trypanosome *Trypanosoma grayi*. *Sci. Data* 1:140024 doi: 10.1038/sdata.2014.24
- Kingman JFC. (1982) The coalescent. *Stoch Proc Appl*, (13) 235-248.
- Koop, J.A.H., De Matteo, K.E., Parker, P.G. & Whiteman, N.K. (2014) Birds are islands for parasites. *Biology Letters* (10) 20140255.
- Kunz, W. (2002) When is a parasite species a species? *Trends Parasitol.* (18): 121–124.
- Lainson, R. (1977) *Trypanosoma cecili* n. sp. a parasite of the South American cayman, *Caiman crocodilus crocodilus* (Linnaeus, 1758) (*Crocodylia: alligatoridae*). *Proc Natl Acad Sci USA*. 3: 87-93.
- Leblois, R., Kuhls, K., François, O., Schöni, G., Wirth, T., (2011) Guns, germs and dogs: On the origin of *Leishmania chagasi*. *Inf Gen Evol*, 11(5): 1091-1095, doi: 10.1016/j.meegid.2011.04.004.
- Le Gac, M, Giraud, T. (2004) What is sympatric speciation in parasites? *Trends Parasitol.* 20(5):207-208.

- Leigh, J. W., Bryant, D. (2015), POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol. Evol.*, 6(9): 1110–1116.
- Lewis M.D., Llewellyn M.S., Yeo M., Acosta N., Gaunt M.W., Miles M.A. (2011) Recent, Independent and Anthropogenic Origins of *Trypanosoma cruzi* Hybrids. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5(10): e1363. doi:10.1371/journal.pntd.0001363.
- Librado, P., Rozas, J. (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* (25): 1451-1452.
- Lima, L., Silva, F.M., Neves, L., Attias, M., Takata, C.S., Campaner, M., de Souza, W., Hamilton, P.B., Teixeira, M.M.G. (2012) Evolutionary insights from bat trypanosomes: morphological, developmental and phylogenetic evidence of a new species, *Trypanosoma (Schizotrypanum) erneyi* sp. nov., in African bats closely related to *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and allied species. *Protist.* (163): 856–872.
- Lima, L., Espinosa-Álvarez, O., Hamilton, P. B., Neves, L., Takata, C. S., Campaner, M., Attias, M., Souza, W., Camargo, E.P., Teixeira, M. M. (2013). *Trypanosoma livingstonei*: a new species from African bats supports the bat-seeding hypothesis for the *Trypanosoma cruzi* clade. *Parasit. Vectors*, 6, 221. doi: 10.1186/1756-3305-6-221.
- Lima, L., Espinosa-Álvarez, O., Pinto, C.M., Cavazzana Jr., Pavan, A.C., Carranza, J.C., Lim, B.K, Campaner, M., Takata, C.S.A, Camargo, E.P., Hamilton, P.B, Teixeira, M.M.G. (2015a) New insights into the evolution of the *Trypanosoma cruzi* clade provided by a new trypanosome species tightly linked to Neotropical *Pteronotus* bats and related to an Australian lineage of trypanosomes. *Parasit Vectors*, 8:657. doi: 10.1186/s13071-015-1255-x.
- Lima, L., Espinosa-Álvarez, O., Ortiz, P.A., Trejo-Varón, J.A., Carranza, J.C., Pinto, C.M., Camargo, E.P, Teixeira, M.M.G. (2015b) Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit) *Acta Tropica* <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.015>.

- Lopes, IF., Miño, CI., & Del Lama, SN.. (2007). Genetic diversity and evidence of recent demographic expansion in waterbird populations from the Brazilian Pantanal. *Brazilian Journal of Biology*, 67(4, Suppl.), 849-857.
- Llewellyn, M. S., Miles, M. A., Carrasco, H. J., Lewis, M. D., Yeo, M., Vargas, J., Torrico, F., Diosque, P., Valente, V., Valente, S.A., Gaunt, M. W. (2009a). Genome-Scale Multilocus Microsatellite Typing of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Unit I Reveals Phylogeographic Structure and Specific Genotypes Linked to Human Infection. *PLoS Path.*, 5(5), e1000410. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000410>.
- Llewellyn, M. S., Lewis, M. D., Acosta, N., Yeo, M., Carrasco, H. J., Segovia, M., Vargas, J., Torrico, F., Miles, M.A., Gaunt, M. W. (2009b). *Trypanosoma cruzi* Ilc: Phylogenetic and Phylogeographic Insights from Sequence and Microsatellite Analysis and Potential Impact on Emergent Chagas Disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3(9), e510. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000510>.
- Llewellyn, M. S., Lewis, M. D., Acosta, N., Yeo, M., Carrasco, H. J., Segovia, M., Vargas, J., Torrico, F., Miles, M.A., Gaunt, M. W. (2009c). *Trypanosoma cruzi* Ilc: Phylogenetic and Phylogeographic Insights from Sequence and Microsatellite Analysis and Potential Impact on Emergent Chagas Disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3(9), e510. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000510>.
- Llewellyn, M. S., Rivett-Carnac, J. B., Fitzpatrick, S., Lewis, M. D., Yeo, M., Gaunt, M. W., & Miles, M. A. (2011). Extraordinary *Trypanosoma cruzi* diversity within single mammalian reservoir hosts implies a mechanism of diversifying selection. *Int. J. Parasitol.*, 41(6-10), 609–614. <http://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.12.004>
- Machado, C.A., Ayala, F.J. (2001) Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci* (98): 7396-7401.
- Metcalf, J.L., Turney, C., Barnett, R., Martin, F., Bray, S.C., Vilstrup, J.T. et al., (2016) Synergistic roles of climate warming and human occupation in

- Patagonian megafaunal extinctions during the Last Deglaciation. *Sci. Adv.*, 2: e1501682.
- McCoy, K.D. (2003) Sympatric speciation in parasites – what is sympatry? *Trends Parasitol.* (19):400–404.
- McCoy, K.D. (2004) Response to Le Gac and Giraud: questioning is a good start. *Trends Parasitol.* 29(5): 208-209.
- McGlue, M.M., Silva, A., Zani, H., Corradini, F.A., Parolin, M., Abel, E.J., Cohen, A.S., Assine, M.L., Ellis, G.S., Trees, M.A., Kuerten, S., Gradella, F.S., Rasbold, G.G. (2012) Lacustrine records of Holocene flood pulse dynamics in the Upper Paraguay River watershed (Pantanal wetlands, Brazil). *Quat Res* 78(2):285–294.
- Maia da Silva, F., Noyes, H., Campaner, M., Junqueira, A.C., Coura, J.R., Añez, N. (2004a) Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology*; 129(5):549-61.
- Maia da Silva, F., Rodrigues, A.C., Campaner, M., Takata, C.S.A., Brigido, M.C., Junqueira, A.C.V., Coura, J.R., Takefa, G.F., Shaw, J.J., Teixeira, M.M.G. (2004b). Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma rangeli* and allied species from human, monkeys and other sylvatic mammals of the Brazilian Amazon disclosed a new group and a species-specific marker. *Parasitology*. 128:283–94.
- Maia da Silva, F., Junqueira, A. C., Campaner, M., Rodrigues, A. C., Crisante, G., Ramirez, L. E., Caballero, Z. C., Monteiro, F. A., Coura, J. R., Añez, N., Teixeira, M. M. G. (2007) Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. *Mol Ecol.* 16: 3361-73.
- Maia da Silva, F., Marcili A., Ortiz, P.A., Epiphanyo S., Campaner, M., Catão-Dias, J.L., Shaw, J.J., Camargo, E.P., Teixeira, M.M.G. (2010) Phylogenetic, morphological and behavioural analyses support host switching of

Trypanosoma (Herpetosoma) lewisi from domestic rats to primates. *Infect Genet Evol.*10:522-529.

- Manni, F., Guerard, E. & Heyer, E. (2004) Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: how barriers can be detected by using Monmonier's algorithm. *Human Biology*, 76, 173–190.
- Marcili, A. (2008) *Trypanosoma cruzi: diversidade, relações filogenéticas e padrões ecogeográficos de isolados silvestres* [Tesis de doctorado]. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Brasil.
- Marcili, A., Valente, V.C., Valente, S.A., Junqueira, A.C., da Silva, F.M., Pinto, A.Y., Naiff, R.D., Campaner M, Coura JR, Camargo EP, Miles MA, Teixeira MM. (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. *Int J Parasitol.* 39 (5):615-23.
- Marcili, A., Lima, L., Cavazzana, M., Junqueira, A.C., Veludo, H.H., Maia Da Silva, F., Campaner, M., Paiva, F., Nunes, V.L., Teixeira, M.M. (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- 55.
- Marcili, A., Lima, L., Valente, V.C., Valente, S.A., Batista, J.S., Junqueira, A.C., Souza, A.I., da Rosa, J.A., Campaner, M., Lewis, M.D., Llewellyn, M.S., Miles, M.A., Teixeira, M.M. (2009c). Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIIc: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. *Infect Genet Evol.* 9(6):1265-74.
- Marcili, A., Sperança, M, da Costa, A.P., Madeira, M.F., Soares, H.S., Sanches, C.O., Acosta, I.C.L, Giroto, A., Minervino, A.H.H., Horta, M.C., Shaw, J.J., Gennari, S.M. (2014) Phylogenetic relationships of Leishmania species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of Leishmania (L.) infantum chagasi in South America. *Infect. Genet. Evol.* (25): 44–51.
- Maslov, D.A., Simpson, L. (1995) Evolution of parasitism in kinetoplastid protozoa. *Parasitol Today*; 11(1):1995.

- Mayr, E. (1942) Systematics and the origin of species, from the viewpoint of a zoologist. Cambridge (MA): Harvard University Press.
- Mehlhorn, H. (Ed.) (2008) *Encyclopedia of Parasitology*. Vol. 1-2. Heidelberg, New York. Springer 978-3-540-48994-8. doi: 10.1007/978-3-540-48996-2.
- Mendonça, M.B., Nehme, N.S., Santos, S.S., Cupolillo, E., Vargas, N., Junqueira, A., Naiff, R.D., Barrett, T.V., Coura, J.R., Zingales, B., Fernandes, O., (2002) Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 are defined by distinct regions of the ribosomal RNA cistron. *Parasitology*. 124 (2): 177-84.
- Messenger, L.A., Garcia, L., Vanhove, M., Huaranca, C., Bustamante, M., Torrico, M., Torrico, F., Miles, M.A., Llewellyn, M.S. (2015) Ecological host fitting of *Trypanosoma cruzi* TcI in Bolivia: mosaic population structure, hybridization and a role for humans in Andean parasite dispersal. *Mol. Ecol.* 24(10): 2406-2422.
- Misof, B., et al. (2014) Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science*. 346 (6210): 763–767.
- Monmonier, M. (1973) Maximum-difference barriers: An alternative numerical regionalization method. *Geogr. Anal.* 3:245–261.
- Nadler, S.A. (1995) Microevolution and the genetic structure of parasite populations. *J. Parasitol.* (81):395–403.
- Naveda, A., de Thoisy, B., Richard-Hansen, C., Torres, D.A., Salas, L., Wallance, R., Chalukian, S., de Bustos, S. (2008) *Tapirus terrestris*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T21474A9285933. Downloaded on November 2016.
- Nicholas, K.B., Nicholas, H.B., Jr., Deerfield, D.W. II. (1997) GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. *EMBNEW NEWS* 4:14.
- Njagu, Z., Mihok, S., Kokwaro, E., Verloo, D., (1999) Isolation of *Trypanosoma brucei* from the monitor lizard (*Varanus niloticus*) in an endemic focus of Rhodesian sleeping sickness in Kenya. *Acta Trop.* 72: 137–148.
- Noor, M.A.F. (2002) Is the biological species concept showing its age? *Trends Ecol. Evol.* 17, 153–154.

- Oaks, J.R. (2011) A time-calibrated species tree of Crocodylia reveals a recent radiation of the true crocodiles. *Evolution*. 65: 3285-3297. 10.1111/j.1558-5646.2011.01373.x.
- Oberle, M., Balmer, O., Brun, R., Roditi, I. (2010) Bottlenecks and the Maintenance of Minor Genotypes during the Life Cycle of *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathog* 6(7): e1001023. doi:10.1371/journal.ppat.1001023
- O'Fallon, B.D., Fehren-Schmitz, L. (2011) Native Americans experienced a strong population bottleneck coincident with European contact *PNAS* 108(51):20444-20448, doi:10.1073/pnas.1112563108
- Pinho, G.M., Gonçalves da Silva, A., Hrbek, T., Venticinque, E.M., Farias, I.P. (2014) Kinship and Social Behavior of Lowland Tapirs (*Tapirus terrestris*) in a Central Amazon Landscape. *PLoS ONE* 9(3): e92507. doi:10.1371/journal.pone.0092507.
- Prates, I., Rivera, D., Rodrigues, M.T., Carnaval, A.C. (2016) A mid-Pleistocene rainforest corridor enabled synchronous invasions of the Atlantic Forest by Amazonian anole lizards. *Mol Ecol*, 25: 5174–5186. doi:10.1111/mec.13821
- Price, P.W. (1977) General Concepts on the Evolutionary Biology of Parasites. *Evolution*, Vol. 31, No. 2 pp. 405-420.
- Price, P.W. (1980) *Evolutionary biology of parasites*, Princeton, NJ: Princeton University Press., p.256-ss.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- Prothero, D., Schoch, R. (1989) *The evolution of perissodactyls*. New York, Oxford University Press.
- Pyana, P.P., Sere, M., Kaboré, J., de Meeûs, T., MacLeod, A., Bucheton, B., Van Reet, N., Büscher, P., Belem, A.M.G., Jamonneau, V. (2015) Population genetics of *Trypanosoma brucei gambiense* in sleeping sickness patients with treatment failures in the focus of Mbuji-Mayi, Democratic Republic of the Congo, *Inf. Gen. Evol.*(30):128-133 ISSN 1567-1348, <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.12.017>.

- R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Disponible en <http://www.R-project.org>.
- Rambaut, A. (2014) FigTree v.1.4.2 Tree Figure Drawing Tool. Disponible en <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Rambaut, A., Suchard, M.A., Xie, D., Drummond, A.J. (2014) Tracer v1.6. Disponible en <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Ramírez, J.D., Guhl, F., Messenger, L.A., Lewis M.D., Montilla, M., Cucunuba, Z., Miles, M., Llewellyn, M.S. (2013) Contemporary cryptic sexuality in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Ecol.* 21(17): 4216-4226.
- Ramirez, J.D., Llewellyn, M.S. (2014) Reproductive clonality in protozoan pathogens—truth or artefact? *Mol. Ecol.*, (23) 4195–4202.
- Ramirez, J.D., Llewellyn, M.S. (2015) Response to Tibayrenc and Ayala: reproductive clonality in protozoan pathogens – truth or artefact? *Mol. Ecol.* 24(23): 5782–5784.
- Ramos-Fregonezi, A.M.C., Fregonezi, J.N., Cybis, G.B., Fagundes, N.J.R., Bonatto, S.L., Freitas, L.B. (2015) Were sea level changes during the Pleistocene in the South Atlantic Coastal Plain a driver of speciation in *Petunia* (Solanaceae)? *BMC Evol Biol.* 15: 92.
- Rich, S.M., Licht, M.C., Hudson, R.R., Ayala, F.J. (1998) Malaria's Eve: Evidence of a recent population bottleneck throughout the world populations of *Plasmodium falciparum* PNAS, 95 (8): 4425–4430.
- Richardson, J.L., Urban, M.C., Bolnick, D.I., Skelly, D.K. (2014) Microgeographic adaptation and the spatial scale of evolution. *Trends Ecol. Evol.* 29(3):165-176.
- Rissler, L.J. (2016) Union of phylogeography and landscape genetics. PNAS, 113(29): 8079–8086, doi: 10.1073/pnas.1601073113.
- Rodrigues, A.C., Paiva, F., Campaner, M., Stevens, J.R., Noyes, H.A., Teixeira, M.M. (2006) Phylogeny of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts

- diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology*; 132(Pt 2):215-24.
- Rodrigues, A.C., Garcia, H.A., Ortiz, P.A., Cortez, A.P., Martinkovic, F., Paiva, F., Batista, J.S., Minervino, A.H., Campaner, M., Pral, E.M., Alfieri, S.C., Teixeira, M.M.G. (2010) Cysteine proteases of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: cathepsin L-like gene sequences as targets for phylogenetic analysis, genotyping diagnosis. *Parasitol International* 59:318–325.
- Roos, J., R. K. Aggarwal, and A. Janke, 2007. Extended mitogenomic phylogenetic analyses yield new insight into crocodylian evolution and their survival of the Cretaceous-Tertiary boundary. *Mol. Phylogenet. Evol.* 45:663–673.
- Rose, K.D., Holbrook, L.T., Rana, R.S., Kumar, K., Jones, K.E., Ahrens, H.E., Missiaen, P., Sahni, A., Smith, T. (2014) Early Eocene fossils suggest that the mammalian order *Perissodactyla* originated in India. *Nature Comm.* (5) 5570, doi: 10.1038/ncomms6570.
- Rosenberg, N.A. (2004) DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 4: 137-138.
- Ruíz-García, M., Vásquez, C., Sandoval, S., Kaston, F., Luengas-Villamil, K., Shostell, J. M. (2016) Phylogeography and spatial structure of the lowland tapir (*Tapirus terrestris*, *Perissodactyla: Tapiridae*) in South America. *Mit. DNA* 27(4):2334-42.
- Rull, V. (2011) Neotropical biodiversity: timing and potential drivers. *Trends Ecol Evol*, 26(10): 508-513.
- Sambrook, J., Russell, D.W., (2001), 'Molecular cloning. A laboratory manual'. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santos, S.S., Cupolillo, E., Junqueira, A., Coura, J.R., Jansen, A., Sturm, N.R., et al., 2002. The genetic diversity of brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates and the phylogenetic positioning of zymodeme 3, based on the internal transcribed spacer of the ribosomal gene. *Ann Trop Med Parasit.* 96 (8): 755-64.1

- Sarataphan, N., Vongpakorn, M., Nuansrichay, B., Autarkool, N., Keowkarnkah, T., Rodtian, P., Stich, R. W., Jittapalapong, S. (2007) Diagnosis of a *Trypanosoma lewisi-like* (*Herpetosoma*) infection in a sick infant from Thailand. J. Med. Micro. (56): 1118-21.
- Shapiro, B.J., Leducq, J.B., Mallet, J. (2016) What Is Speciation? PLoS Genet 12(3): e1005860. doi:10.1371/journal.pgen.1005860
- Simpson, A.G.B., Lukes, J., Roger, A.J. (2002). The evolutionary history of kinetoplastids and their kinetoplasts. Mol Biol Evol; 19:2071–83.
- Sistrom, M., Evans, B., Benoit, J., Balmer, O., Aksoy S., Caccone A. (2016) De Novo Genome Assembly Shows Genome Wide Similarity between *Trypanosoma brucei brucei* and *Trypanosoma brucei rhodesiense*. PLoS ONE 11(2): e0147660. doi:10.1371/journal.pone.0147660.
- Smith, B.T., McCormack, J.E., Cuervo, A.M., Hickerson, M.J., Aleixo, A., Cadena, C.D., et al., (2014) The drivers of tropical speciation. Nature, 515: 406-409.
- Sogin, M.L., Ingold, A., Karlok, M., Nielsen, H., Engberg, J., (1986) Phylogenetic evidence for the acquisition of ribosomal RNA introns subsequent to the divergence of some of the major *Tetrahymena* groups. EMBO J. 5 13: 3625-30.
- Souto, R.P., Fernandes, O., Macedo, A.M., Campbell, D.A., Zingales, B. (1996) DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 83(2):141-52.
- Steiner, C.C., Ryder, O.A. (2011) Molecular phylogeny and evolution of the *Perissodactyla*. Zool. J Linn. Soc., (163): 1289–1303. doi:10.1111/j.1096-3642.2011.00752.x
- Stephens, M., Smith, N.J., Donnelly, P. (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. Am. J. Hum. Genet., 68, 978–989.
- Stevens, J.R., Gibson, W.C. The molecular evolution of trypanosomes (1999a) Parasitol. Today. 15 (11):432-7.
- Stevens, J.R., Gibson, W.C. The evolution of pathogenic trypanosomes (1999b) Cad. Saude Pub. 15(4):673-84.

- Stevens, J.R., Noyes, H.A., Schofield, C.J., Gibson, W. (2001) The molecular evolution of *Trypanosomatidae*. *Adv. Parasit.*; (48):1-56.
- Tibayrenc, M., Ayala, F.J. (2002) The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *Trends Parasitol.* 18(9): 405-410.
- Tibayrenc, M., Ayala, F.J. (2013) How clonal are *Trypanosoma* and *Leishmania*? *29(6)*: 264-269.
- Tibayrenc, M., Ayala, F.J. (2015) Reproductive clonality in protozoan pathogens—truth or artifact? A comment on Ramírez and Llewellyn *Mol. Ecol.* (24):5778–5781.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. (1997) The clustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* (25): 4876-4882.
- Van den Bossche, P., De La Rocque, S., Hendrickx, G., Bouyer, J. (2010) A changing environment and the epidemiology of tsetse-transmitted livestock trypanosomiasis. *Trends Parasitol.* (26):236-243.
- Van Strien, N.J., Manullang, B., Sectionov, Isnani, W., Khan, M.K.M, Sumardja, E., Ellis, S., Han, K.H., Boeadi, Payne, J. & Bradley Martin, E. (2008) *Dicerorhinus sumatrensis*. The IUCN Red List of Threatened Species: e.T6553A12787457.
- Vickerman, K. (1976) The diversity of the kinetoplastid flagellates. In: Lumsden, W.H.R., Evans, D.A. (Ed.) *Biology of the kinetoplastida*. New York: Academic Press p. 1-34.
- Vickerman, K. (1994) The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *Int J Parasitol*; 24(8):1317-31.
- Viola, L. B., Almeida, R. S., Ferreira, R. C., Campaner, M., Takata, C. S., Rodrigues, A. C., Paiva, F., Camargo, E. P., Teixeira, M. M. G. (2009a) Evolutionary history of trypanosomes from South American caiman (*Caiman yacare*) and African crocodiles inferred by phylogenetic analyses using SSU rRNA and gGAPDH genes. *Parasitol.* (136):55-65.

- Viola, L. B., Attias, M., Takata, C. S., Campaner, M., De Souza, W., Camargo, E. P., Teixeira, M. M. G. (2009b) Phylogenetic analyses based on small subunit rRNA and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes and ultrastructural characterization of two snake trypanosomes: *Trypanosoma serpentis* n. sp. from *Pseudoboa nigra* and *Trypanosoma cascavelli* from *Crotalus durissus terrificus*. J. Euk. Microb. (56) 594-602.
- Votypka, J., Oborník, M., Volf, P., Svobodová, M., Lukes, J. (2002) *Trypanosoma avium* of raptors (Falconiformes): phylogeny and identification of vectors. Parasitol. 125(3): 253-263.
- Votypka, J., Szabová, J., Rádrová, J., Zídková, L., Svobodová, M. (2012) *Trypanosoma culicavium* sp. nov., an avian trypanosome transmitted by *Culex* mosquitoes. Int. J. Sys. Evol. Micr. (62) 745-754.
- Wallace, F.G. (1966) The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. Exp. Parasitol. (18):124-93.
- Weigelt, P., Steinbauer, M.J., Cabral, J.S., Kreft, H. (2016) Late Quaternary climate change shapes island biodiversity. Nature 532: 99–102.
- Weinman, D. (1972) *Trypanosoma cyclops* n. sp.: A pigmented trypanosome from the Malaysian primates *Macaca nemestrina* and *M. ira*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. (66):628-636.
- Weinstein, S.B., Kuris, A.M. (2016) Independent origins of parasitism in Animalia. Biol. Lett. (12) 20160324.
- Wilson, D.E., Reeder, D.A. (2005) Mammals species of the world: a taxonomic and geographic reference. 3th. Ed. Baltimore. The Johns Hopkins University Press ISBN 0-80188221-4.
- Whitney, B.S., Mayle, F.E., Punyasena, S.W., Fitzpatrick, K.A., Burn, M.J., Guillen, R., Chavez, E., Mann, D., Pennington, R.T., Metcalfe, S.E. (2011) A 45kyr palaeoclimate record from the lowland interior of tropical South America. Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol, 307(1–4):177–192
- Yang, Z. (2006) Computational molecular evolution. Oxford, UK. Oxford Univ. Press.

- Yang, Z., Donoghue, P.C. J. (2016) Dating species divergences using rocks and clocks *Phil. Trans. R. Soc. B* 37120150126; doi: 10.1098/rstb.2015.0126
- Zarza, E., Faircloth, B.C, Tsai, WLE, Brynson Jr., R.W., Klicka, J., McCormack, J.E. (2016) Hidden histories of gene flow in highland birds revealed with genomic markers. *Mol. Ecol.* In Press. doi: 10.1111/mec.13813.

ANEXOS

Anexo A. Haplotipos de ITS1 con sus CBTs asociados, considerando únicamente los sitios polimórficos.

**Número de sitios
polimórficos**

Hap	CBT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	
H1	46 60 61	G	C	G	G	G	A	A	A	A	A	A	A	C	G	A	C	C	T	C	A	G	T	T	A	T	C	G	G	A	A	T	A	
H2	101	.	G	.	.	.	G	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	T
H3	102 192	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A	.
H4	*	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A	T
H5	141	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H6	189	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	T
H7	190 104 109	.	G	.	.	.	G	.	.	.	.	.	C	.	C	.	.	.	C	G	T	.	.	A	.	C	.	.	.	.	T	.	.	
H8	191	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	.	C	C	.	.	.	.	.	A	.	C	.	G	T	.	.	.	.	.	.	
H9	94 97 98	A	A	.	A	A	G	C	C	C	C	C	C	A	C	C	.	G	.	A	T	A	A	A	T	C	G	T	A	.	T	C	.	
H10	142 143	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A	T
H11	134 135	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	.	C	C	T	A	C	.	.	.	.	.	C	C	G	.	.	T	T	A	.	
H12	188	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	A	C	.	.	.	C	.	.	A	.	A	.	C	.	.	.	.	T	.	.	
H13	103	.	G	T	.	.	G	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	T

*CBTs de H4: 133 167 181 140 198 164 199 165 180 200.

Anexo B. Tasas mutacionales empleadas en la reconstrucción demográfica.

Marcador	Tasa de mutación (sus/sitio/ma)	95% HPD (sus/sitio/ma)
ITS1	1.74×10^{-2}	$2.65 \times 10^{-2} \pm 9.30 \times 10^{-3}$
gGAPDH	3.425×10^{-4}	$5.239 \times 10^{-4} \pm 5.62 \times 10^{-5}$
V7V8 18S rDNA	2.66×10^{-4}	$6.55 \times 10^{-4} \pm 7.968 \times 10^{-5}$

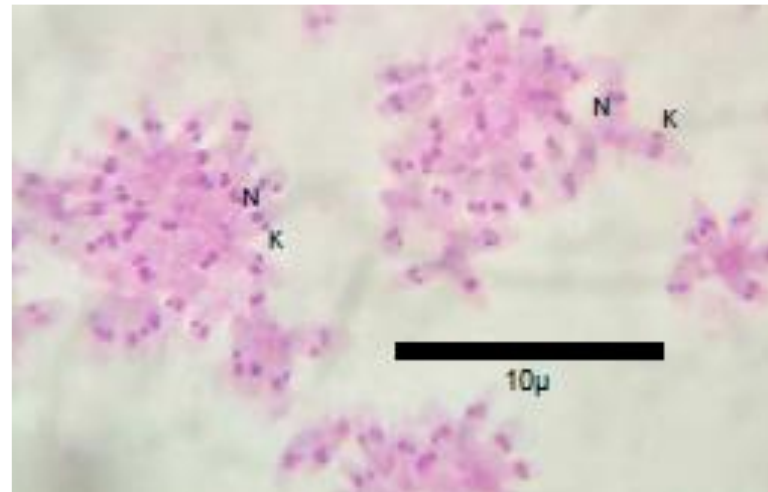
Varias réplicas independientes de 20-40, 000,000 de generaciones de MCMC fueron realizadas para cada marcador, empleando bModelTest como estrategia para encontrar los modelos de sustitución de DNA. La edad del nodo para los aislados de *T. terrestris* fue calculada con base en el origen de *Tapirus terrestris* en Sudamérica [distribución Normal (3 ma, σ 0.2ma)]. 95% HPD (*Highest Posterior Density*), es el equivalente a los intervalos de confianza en modelos bayesianos. Las unidades están en sustituciones/sitio/millón de años.

Anexo C. Resultados de los análisis de varianza molecular (AMOVAs) bajo los dos diferentes esquemas de agrupamiento.

Estrategia de agrupamiento	Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	% Variación	Índice de Fijación	valor-p
Pantanal +Mata Atlántica	Entre poblaciones	1	9.923	17.14	F _{ST} : 0.171	p> 0.049
	Dentro de poblaciones	29	135.659	82.86		
	Total	30				
(Pantanal +Mata Atlántica)+(H9)	Entre poblaciones	1	65.719	80.84	F _{ST} : 0.808	p< 0.0001
	Dentro de poblaciones	29	79.863	19.16		
	Total	30				

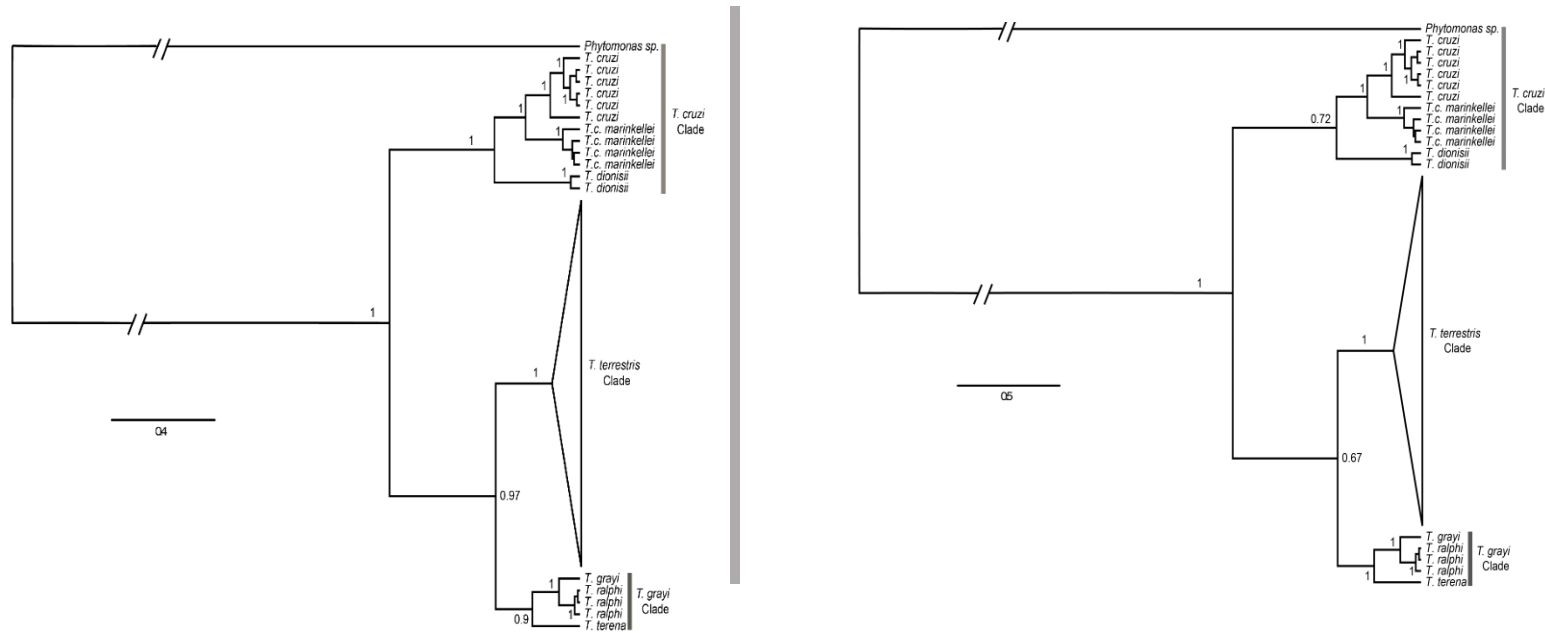
El nivel de significancia α para todas las permutaciones realizadas fue de 0.01. Los valores-p permanecieron significativos después de ajustarlos.

Anexo D. Fotomicrografía de epimastigotes en formas de cultivo (CBT199) teñidos con Giemsa, mostrando el agrupamiento en roseta distintivo de *T. terrestris*, derivados de la fase logarítmica tras once días de crecimiento en medio LIT (K: kinetoplasto, N: núcleo).



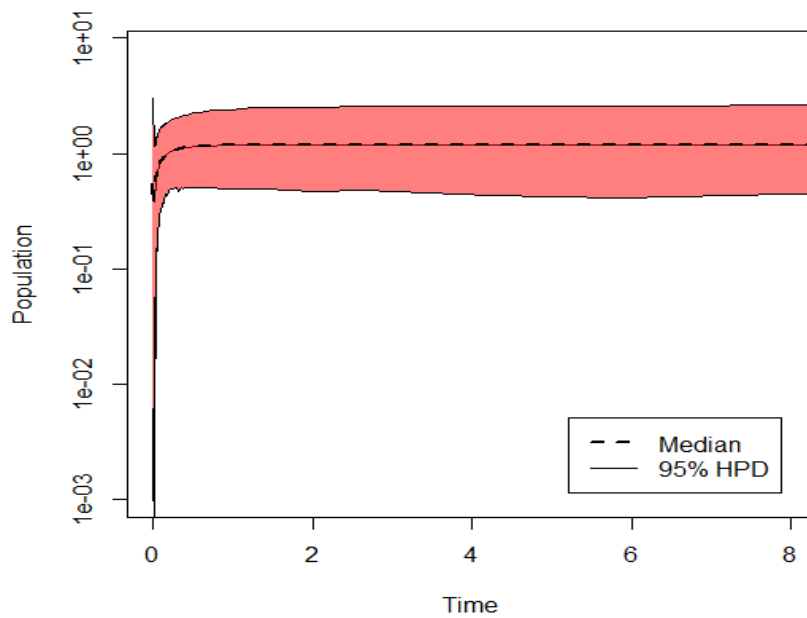
Fuente: autor

Anexo E. Árboles de genes gGAPDH (derecha) y V7V8 SSU rDNA (izquierda) inferidos en el análisis *BEAST. En ambos casos los valores de divergencia para los aislados del clado T. terrestres son altos (PP= 1) así como los valores de probabilidad posterior que soportan a los clados hermanos T.grayi/T.terrestris.



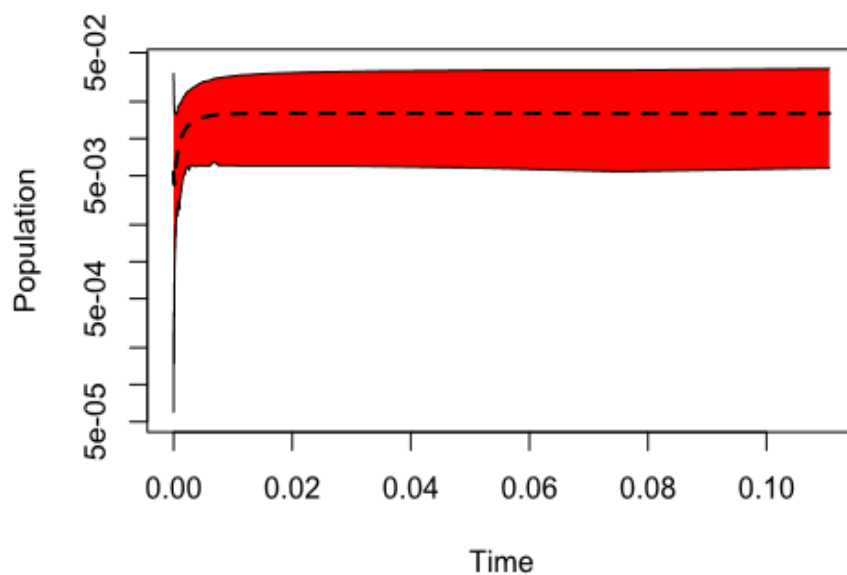
Fuente: autor

Anexo F. Diagrama de horizonte bayesiano extendido (EBSP) sin los CBTs 94-97-98 con la representación del 95% de los intervalos de la probabilidad posterior (HPD) para el tamaño poblacional de los aislados de *T. terrestris*. Las tendencias demográficas ilustran el mismo declive en los aislados de *T. terrestris* ~100mil años A.P., proveyendo evidencia de que las tendencias demográficas no están influidas por estructura genética. El tiempo está en millones de años antes del presente y los tamaños poblacionales están en escala logarítmica.



Fuente: autor

Anexo G. EBSP con la distribución posterior de las tendencias demográficas de los aislados de *T. terrestris* en ausencia de información temporal. El eje 'x' está en tasas mutacionales (sustituciones/sitio) y el eje 'y' corresponde al tamaño poblacional * tasa mutacional (en escala logarítmica).



Fuente: autor

	SISTEMA DE GESTION DE LA CALIDAD FORMATO DE AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	Página 1 de 3
		Código: GB-P04-F03
		Versión: 02

Los suscritos:

_____	con C.C N°	_____
_____	con C.C N°	_____
_____	con C.C N°	_____
_____	con C.C N°	_____
_____	con C.C N°	_____

Manifiesto (an) la voluntad de:

Autorizar ☒

No Autorizar ☐ Motivo: _____

La consulta en físico y la virtualización de mi OBRA, con el fin de incluirlo en el repositorio institucional de la Universidad del Tolima. Esta autorización se hace sin ánimo de lucro, con fines académicos y no implica una cesión de derechos patrimoniales de autor.

Manifestamos que se trata de una OBRA original y como de la autoría de LA OBRA y en relación a la misma, declara que la UNIVERSIDAD DEL TOLIMA, se encuentra, en todo caso, libre de todo tipo de responsabilidad, sea civil, administrativa o penal (incluido el reclamo por plagio).

Por su parte la UNIVERSIDAD DEL TOLIMA se compromete a imponer las medidas necesarias que garanticen la conservación y custodia de la obra tanto en espacios físico como virtual, ajustándose para dicho fin a las normas fijadas en el Reglamento de Propiedad Intelectual de la Universidad, en la Ley 23 de 1982 y demás normas concordantes.

La publicación de:

Trabajo de grado	☒	Artículo	☐	Proyecto de Investigación	☐
Libro	☐	Parte de libro	☐	Documento de conferencia	☐
Patente	☐	Informe técnico	☐		
Otro: (fotografía, mapa, radiografía, película, video, entre otros)					☐

Fecha Versión 02: 04-11-2016

	SISTEMA DE GESTION DE LA CALIDAD FORMATO DE AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	Página 2 de 3
		Código: GB-P04-F03
		Versión: 02

Producto de la actividad académica/científica/cultural en la Universidad del Tolima, para que con fines académicos e investigativos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad del Tolima. Con todo, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada con arreglo al artículo 30 de la Ley 23 de 1982. En concordancia suscribo este documento en el momento mismo que hago entrega del trabajo final a la Biblioteca Rafael Parga Cortes de la Universidad del Tolima.

De conformidad con lo establecido en la Ley 23 de 1982 en los artículos 30 “...*Derechos Morales. El autor tendrá sobre su obra un derecho perpetuo, inalienable e irrenunciable*” y 37 “...*Es lícita la reproducción por cualquier medio, de una obra literaria o científica, ordenada u obtenida por el interesado en un solo ejemplar para su uso privado y sin fines de lucro*”. El artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, “*los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores*” y en su artículo 61 de la Constitución Política de Colombia.

- Identificación del documento:

Título completo:

- “FILOGENIA MOLECULAR, HISTORIA DEMOGRÁFICA Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE NUEVAS CEPAS DE *Trypanosoma terrestris* AISLADAS DE *Tapirus terrestris* EN LOS BIOMAS BRASILEÑOS DE PANTANAL Y MATA ATLÁNTICA”
- Trabajo de grado presentado para optar al título de:

BIÓLOGO

- Proyecto de Investigación correspondiente al Programa (No diligenciar si es opción de grado “Trabajo de Grado”):

- Informe Técnico correspondiente al Programa (No diligenciar si es opción de grado “Trabajo de Grado”):

- Artículo publicado en revista:

- Capítulo publicado en libro:

- Conferencia a la que se presentó:

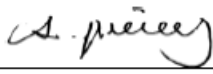
Fecha Versión 02: 04-11-2016

	SISTEMA DE GESTION DE LA CALIDAD FORMATO DE AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	Página 3 de 3
		Código: GB-P04-F03
		Versión: 02

Quienes a continuación autentican con su firma la autorización para la digitalización e inclusión en el repositorio digital de la Universidad del Tolima, el:

Día: 10 Mes: MARZO Año: 2017

Autores: Firma

Nombre:	SERGIO DANIEL PÉREZ PRECIADO		1 110 524 234
	C.C.		
Nombre:			C.C.
Nombre:			C.C.
Nombre:			C.C.

El autor y/o autores certifican que conocen las derivadas jurídicas que se generan en aplicación de los principios del derecho de autor.

Fecha Versión 02: 04-11-2016