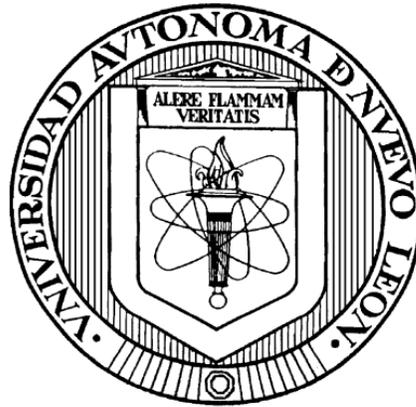


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**PRESENCIA DE MICROORGANISMOS EUCARIOTAS EN MUESTRAS
SANGUÍNEAS DE OSO NEGRO (*Ursus americanus*) EN EL NORESTE DE
MÉXICO**

POR

KARINA FLORES MARTÍNEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

OCTUBRE, 2019

UNIVERSIDA AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



PRESENCIA DE MICROORGANISMOS EUCARIOTAS EN SANGRE DE OSO
NEGRO (*Ursus americanus*) EN EL NORESTE DE MÉXICO

Aprobación de tesis por el comité particular de

Karina Flores Martínez

Dirección de Tesis



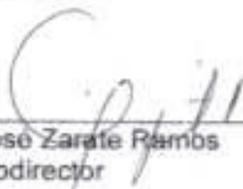
Dra. Karina Wendoline Vázquez Cisneros
Directora



Dr. Rogelio Carrera Treviño
Codirector



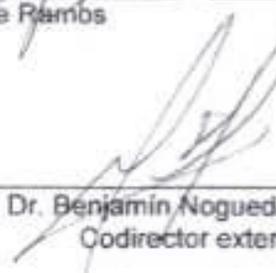
Dra. Sibilina Cedillo Rosales
Codirector



Dr. Juan José Zarate Ramos
Codirector



M.C. Armando Trejo Chávez
Codirector



Dr. Benjamín Noguera Torres
Codirector externo

AGRADECIMIENTOS

Agradecer primeramente a Dios por acompañarme en mis estudios.

Quiero agradecer a la confianza brindada de mi asesora Dra. Karina Wendoline Vázquez Cisneros en el desarrollo y término de este estudio.

A mi comité tutorial por su comprensión y paciencia, en especial a la Dra. Sibilina Cedillo Rosales por su tiempo y apoyo brindado en el proceso de redacción de la tesis.

Agradezco de manera especial al Dr. Rogelio Carrera Treviño y a los integrantes del Laboratorio de Fauna Silvestre de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL por el apoyo brindado en la obtención de las muestras remitidas para la realización este estudio. Deseando lo mejor para cada uno en su vida profesional.

Al Dr. Rafael Ramírez Romero, así como a la Dra. Cecilia Ramírez Hernández por las facilidades otorgadas para el procesamiento de las muestras sanguíneas.

Quiero agradecer a la Dra. Guiehdani Villalobos Castillejos y Dr. Fernando Martínez Hernández del Departamento de Ecología de Agentes Patógenos del Hospital General, Dr. Manuel Gea González, de la Cd. de México por su paciencia en el desarrollo de la presente investigación.

De la misma manera, al Dr. Etienne Jean Guy Waleckx del Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi de la Universidad Autónoma de Yucatán por su apoyo durante este estudio.

Agradezco a la MC. María Berenit Mendoza Garfias, LMF1, LANABIO del Instituto de Biología de la UNAM por el apoyo brindado en la observación de las muestras del presente estudio.

Agradezco a la Dra. Rosalía Lira Carmona de la Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE), Hospital de Pediatría, CMN Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

Al Dr. Emilio Olivares Sáenz por su orientación brindada en el estudio Estadístico de los resultados obtenidos.

A CONACYT por el apoyo brindado durante el tiempo de toda investigación.

DEDICATORIA

Para mi amado Esposo Armando Trejo Chávez.

Para mis hermosas madres que tanto quiero y respeto Esther Costa Espinosa y
Rafaela Flores Martínez.

ÍNDICE

<i>AGRADECIMIENTOS</i>	3
<i>DEDICATORIA</i>	5
<i>ÍNDICE DE FIGURAS</i>	10
<i>ÍNDICE DE TABLAS</i>	13
<i>ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA</i>	14
<i>RESUMEN</i>	15
<i>ABSTRACT</i>	16
1 INTRODUCCIÓN	17
1.1 JUSTIFICACIÓN	19
1.2 HIPÓTESIS.....	19
1.3 OBJETIVOS	20
1.3.1 Objetivo General	20
1.3.2 Objetivos Específicos	20
2 ANTECEDENTES	21
2.1 Clasificación taxonómica y descripción general del oso negro.....	21
2.2 Distribución y estatus de conservación del oso negro	23

2.3	Factores que predisponen la presencia de enfermedades en el oso negro	25
2.4	Importancia de la presencia de agentes infecciosos en fauna silvestre	26
2.5	Agentes infecciosos presentes en el Oso Negro	28
3	<i>MATERIAL Y MÉTODOS</i>	31
3.1	Área de estudio	31
3.2	Población considerada para el estudio	32
3.3	Captura y manejo del oso negro	33
3.4	Colección de muestras sanguíneas	34
3.5	Lugar de procesamiento de muestras	35
3.6	Examen microscópico de sangre en fresco	36
3.7	Extendido sanguíneo de muestras de sangre periférica de osos negros	36
3.8	Identificación de microorganismos eucariotas en la sangre periférica del oso negro por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	38
3.8.1	Extracción de ADN a partir de muestra sanguínea periférica de osos negros	38
3.8.2	Reacción en Cadena de la Polimerasa para la identificación de miembros de la Familia Trypanosomatidae	39

3.8.3	Reacción en Cadena de la Polimerasa para la identificación de miembros de la Familia Amoebidae.....	41
3.8.4	Reacción en Cadena de la Polimerasa para la identificación de miembros de la Familia Trichomonadidae	44
3.8.5	PCR para la amplificación de un segmento de ADN del gen del RNA ribosómico 18S específico para eucariotas	45
3.8.6	Electroforesis, visualización y documentación de los productos amplificados por PCR	48
3.9	Análisis estadístico de los resultados	49
4	<i>RESULTADOS</i>	50
4.1	Área de estudio y osos muestreados.....	50
4.2	Características y condiciones de salud de la población muestreada.....	51
4.3	Características de estructuras en sangre en fresco.....	54
4.4	Forma y tamaño de estructuras flageladas en extendido sanguíneo de oso negro	54
4.5	Identificación de microorganismos eucariotas en la sangre periférica del oso negro por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	65
4.5.1	PCR para detección de miembros de la Familia Trypanosomatidae	65

4.5.2 PCR para detección de miembros de la Familia Amoebidae.....	67
4.5.3 PCR para detección de miembros de la Familia Trichomonadidae ...	68
4.5.4 PCR para detección de Eucariotas no mamíferos	69
5 <i>DISCUSIÓN</i>	73
6 <i>CONCLUSIÓN</i>	81
7 <i>CITAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución potencial del oso negro en México.....	24
Figura 2. Oso negro observado en áreas conurbanas en Nuevo León.....	26
Figura 3. Área de ubicación de los osos negros que fueron muestreados para este estudio.....	31
Figura 4. Captura de oso negro en jaula tipo Cambrian.....	33
Figura 5. Manejo y toma de muestras de sangre periférica de osos negros.....	35
Figura 6. Sitios de geolocalización de ejemplares de oso negro muestreados en este estudio.....	50
Figura 7. Resultados de la observación de muestras de sangre en fresco de oso negro analizado en este estudio.....	55
Figura 8. Microorganismos encontrados en muestras sanguíneas de un oso negro (arete 17/Azul, adulto, macho).....	56
Figura 9. Microorganismo observado en sangre periférica de un oso negro, juvenil, hembra, sin arete (SI).	56
Figura 9. Microorganismos presentes en muestra de sangre de un oso negro, macho, adulto (arete 18/Azul).....	57
Figura 11. Microorganismo observado en sangre periférica de un oso negro, adulto, macho (arete 11/Amarillo).....	58

Figura 12. Microorganismo observado en sangre periférica de un oso negro, adulto macho (arete 23/Amarillo).....	58
Figura 13. Microorganismo observado en sangre periférica de un oso negro, osezno, macho (arete 08/Amarillo).....	59
Figura 14. Microorganismo observado en sangre periférica de un oso negro, hembra, adulta (arete 07/Amarillo)..	59
Figura 15. Microorganismos observados en sangre periférica de un oso negro, hembra, adulta (arete 123/Amarillo).....	60
Figura 16. Microorganismos observados en sangre periférica de un oso negro, juvenil, macho (124/Amarillo).....	60
Figura 17. Microorganismos observados en sangre periférica de un oso negro, juvenil, macho (arete 09/Amarillo).....	61
Figura 18. Microorganismos observados en sangre periférica de un oso negro, adulto, macho (arete 13/Amarillo).....	61
Figura 19. Microorganismo observado en sangre periférica de un oso negro, hembra, adulta (arete 125/Amarillo).....	62
Figura 20. Microorganismos observados en sangre periférica de un oso negro, hembra, adulta (arete Rojo/507007).....	62
Figura 21. Microorganismos observados en sangre periférica de un oso negro, osezno, hembra (arete Rojo/507008).....	63

Figura 22. Microorganismos observados en sangre periférica de un oso negro, adulto, macho (arete Naranja/804254).	63
Figura 23. Microorganismos observados en sangre periférica de un oso negro, macho, adulto (arete Naranja/804257).	64
Figura 24. Microorganismo observado en sangre periférica de un oso negro, macho, adulto (arete Naranja/804258).	64
Figura 25. Electroforesis de los productos de PCR de un segmento de ADN que codifica para el ARNr, 18S de Tripanosomatidos. Se realizó un PCR con primers específicos para amplificar ADN del grupo de los Tripanosomatidos.	66
Figura 26. Electroforesis de los productos de PCR de un fragmento de ADN que codifica para el ARN ribosómico, subunidad 18S de Amebas.....	68
Figura 27. Electroforesis de los productos de PCR amplificando la secuencia intergénica ITS1-5.8s-ITS2 de Trichomonadidae.	69
Figura 28. Electroforesis de los productos de PCR amplificados a partir de ADN que codifica para el ARNr, 18S utilizando un primer de bloqueo para mamífero.....	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la caracterización molecular de microorganismos eucariota.....	42
Tabla 3. Reactivos y concentraciones utilizados para la PCR de Tripanosomatidos.	43
Tabla 4. Reactivos y concentraciones utilizados para la PCR para identificar miembros de la Familia Amoebidae.....	43
Tabla 5. Reactivos y concentraciones utilizadas para la PCR de Trichomonadidae.	45
Tabla 6. Reactivos para la PCR para identificación de eucariotas en muestras de sangre de oso negro	47
Tabla 7. Reactivos para la PCR para identificación de eucariotas no mamíferos en muestras de sangre de oso negro.	48
Tabla 8. Características de los ejemplares de oso negro muestreados en este estudio	52
Tabla 9. Relación de osos analizados por PCR para Tripanosomatidos.	67
Tabla 9. Relación de osos negros analizados por PCR para detección de eucariotas no mamíferos.	72

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

Abreviación	Definición
U. a	<i>Ursus americanus</i>
PNCM	Parque Nacional Cumbres de Monterrey
E.U.A	Estados Unidos de América "U.S.A"
CITES	The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora
NOM	Norma
SEMARNAT	Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales
µm	Milimicras
I.C.	Índice de Corrección
min	Minuto
seg	Segundo
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa "Polymerase Chain Reaction"
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARNr	Ácido Ribonucleico ribosómico
nm	Nanómetros
µL	Microlitros
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
G	Gravedades
pb	Pares de bases
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
NaCl	Cloruro de Sodio
pmol	Picomoles
DTU	Unidades Discretas de Tipificación "Discreet Typing Units"

RESUMEN

En las últimas décadas, las zonas donde habita el oso negro (*Ursus americanus*) han sido disminuidas por la urbanización y la agricultura, de tal forma que se pueden observar frecuentemente, ejemplares de esta especie en las áreas conurbanas y rurales en busca de alimento y agua. Esta especie, al igual que otros animales silvestres, tienen un papel importante como reservorio de agentes etiológicos, entre ellos, algunos que pueden ser transmitidos al hombre. Existen pocos estudios realizados sobre la ecología y el estado de salud del oso negro en el norte de México. El objetivo de esta investigación fue de evaluar la presencia de microorganismos eucariotas en muestras de sangre periférica de oso negro mediante la identificación microscópica y a través de pruebas moleculares. Para ello, se utilizaron muestras sanguíneas de osos que fueron capturados para su reubicación en zonas conurbanas y rurales de los municipios de Monterrey, Santiago y Mina del estado de Nuevo León, así como los municipios de Ramos Arizpe, Arteaga, Parras y Saltillo en Coahuila. Se analizaron un total de 20 muestras de sangre completa de osos, a través de la observación directa de sangre en fresco y frotis sanguíneo, en donde se encontró la presencia de microorganismos eucariotas flagelares en un 85 % (17/20) de los osos muestreados. Para la identificación genética de los microorganismos encontrados en sangre periférica de osos, se utilizó la técnica de PCR para amplificar segmentos parciales del gen 18S de los miembros de la Familia Trypanosomatidae de 5 muestras obtenidas, en 2 de ellas obtuvimos un segmento de 733pb, similar al tamaño obtenido por *T. cruzi*. Se analizaron, así mismo, 9 muestras por PCR para miembros de la familia Amoebidae y Trichomonadidae, dando resultados negativos por este método para estas familias. Por último, se realizó una PCR para amplificar el ARNr 18S característico de eucariotas, en el cual, se utilizó un primer de bloqueo para mamíferos que impidiera la amplificación del ADN de gen 18S del oso y así demostrar que el producto amplificado correspondiera a otro eucariota, amplificando en las 12 muestras un segmento de aproximadamente 260 pb. Con estos resultados, podemos concluir que los osos que han sido capturados en estas regiones presentan microorganismos flagelados en sangre periférica, que son eucariotas y que algunos de ellos pudieran ser miembros de la familia Trypanosomatidae, por lo que se recomienda se realicen otros estudios para lograr la identificación del género y especie de estos microorganismos.

Palabras clave: PCR, Trypanosomatidae, Amoebidae, Trichomonadidae

ABSTRACT

In recent decades, the areas where the black bear (*Ursus americanus*) lives have been diminished by urbanization and agriculture, so that specimens of this species can be observed frequently in urban and rural areas in search of food and water. This species, like other wild animals, has an important role as a reservoir of etiological agents, including some that can be transmitted to men. There are few studies conducted on the ecology and health status of the black bear in northern Mexico. The objective of this investigation was to evaluate the presence of eukaryotic microorganisms in samples of peripheral black bear blood by microscopic identification and through molecular tests. For this, blood samples of bears were used, that were captured for relocation in urban and rural areas of the municipalities of Monterrey, Santiago and Mina of the state of Nuevo León, as well as the municipalities of Ramos Arizpe, Arteaga, Parras and Saltillo in Coahuila. A total of 20 samples of whole bears blood were analyzed, through direct observation of fresh blood and blood smear, where the presence of flagellar eukaryotic microorganisms was found in 85% (17/20) of the sampled bears. For the genetic identification of the microorganisms found in peripheral blood of bears, the PCR technique was used to amplify partial segments of the 18S gene of the members of the Trypanosomatidae Family of 5 samples obtained, in 2 of them we obtained a similar 733bp segment to the size obtained by *T. cruzi*. Likewise, 9 samples were analyzed by PCR for members of the Amoebidae and Trichomonadidae Family, giving negative results by this method for these Families. Finally, a PCR was performed to amplify a segment of the eukaryotic gen 18S rRNA, in which a primer that block the amplification of DNA from mammalian was used, that prevented the amplification of the bear's 18S gene DNA and thus demonstrate that the amplified product corresponded to another eukaryotic, amplifying in the 12 samples a segment of approximately 260 bp. With these results, we can conclude that bears that have been captured in these regions have flagellated microorganisms in peripheral blood, which are eukaryotes and that some of them could be members of the Trypanosomatidae Family, so it is recommended that other studies be carried out to achieve the identification of the genus and species of these microorganisms.

Keywords: PCR, Trypanosomatidae, Amoebidae, Trichomonadidae

1 INTRODUCCIÓN

El oso negro americano (*Ursus americanus*) es un mamífero carnívoro perteneciente a la familia de los úrsidos, presente en la parte norte de México. Dicha especie está presente en las zonas boscosas de América del Norte y sur de Canadá (Hall, 1981).

En México se encuentran dos subespecies: *Ursus americanus machetes* (Elliot, 1903), en los estados de Sonora, Chihuahua y Durango; así como, *Ursus americanus eremicus* (Merriam, 1904) en Nuevo León, Coahuila y Tamaulipas (Delgadillo et al., 2014).

En México, el oso negro se encuentra dentro del grupo de especies protegidas en peligro de extinción (NOM-059-SEMARNAT-2010), esto debido en gran parte a la urbanización, así como a la pérdida y fragmentación de su hábitat que ha disminuido mucho la población de esta especie en estas áreas (Pelton et al., 1999). Esta especie se ha adaptado a las zonas de interfase humano-doméstico-silvestre, (Bronson et al., 2014). En recientes años, se han observado ejemplares de todas las edades en zonas conurbadas colindantes con el Parque Nacional Cumbres de Monterrey (PNCM) y áreas rurales de Nuevo León y Coahuila (Carrera-Treviño et al., 2019).

Debido a los cambios en la ecología de los lugares en los que habita el oso negro, ha ocurrido una alteración en la biodiversidad y los ciclos biológicos de vectores y de patógenos (Bradley y Altizer, 2007). Lo que ha propiciado la aparición de enfermedades emergentes en especies silvestres y domésticas incluyendo las de

carácter zoonótico (McKinney, 2002). Al momento es poca la información conocida sobre patógenos que afectan las poblaciones de osos negros y/o de aquellas en las que esta especie participa como reservorio (Bard y Cain, 2019). Algunos investigadores han descrito que esta especie juega un papel importante como monitor de la presencia de enfermedades exóticas, como el Virus del Nilo Occidental en Wisconsin, E.U.A. (Wunderlin et al., 2007), así como la presencia de *Trichinella sp.*, en tejidos musculares de osos en Canadá (Larter et al., 2017).

Con respecto a México, por el momento se tiene conocimiento de un solo reporte de parásitos hemoflagelados (*Trypanosoma cruzi*) en un oso polar (*Ursus maritimus*) en cautiverio, siendo este el agente causal de la Tripanosomiasis Americana, también conocida como Enfermedad de Chagas (Jaime-Andrade et al., 1997).

Debido a que el oso negro en México se encuentra considerado como especie en peligro de extinción, donde sus poblaciones han disminuido considerablemente en las últimas décadas, es importante conocer además de la densidad poblacional de esta, el estado de salud de estos ejemplares y si son portadores de patógenos que causen enfermedades emergentes y de importancia en la fauna silvestre, los animales domésticos e inclusive de carácter zoonótico. Por lo que esta investigación es importante para determinar si los osos que son capturados en zonas conurbanas o rurales en los estados de Nuevo León y Coahuila presentan patógenos que pudieran representar un riesgo de salud para la especie, para otras especies silvestres y domésticas e inclusive para el hombre.

1.1 JUSTIFICACIÓN

Debido a que en la actualidad se han presentado un alto número de avistamientos de osos negros en zonas conurbadas colindantes con el Parque Nacional Cumbres de Monterrey y zonas rurales de otros municipios de Nuevo León y Coahuila, es importante realizar estudios que nos permitan establecer las condiciones de salud de los ejemplares que son capturados para su reubicación en estas zonas, la identificación de agentes patógenos presentes en esta especie por su relación humano-doméstico-vida silvestre, así como determinar si puede participar como reservorio de dichos agentes, tomando en consideración el papel que desempeña como especie centinela de diversas enfermedades zoonóticas.

1.2 HIPÓTESIS

El oso negro (*Ursus americanus*) presenta microorganismos patógenos que pudieran ser transmitidos a otras especies de fauna silvestre, domésticas o inclusive el hombre.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo General

Evaluar la presencia de microorganismos eucariotas en muestras de sangre periférica del oso negro americano (*Ursus americanus*) capturado para su reubicación en zonas rurales y conurbanas de Nuevo León y Coahuila mediante la identificación microscópica y a través de pruebas moleculares.

1.3.2 Objetivos Específicos

- a) Establecer la presencia/ausencia de microorganismos en sangre periférica de oso americano mediante el examen microscópico en fresco y extendido sanguíneo.
- b) Identificar por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la familia a la que pertenecen los microorganismos observados en sangre periférica de oso negro americano.

2 ANTECEDENTES

2.1 Clasificación taxonómica y descripción general del oso negro

El oso negro americano pertenece a la Clase *Mammalia*, del Orden *Carnívora* en la Familia *Ursidae*, Subfamilia *Ursinae*, del Género *Ursus* y la Especie *Ursus americanus* (Pallas, 1780).

La Familia *Ursidae* se encuentra en el orden de los carnívoros, pero a excepción del oso polar que es estrictamente carnívoro, el resto de las especies son omnívoros. (MacLellan, 1994).

De acuerdo con su talla, el oso negro mide generalmente entre 150 a 210 centímetros de largo y su altura hasta la cruz es de 50 a 90 centímetros. Las hembras pesan entre 40 y 70 kilogramos, mientras que los machos pueden llegar a pesar entre 80 y 130. Sin embargo, es importante considerar que el peso va a depender del sexo, edad y la temporada del año. Así, durante la hibernación se minimiza su actividad física, hay pérdida de masa y energía, además de disminuir su catabolismo proteico. También en esta etapa, esta especie pasa su gestación, parto y lactancia (Robbins et al., 2012).

En un estudio previo se determinó que durante la hibernación se ve afectada la temperatura corporal, así como sus perfiles bioquímicos, además, las hembras aumentan la eficiencia de la termogénesis y metabolismo energético, al mismo tiempo evitan la acumulación de compuestos nitrogenados, punto importante del periodo de hibernación (Shimozuru et al., 2013).

Con respecto a su aspecto físico, esta especie presenta un cuerpo robusto, ojos pequeños, orejas redondas, erectas y pequeñas, así como, una cola corta (McKinney y Delgadillo, 2004; Rogers, 1980). En lo que concierne a su olfato, tiene la capacidad de detectar olores relativamente distantes. Al hacerlo se mantiene estático y puede tomar algunas posturas, como estar parado en cuatro patas, sentado en las patas traseras, o parado sobre las patas traseras. También mantiene la boca abierta y sus exhalaciones se pueden escuchar desde pocos metros de distancia (Bacon y Burghardt, 1976).

El color del pelaje puede presentar una variación de negro a azul, marrón chocolate, canela, gris azulado e inclusive beige (Rogers, 1980). Este color del pelaje que regularmente es negro a veces cambia a café y esta transición de colores, tiene una estrecha relación con el estado nutricional del animal.

Esta especie, presenta una locomoción plantígrada y lo logra teniendo apoyo tanto de los dedos como los talones para caminar. Cada pata esta provista de 5 dedos con garras cortas no retractiles, las cuales, son utilizadas para subir árboles. Para proveerse de frutos y bayas, utiliza sus labios prensiles, por otro lado, también desarrolla la capacidad de levantar y voltear troncos, rocas y en algunos casos hábilmente abren cobertizos o vehículos en busca de alimento (Clutton-Brock, 2002; McKinney y Delgadillo, 2004)

Es importante señalar, que el oso negro adulto tiene pocos depredadores en la naturaleza, pero los gatos monteses (*Lynx rufus*) (LeCount, 1987), lobos (*Canis lupus*) (Rogers y Mech, 1981) y coyotes (*Canis latrans*) (Boyer, 1949), pueden

llegar a matar a los oseznos o a los jóvenes. En cuanto a su comportamiento durante la alimentación, el forrajeo es solitario, pero pueden agruparse cuando el alimento es abundante (Rogers, 1976).

2.2 Distribución y estatus de conservación del oso negro

Antecedentes históricos mencionan que el oso negro americano se localiza en gran parte de las zonas boscosas de América del Norte, sur de Canadá y en la parte norte de México (Hall, 1981), así como también, en los bosques templados del Este de USA (desde Florida hasta Maine), incluyendo los bosques de coníferas (desde Newfoundland hasta Alaska) y bosques montañosos (desde Alberta hasta México) (Costello et al., 2001). Además, se ha documentado su presencia en las cadenas montañosas desérticas denominadas Islas del Cielo en Arizona, en donde la permanencia del oso negro en la frontera entre Estados Unidos y México se encuentra en una situación vulnerable, debido a la pérdida y fragmentación de hábitat por la actual urbanización (Atwood et al., 2011).

Con respecto a México, se tienen reportes históricos de su distribución en la Sierra Madre Oriental abarcando los estados de Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas, así como en la Sierra Madre Occidental principalmente en regiones de bosques de pino-encino en los estados de Sonora, Chihuahua y Zacatecas hasta Jalisco y Nayarit (Juárez-Casillas y Varas, 2013). Posteriormente se consideraron los estados de San Luis Potosí y Aguascalientes, como zonas habitadas por esta especie (Hall, 1981). En la actualidad se encuentra distribuido en los estados de Sonora, Nuevo León, Coahuila y Chihuahua considerándose

también serranías de Durango (Figura1). (Ceballos et al., 2006; Juárez-Casillas y Varas, 2013).

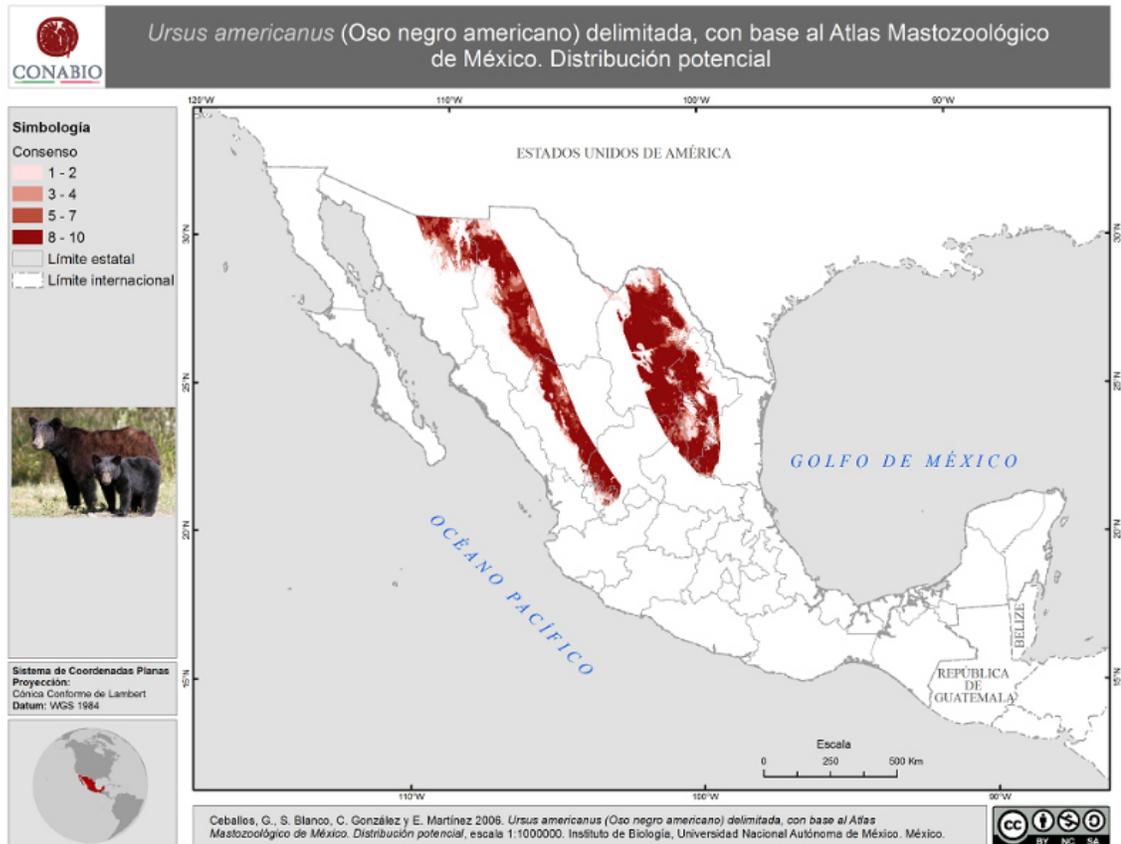


Figura 1. Distribución potencial del oso negro en México. En el mapa se observa la distribución potencial del oso negro en la sierra madre occidental abarcando los estados de Sonora, Chihuahua y Zacatecas, Jalisco y Nayarit. Así como a lo largo de la sierra madre oriental en los estados de Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas. Las áreas de distribución se muestran en color rojo (Ceballos et al., 2006).

Un estudio realizado en el Parque Nacional Cumbres de Monterrey durante los años 2015-2016, abrió un panorama amplio acerca de la densidad poblacional, la relación de sexos y patrones de movimiento que esta especie tiene en esta zona. Determinándose una densidad estimada de 0.052 osos/Km² (95% I.C. ±0.063), siendo una baja densidad de población de esta especie en esta área.

En ese estudio, se encontró una mayor proporción de machos que de hembras y con respecto al movimiento, se observó que esta especie puede llegar a desplazarse hasta 30 kilómetros (Fimbres-Macías, 2017).

Las principales amenazas que presenta esta especie se encuentran asociadas al rápido crecimiento de la población humana, así como a una economía pobre que favorece la pérdida de su hábitat, debido a la limpieza de terrenos, tala de árboles y la realización de sobrepastoreo (Pelton et al., 1999). Otras prácticas humanas, como lo es la caza furtiva y el tráfico ilegal son también algunas de las principales problemáticas de esta especie.

Debido a esto, se incluyó al oso negro en el Apéndice II de la Convención sobre Comercio Internacional de Especies de Flora y Fauna Silvestres (CITES). Es importante mencionar que se le considera bajo protección especial solamente a la población de la Sierra del Burro, en Coahuila de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010.

2.3 Factores que predisponen la presencia de enfermedades en el oso negro

La urbanización está jugando un papel importante en la presencia de enfermedades en esta especie, debido a que se están presentando cambios del hábitat y ambientales, que han llegado a causar pérdida de la biodiversidad y alteración en la biología de los patógenos, vectores y hospedadores, (Bradley y Altizer, 2007) por lo tanto, esta especie presenta una susceptibilidad más alta a las enfermedades y parásitos, consideradas algunas de interés zoonótico. (McKinney, 2002).

Se dice que su capacidad de mostrarse tolerante a la cercanía de los humanos y su adaptación a las zonas de interfaz urbano-silvestre (Beckmann y Berger, 2003), facilitan su dependencia de alimentación antropogénica (McCleery, 2010), como lo son los sitios de fácil acceso a la basura como alimento (López et al., 2019). Esto se ha presentado con mayor frecuencia en las regiones conurbanas alrededor del PNCM donde especímenes de distintas edades se han observado en Santa Catarina, San Pedro, Monterrey y otros municipios aledaños al Parque Nacional Cumbres de Monterrey (PNCM) (Fig. 2) (López et al., 2019).



Figura 2. Oso negro observado en áreas conurbanas en Nuevo León. En la imagen se puede observar un oso negro en una zona conurbana en busca de alimento en la basura (Carrera-Treviño., et al., 2019).

2.4 Importancia de la presencia de agentes infecciosos en fauna silvestre

Los agentes infecciosos (parásitos, bacterias, hongos y virus) juegan un papel importante en el mantenimiento y regulación de poblaciones animales en

comunidades ecológicas, así, los patógenos y animales han co-evolucionado con el paso de los siglos en estas comunidades (Kaeslin et al., 2013). Por lo tanto, para que un agente infeccioso se mantenga en el nicho ecológico deberá ser capaz de mantener también vivo a su huésped, de causarle el menor daño y si es posible vivir dentro de él sin causar sintomatología alguna (Kaeslin et al., 2013).

En este sentido, existe muy poca información sobre los agentes infecciosos que afectan especies diversas de fauna silvestre, si estos pueden participar como reservorios de agentes etiológicos que causan enfermedades endémicas o emergentes en la propia fauna silvestre, en los animales domésticos o en el humano (Thompson y Polley, 2014).

Las enfermedades infecciosas emergentes en los animales silvestres se clasifican con base a criterios epizootiológicos:

- i. Las enfermedades infecciosas presentes en los animales domésticos y que pueden ser contagiadas a los animales de vida silvestre, que viven en proximidad.
- ii. Las enfermedades infecciosas que se relacionan con la intervención humana, por medio de translocaciones de huésped o parásito.
- iii. Las enfermedades infecciosas que afectan a fauna silvestre y donde no se involucran animales domésticos o humanos.

De esta manera, se visualizan dos implicaciones biológicas importantes:

- a. Numerosas especies silvestres son reservorios de patógenos que amenazan la salud humana y animales domésticos.
- b. Las enfermedades infecciosas emergentes de la vida silvestre representan una amenaza importante en la conservación de la biodiversidad global. (Daszak et al., 2000).

2.5 Agentes infecciosos Presentes en el Oso Negro

Uno de los parásitos importantes que se han detectado en especies de fauna silvestre han sido los Tripanosomatidos. Es especialmente importante determinar si algunas especies de fauna silvestre son capaces de controlar las infecciones causadas por algunas especies de Tripanosomatidos y así establecer su importancia como reservorios y el papel que desempeñan en la transmisión de dichos agentes (Martínez-Hernández et al., 2014; Tenorio et al., 2014). En este sentido, es importante establecer si el oso negro por su estrecha relación con otras especies de vida silvestre, juega un papel importante como reservorio de agentes infecciosos y potencialmente patógenos para otras especies de vida silvestre, domésticas o el hombre.

Algunos estudios realizados en Norteamérica, principalmente en Texas, han detectado *Trypanosoma cruzi*, en poblaciones de mapaches (*Procyon lotor*), coyotes (*Canis latrans*), zorros grises (*Urocyon cinereoargenteus*) y gatos monteses (*Lynx rufus*). En dichos estudios, se encontró que los mapaches fueron positivos a *T. cruzi* DTU TcIV y uno de ellos portaba dos DTUs el TcI y TcIV (Curtis-Robles et al., 2016). Estos datos son de interés, ya que muchas de estas

especies de mamíferos, también se encuentran en el Noreste de México, teniendo una estrecha relación con esta especie.

En lo que concierne a su presencia en el oso negro, en el año 2007 se dio a conocer un primer informe de infección por *Trypanosoma evansi* en osos negros del Himalaya (*Selenarctos thibetanus*) (Muhammad et al., 2007). Posteriormente, este mismo tripanosoma fue detectado en cinco osos negros asiáticos (*Ursus thibetanus*) en Pakistán (Shahid et al., 2013). En México se ha reportado un caso de infección por *Trypanosoma cruzi* en un oso polar (*Ursus maritimus*) en cautiverio (Jaime-Andrade et al., 1997).

Por otro lado, en un estudio realizado en oso negro en el noreste de Wisconsin, E.U.A. en el año 2007, se encontró la presencia de microfilarias en sangre periférica de especímenes de esta especie, las cuales fueron caracterizadas a través de estudios de morfología y de análisis genéticos como *Dirofilaria ursi* (Michalski et al., 2010).

Otro estudio de seroprevalencia realizado en la Cordillera Central de los Apalaches, E.U.A. estableció la presencia de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en el 62% de las muestras procesadas, siendo este hallazgo muy importante, debido a que la toxoplasmosis es considerada una zoonosis (Cox et al., 2017).

En 2017 en Canadá se demostró la presencia de *Trichinella* sp., en tejido muscular de osos, mostrando una prevalencia del 4.1%. Este estudio reveló que algunos osos tenían una infección con más de una larva por gramo de tejido

muscular. Esto es de gran importancia, debido a que este parásito representa un riesgo para el humano (Larter et al., 2017).

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Área de estudio

El presente estudio fue realizado en el Estado de Nuevo León comprendiendo las latitudes ($23^{\circ} 9'45.72''$ Norte y $27^{\circ}47'56.76''$ Sur) y las longitudes ($101^{\circ}12'25.2''$ Este, $98^{\circ} 25'17.76''$ Oeste). Esta región comprende los municipios de Monterrey, Santiago y Mina. Así como en el Estado de Coahuila ($29^{\circ} 52'48''$ Norte, $24^{\circ} 32'34''$ Sur, y las longitudes ($99^{\circ} 50'35''$ Este, $103^{\circ} 57'36''$ Oeste) (INEGI, 2012) en los municipios de Ramos Arizpe, Arteaga, Parras y Saltillo, los cuales, son colindantes con Nuevo León (Fig.3).

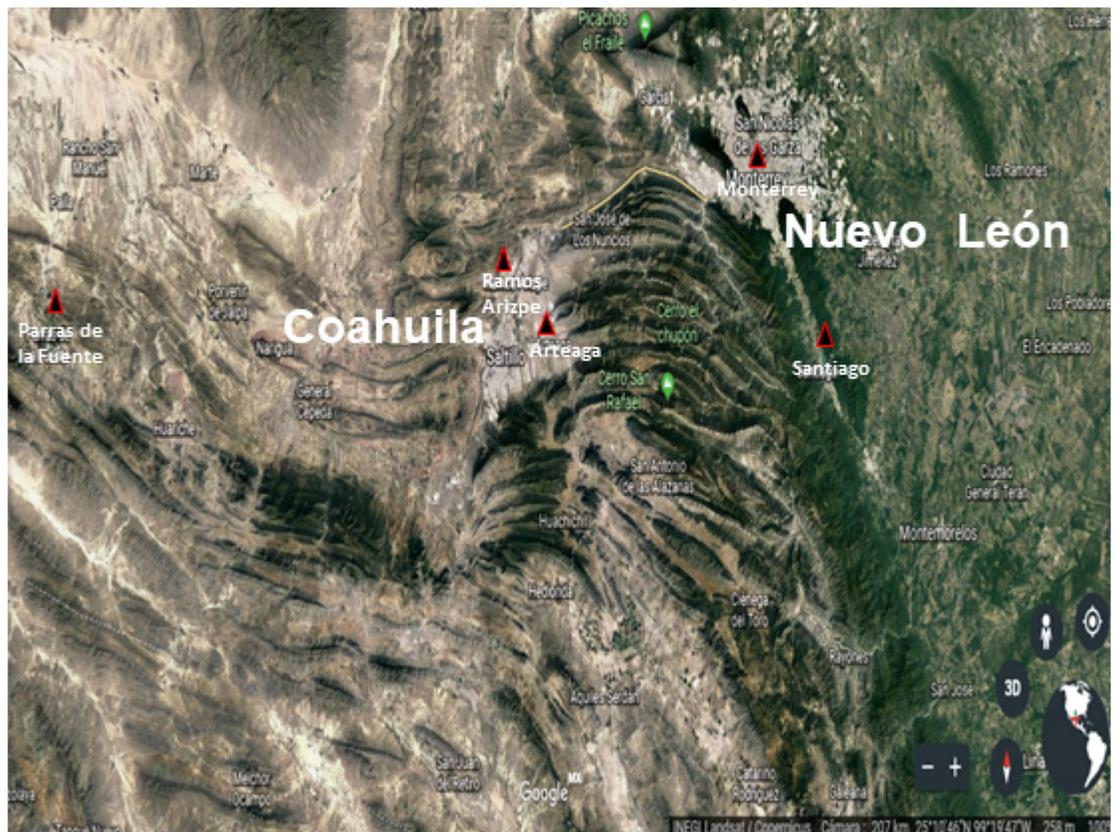


Figura 3. Área de ubicación de los osos negros que fueron muestreados para este estudio. Localización de los sitios de captura de osos negros (*Ursus americanus*) entre 2017 y 2019, de los que se obtuvieron muestras sanguíneas para el presente estudio (marcados en rojo).

3.2 Población considerada para el estudio

En regiones de la interfaz urbano-silvestres en el norte del país en los estados de Coahuila y Nuevo León se han presentado un gran número de avistamientos de oso negro, que al ser animales de talla grande y buscar alimento o agua en estas zonas han causado problemas en poblaciones rurales y conurbanas, entre las que podemos mencionar daños a cultivos, así como al ganado doméstico y amenazar la vida humana. Este comportamiento del oso negro ha obligado a las autoridades correspondientes a capturar estos especímenes y reubicarlos de lugar (Carrera-Treviño et al., 2019).

Aprovechando la captura y el manejo de estos especímenes para su reubicación se realizó la inspección de los mismos para establecer la edad, sexo, condición corporal de los ejemplares capturados, así como el aretado de los mismos para su posterior identificación.

En total se muestrearon 20 osos negros, ejemplares que fueron capturados y manejados con autorización de la SEMARNAT, con el permiso SGPA/DGVS/00988/17 otorgado al Laboratorio de Fauna Silvestre de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León, del mes de julio de 2017 al mes de abril de 2019, en zonas conurbanas y rurales de Nuevo León y Coahuila.

3.3 Captura y manejo del oso negro

La captura de los especímenes de oso negro utilizados para la toma de muestras sanguíneas de este estudio, se realizó siguiendo el protocolo de captura y manejo establecido por el grupo de investigación del Dr. Carrera y colaboradores, utilizando jaulas Cambrian (Figura 4). Estas jaulas, por su diseño y estructura evitan mutilaciones y heridas durante el proceso de captura y traslado de los animales. Para ello se colocó un cebo (comida de la que se alimentan los osos en las áreas de captura o avistamiento) y la trampa era activada cuando el cebo era tomado.



Figura 4. Captura de oso negro en jaula tipo Cambrian. En la imagen se muestra un oso negro juvenil previo a su manejo al momento de la captura y previo a la anestesia y manejo.

Para manejar a los osos negros sin riesgo a sufrir lesiones, se realizó una restricción química (tranquilización y anestesia de acción corta), empleándose el

tranquilizante Xilacina, a una dosis de 2/4 mg/kg de peso corporal del oso (10%Clorhidrato de Xilacina ®) (Pisa-Agropecuaria, Guadalajara, México) y el anestésico Zoletil 100, a una dosis de 7-9 mg/kg de peso corporal del oso (Tiletamina 250 mg; Zolazepam 250 mg ®) (Virbac-Guadalajara, México). Las dosis utilizadas por ejemplar fueron calculadas acorde al peso de cada ejemplar y aplicados mediante un dardo disparado por una pistola de CO₂ por personal capacitado (Carrera y Lira, 2015).

Una vez que la restricción química surgió efecto en los ejemplares, se procedió a realizar una inspección física de estos, monitoreando en todo momento sus constantes fisiológicas por un médico veterinario capacitado. En la inspección física se pudo establecer el peso, sexo, condición corporal y edad. Los especímenes capturados se pudieron categorizar por su edad como oseznos (menor de 2 años), juvenil (de 2 a 4 años) y adulto (4 años en adelante). Todos los datos obtenidos durante el manejo fueron registrados. Por otro lado, a cada oso capturado se le colocó un arete para su posterior identificación.

Una vez que los ejemplares se recuperaron de la anestesia (cerca de 3 horas posteriores a su captura) y fueron transportados a su área de reubicación, fueron liberados.

3.4 Colección de muestras sanguíneas

La obtención de muestras de sangre periférica se realizó al momento de la inspección física en ejemplares anestesiados. Para ello se utilizaron agujas y en

tubos BD Vacutainer® con EDTA K2 (Becton Dickinson and Company, USA), mediante punción de la vena femoral, para obtener alrededor de 2 ml de sangre completa de cada ejemplar (Figura 5).

Las muestras fueron transportadas en refrigeración y mantenidas a 4°C hasta su análisis.



Figura 5. Manejo y toma de muestras de sangre periférica de osos negros. En la imagen a se observa la inspección física de un ejemplar capturado (frecuencia cardíaca). En la imagen b se observa el procedimiento para la toma de sangre a partir de la vena femoral por personal del Laboratorio de Fauna Silvestre de la FMVZ-UANL.

3.5 Lugar de procesamiento de muestras

El procesamiento de las muestras de sangre de osos negros del presente estudio se llevó a cabo en el Departamento de Histología y Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnica de la UANL.

Las pruebas moleculares para la posible identificación de microorganismos presentes en torrente sanguíneo en oso negro se realizaron con la colaboración

de personal del laboratorio del Centro de Investigaciones Regionales, Dr. Hideyo Noguchi de la Universidad Autónoma de Yucatán, del Departamento de Ecología de Agentes Patógenos, del Hospital General Dr. Manuel Gea González de la Cd. de México, así como del Laboratorio Nacional de la Biodiversidad (LANABIO) del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

3.6 Examen microscópico de sangre en fresco

Para revisar si en las muestras de sangre periférica obtenidas a partir de ejemplares de oso negro existían estructuras diferentes a las encontradas como componentes normales de sangre (eritrocitos u leucocitos) y si presentaban alguna motilidad se realizó un examen microscópico de sangre en fresco.

Para ello se colocó una gota (50 microlitros) de sangre completa con EDTA sobre un portaobjetos, colocándose por encima de esta un cubreobjetos. La muestra se observó inmediatamente al microscopio (Primo Star, Carl Zeiss®), a 10 X y posteriormente a 40 X reduciendo la apertura del condensador. Para una adecuada observación de la muestra se inspeccionaron 100 campos por cada preparado en fresco y se documentó mediante el uso de una cámara conectada al tubo del microscopio. Los preparados fueron conservados en una cámara húmeda hasta su lectura (Vega y Náquira, 2005).

3.7 Extendido sanguíneo de muestras de sangre periférica de osos negros

Para visualizar en una mejor forma las estructuras flageladas y con motilidad observadas en el examen en fresco y poder establecer así su morfología y

tamaño, así como algunos componentes intracelulares se realizó un extendido sanguíneo que fue posteriormente teñido.

Para ello se colocó en un portaobjeto una gota de cerca de 3-5 microlitros de sangre completa, la cual, se extendió con el canto de otro portaobjetos a un ángulo de 45°. Una vez extendida la muestra se dejó secar a temperatura ambiente y se fijó con metanol absoluto durante 10 minutos.

Para visualizar mejor las estructuras celulares las muestras fijadas fueron teñidas con un hemocolorante rápido (HYCEL®), siguiendo las instrucciones del fabricante del estuche comercial utilizado, dando como resultado una tinción clásica del tipo Romanowsky.

Por otro lado, se utilizó en otro extendido fijado la tinción de Giemsa (Jalmek®) según las instrucciones del fabricante del reactivo. Esta tinción se utiliza muy frecuentemente para identificar hemoparásitos.

Una vez terminado el procedimiento las laminillas fueron observadas al microscopio con los objetivos 10 X y 40 X, y posteriormente se colocó una gota de aceite de inmersión sobre la muestra para el enfoque con el objetivo de 100 X (Vega y Náquira, 2015).

Una vez observadas las células y estructuras de interés, se procedió a documentarlas, tomando además las medidas de las mismas con ayuda de un microscopio óptico (IX 81, OLYMPUS®) en el Laboratorio Nacional de la

Biodiversidad, del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

3.8 Identificación de microorganismos eucariotas en la sangre periférica del oso negro por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

3.8.1 Extracción de ADN a partir de muestra sanguínea periférica de osos negros

La extracción de ADN de muestras de sangre de oso negro se realizó en el laboratorio del Centro de Investigaciones Regionales, Dr. Hideyo Noguchi de la Universidad Autónoma de Yucatán. Para ello, se utilizó el Kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante.

De algunas muestras de sangre de oso negro, el ADN fue extraído con la técnica de fenol/Cloroformo (Sambrook et al., 2001), en el Departamento de Ecología de Agentes Patógenos del Hospital General, Dr. Manuel Gea González de la Cd. de México, y se realizó como se describe a continuación.

La muestra se colocó en un microtubo de 200 µL agregándose a esta 50 µL de buffer de lisis de ADN (2.5 µl de TRIS 1 M, 25 µl de EDTA 0.5 M pH 8, 12.5 µl de NaCl 1 M, 25 µl de SDS al 10 % y 25 µl de Proteinasa K a una concentración de 20 mg/mL (Affymetrix, Cleveland, OH, USA). La muestra y el buffer lisis se homogenizaron con la ayuda de un vortex y se incubaron a 60°C durante 12 horas en una platina caliente (Lauda Brinkmann RM6 Super RMT®). A continuación, a cada muestra se le adicionó fenol-cloroformo-alcohol Isoamílico (25:24:1) en proporción 1:1, homogenizándose en vortex (VORTEX GENIE 2® Scientific Industries) durante 30 segundos. Una vez homogeneizada la muestra se

centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos (Microcentrífuga Sorvall Legend Micro 21R[®] Thermo Scientific). El sobrenadante obtenido fue transferido a un tubo eppendorf[®] de 2 ml, al cual se le agregó cloroformo en proporción 1:1, homogenizándose y centrifugándose a 14000 rpm por 5 minutos. Posteriormente, el sobrenadante obtenido fue transferido a un tubo eppendorf[®] de 2 ml agregándosele 10% de acetato de potasio 3 M e isopropanol en proporción 1:1. La mezcla fue homogeneizada. La mezcla se incubó a -66°C para que el ADN se precipitara en un tiempo de 2-12 h. Posteriormente, la mezcla fue centrifugada a 14800 rpm durante 25 minutos a 4 °C. Cuidadosamente se decantó el sobrenadante, obteniéndose un pellet, que se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente, se le agregó 20 µL de RNase-Free Water (invitrogen[®] Thermo Fisher Scientific) para la hidratación del ADN. Finalmente se realizó la cuantificación y determinación de la pureza de ADN por medio de la relación de la absorbancia 260/280 nm, utilizando un lector Epoch (Microplate Spectrophotometer[®] BioTek Instruments).

3.8.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa para la identificación de miembros de la Familia Trypanosomidae

Para identificar miembros de la Familia Trypanosomatidae se utilizó un protocolo diseñado y utilizado por el grupo de investigación de la Dra. Guiehdani Villalobos Castillejos y el Dr. Fernando Martínez Hernández del Departamento de Ecología de Agentes Patógenos del Hospital General Dr. Manuel Gea González, de la Cd. de México.

Este protocolo utiliza oligonucleótidos que amplifican un fragmento del gen que codifica para el ARN ribosómico 18S y que es específico para tripanosomatidos (Tab. 1), amplificando un segmento que puede variar entre 600 y 900 pb.

En esta PCR se utilizó como control positivo para Tripanosomatidos la cepa de *T. cruzi* aislada de un humano obtenida en Oaxaca (México) y como control negativo de contaminación se utilizó agua destilada.

Para realizar la PCR, en primer lugar, se preparó un master mix añadiendo agua libre de nucleasas, buffer de PCR (número de catálogo Y02028B, Invitrogen, USA), dNTPs (número de catálogo 46-0122, Invitrogen, USA) y $MgCl_2$ (número de catálogo Y02016B, Invitrogen, USA), Albúmina al 1% (número de catálogo A1516-100G, Sigma Aldich), los oligonucleótidos para Trypanosomidae F y R (diseñados en el departamento de Ecología de Agentes patógenos del Hospital General Dr. Manuel Gea González). y finalmente la Taq polimerasa (número de catálogo 11615-010, Invitrogen, USA). El master se mezcló con ayuda de un vortex. La cantidad en microlitros y las concentraciones de los reactivos se anexan en la Tabla 2.

Una vez realizado el master mix, se colocaron 20 μ l de este en un microtubo eppendorf® de 200 μ l para cada reacción y se agregaron 5 μ l del ADN de la muestra, así como de los controles negativo y positivo.

A continuación, las muestras se colocaron en un termociclador (Applied Biosystems™ Veriti™ CA, EUA), utilizando las siguientes condiciones de PCR:

- Un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min. seguidos.
- 40 ciclos de PCR (desnaturalización de ADN 95 °C-30 seg.; alineación de oligonucleótidos 58 °C-1 min.; y una extensión de la cadena de ADN a 72 °C -23 seg.)
- Un ciclo de Extensión final a 72 °C-7 min.

3.8.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa para la identificación de miembros de la Familia Amoebidae

Para realizar la PCR para identificar miembros de la Familia Amoebidae se utilizaron un par de oligonucleótidos que amplifican un segmento del gen que codifica para el ARN ribosómico 18S y que es específico de esta Familia (Tab. 1). Estos oligonucleótidos amplifican un fragmento de ADN de 750 pb (Villanueva-García et al., 2017).

Para esta PCR se utilizó como control positivo a *Entamoeba* sp. de una muestra de heces y como control negativo de contaminación agua destilada.

Para realizar la PCR se preparó un master mix añadiendo agua libre de nucleasas, buffer de PCR, dNTPs, MgCl₂ (2.5 mM,) Albúmina 1 %, los oligonucleótidos Enta JUCD F y Enta DSPR R, así como la Taq polimerasa. Las concentraciones de los reactivos y cantidades en microlitros por reacción para esta PCR se especifican en la Tabla 3.

Después de agitar el master mix, se colocaron 22 µL de este, en un microtubo de 200 µL para cada reacción, a la cual se agregaron 3 µL del ADN de la muestra, así como los controles positivo y negativo.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la caracterización molecular de microorganismos eucariota

Nombre	Secuencia (5'-3')	Gen	Amplificado (pb)	Referencia
Trypanosomatidae F	ATCTGGTAAAGTTCCCCGTG	18S	600-900	Rangel-Gamboa et al., 2019
Trypanosomatidae R	CCGTTTCGGCTTTTGTGGT			
Oligonucleótido Enta JUCD F	ATAACGRTAACGAGGAATTRGGG	18S	750	Villanueva-García et al., 2017
Oligonucleótido Enta DSPR R	GTTGAGTCAAATTAAGCCGCAGGC			
Trichomonadidae F	CGGTAGGTGAACCTGCCGTT	ITS1-5.8s-ITS2	350-450	Jongwutiwes et al., 2000
Trichomonadidae R	TGCTTCAGTTCAGCGGGTCT			
Euk_1391f	TATCGCCGTTCCGGTACACACCGCCCGTC	18S	260 +/- 50	Vestheim et al., 2008
EukBr	AGTCAGTCAGCATGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC			
Mammal_block_I-short_1391f	GCCCGTCGCTACTACCGATTGGIIIIITTAGTGAGGCCCT[SpC3]			

Tabla 2. Reactivos y concentraciones utilizados para la PCR de Tripanosomatidos.

Componentes	Volumen de reactivo en la reacción	Concentración Final en la reacción
Agua libre de nucleasas	11.0 µL	
Buffer de PCR (10 X)	2.5 µL	1X
dNTPs	2.5 µL	2.5 mM
Primer 18S F (5 pmol)	0.5 µL	0.5 mM
Primer 18S R (5 pmol)	0.5 µL	0.5 mM
MgCl ₂ 2.5 mM	1.75 µL	1.75 mM
Albúmina 1% (1 mg/mL)	1.0 µL	0.2 mg/mL
Taq Polimerasa	0.25 µL	0.25 U
DNA de muestra	5.0 µL	
Volumen final	25 µL	

Posteriormente las muestras se colocaron en un termociclador, utilizando las siguientes condiciones de PCR:

- Un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C- 2 min.
- 35 ciclos de PCR (desnaturalización a 95 °C-30 seg.; alineamiento de oligonucleótidos a 64 °C-25 seg.; extensión de la cadena a 72 °C -90 seg.)
- Un ciclo de extensión final a 72 °C/30 min.

Tabla 3. Reactivos y concentraciones utilizados para la PCR para identificar miembros de la Familia Amoebidae.

Componentes	Volumen de reactivo en la reacción	Concentración Final en la reacción
Agua libre de nucleasas	10.75 µL	
Buffer de PCR (10 X)	2.5 µL	(1X)
dNTPs	2.5 µL	2.5 mM
Oligonucleótido Enta JUCD F	1.0 µL	1 mM
Oligonucleótido Enta DSPR R	1.0 µL	1 mM
MgCl ₂ 2.5 mM	2.0 µL	2 mM
Albúmina 1% (1 mg/mL)	2.0 µL	(0.2 mg/mL)
Taq Polimerasa	0.25 µL	0.25 U
DNA de muestra	3.0 µL	
Volumen final de la reacción	25 µL	

3.8.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa para la identificación de miembros de la Familia Trichomonadidae

Para realizar la PCR para identificar miembros de la Familia Trichomonadidae se utilizaron un par de oligonucleótidos que amplifican un segmento de ADN que contiene parte de las secuencias del espaciador de transcrito interno (ITS1 y 2 “Internal transcribed spacer”) y el ARNr 5.8s (ITS1-5.8S-ITS2) y que es específico de esta familia (Tab. 1). Estos oligonucleótidos amplifican un fragmento de ADN de 350 a 450 pb (Jongwutiwes et al., 2000).

Para esta PCR se utilizó como control positivo a *Trichomonas vaginalis* y como control negativo de contaminación agua destilada.

Para realizar la PCR se preparó un master mix añadiendo agua libre de nucleasas, buffer de PCR, dNTPs, MgCl₂ (2.5 mM,) Albúmina 1 %, los oligonucleótidos Trichomonadidae F y R, así como la Taq polimerasa. Las concentraciones de los reactivos y cantidades en microlitros por reacción para esta PCR se especifican en la Tabla 4.

En un microtubo de 200 µL se colocaron 44.2 µL de master mix, así como 6 µL del ADN de la muestra y de los controles negativo y positivo.

Los microtubos se colocaron en un termociclador utilizando las siguientes condiciones de PCR:

- Un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 10 min.
- 40 ciclos de PCR (desnaturalización de ADN 94 °C-30 seg.; alineamiento de oligonucleótidos a 63 °C-30 seg.; una extensión a 72 °C- 30 seg.).
- Un ciclo de extensión final a 72 °C por 10 min.

Tabla 4. Reactivos y concentraciones utilizadas para la PCR de Trichomonadidae.

Componentes	Volumen de reactivo en la reacción	Concentración Final en la reacción
Agua libre de nucleasas	27.5 µL	
Buffer de PCR (10 X)	5.0 µL	(1X)
dNTPs	5.0 µL	5.0 mM
Oligonucleótido Trichomonadidae F (5 pmol)	1.0 µL	1 mM
Oligonucleótido Trichomonadidae R (5 pmol)	1.0 µL	1 mM
MgCl₂ 2.5 mM	2.2 µL	2.2 mM
Albúmina 1% (1 mg/ml)	2.0 µL	0.2 mg/mL
Taq Polimerasa	0.5 µL	0.5 U
DNA de muestra	6.0 µL	
Volumen final	50.2 µL	

3.8.5 PCR para la amplificación de un segmento de ADN del gen del RNA ribosómico 18S específico para eucariotas

Para establecer que los microorganismos flagelados encontrados en muestras sanguíneas de osos eran organismos eucariotas y no se trataban de células o estructuras presentes en condiciones normales en la sangre de oso negro, se implementó una estrategia general, la cual, consistió en amplificar un segmento del ADN que codifica para el gen del RNAr 18S de eucariotas, utilizando los primer universales para eucariotas 1391f y EukBr y un primer de bloqueo Mammal_block_I-short_1391f que contiene un C3(/3spC37) que impide la amplificación del ADN en las secuencias que sean de origen de mamífero, por lo

tanto, bloqueará la amplificación de ADN del gen de RNA ribosómico 18S del oso (Vestheim et al., 2008).

Para ello, se trabajó en colaboración con el Dr. Etienne Waleckx del Centro de Investigaciones Regionales, Dr. Hideyo Noguchi de la Universidad Autónoma de Yucatán.

Para validar el funcionamiento tanto de los oligonucleótidos universales para mamífero, como el bloqueo de la amplificación de genoma de mamíferos se realizaron 2 PCR. El primero, en el cual solo se comprobó que los primers universales que amplificaba para eucariotas funcionaran y en un segundo PCR se verificó que el primer que bloqueaba la amplificación de ADN de mamífero funcionara. Para ello, se utilizaron como controles muestras de ADN extraídas de *T. cruzi*, de ratones infectados con *T. cruzi* y de ratones no infectados. Posterior a los ensayos de validación, se procesaron las muestras de ADN obtenidas a partir de 12 osos muestreados en este estudio.

Para realizar esta PCR se preparó en primer lugar un master mix, añadiendo agua libre de nucleasas, 2 X Dream Taq Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 10 μ M de los primers Forward Euk_1391f y Primer Reverse EukBr, homogenizándose el master mix por 10 segundos con un vortex. En un tubo eppendorf[®] de 200 μ L, se agregaron 24 μ L de master mix, así como 1 μ L del ADN de la muestra de los controles arriba mencionados y de las

muestras. En la Tabla 5 se describen los componentes, las molaridades y volúmenes utilizados para cada reacción en la PCR para amplificar el fragmento de ADN del gen del ARNr 18S para eucariotas. La Tabla 6 muestra los componentes, las molaridades y volúmenes utilizados para cada reacción en la PCR que se utilizó el primer bloqueador de secuencias de mamífero (primer Mammal_block_I-short_1391f).

Tabla 5. Reactivos para la PCR para identificación de eucariotas en muestras de sangre de oso negro

Componentes	Volumen de reactivo en la reacción	Concentración Final en la reacción
Agua libre de nucleasas	13.0 µL	
PCR master mix 2X Dream Taq DNA Polimerasa Dream Taq Green buffer 2X Mix de dNTPs 0.4 mM MgCl ₂ 4 mM	10.0 µL	2X
Primer Euk_1391f (10 µM)	0.5 µL	10 µM
Primer EukBr (10 µM)	0.5 µL	10 µM
DNA de muestra	1.0 µL	
Volumen final	25.0 µL	

Posteriormente las muestras se colocaron en un termociclador (T100™ Biorad, Hercules, CA, E.U.A). Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min; seguidos de 35 ciclos de PCR (desnaturalización de ADN 94 °C-45 seg.; alineación de oligonucleótidos 57 °C-60 seg. y una extensión del producto de 72 °C-90 seg.; seguido de una extensión final a 72 °C por 10 min.

Tabla 6. Reactivos para la PCR para identificación de eucariotas no mamíferos en muestras de sangre de oso negro.

Componentes	Volumen de reactivo en la reacción	Concentración Final en la reacción
Agua libre de nucleasas	9.0 μ L	
PCR master mix 2X Dream Taq DNA Polimerasa Dream Taq Green buffer 2X Mix de dNTPs 0.4 mM MgCl ₂ 4 mM	10.0 μ L	2X
Primer Euk_1391f (10 μM)	0.5 μ L	10 μ M
Primer EukBr (10 μM)	0.5 μ L	10 μ M
Primer Mammal_block_I_short_1391f 10 μM	4.0 μ L	10 μ M
DNA de muestra	1.0 μ L	
Volumen final	25.0 μ L	

3.8.6 Electroforesis, visualización y documentación de los productos amplificados por PCR

Para poder calcular el tamaño de fragmento amplificado en los protocolos de las PCR utilizados en este estudio, en primer lugar, se realizó una electroforesis de estos productos en un gel de agarosa de 1.2 %. Para preparar la agarosa se disolvió 1 g. de agarosa en 80 ml de buffer TAE 1 X (40 mM Tris base, 20 mM ácido acético glacial, 2.0 mM EDTA pH 8.3) a 50 °C, posteriormente se vació en un molde y colocándose un peine para formar los pocillos de carga, el gel se dejó gelificar y se colocó en buffer TAE 1 X. Los productos de PCR (5 μ L del producto de PCR amplificado) se colocaron en los pocillos de la agarosa mezclándolos previamente con 1 μ L de buffer de carga (50 % glicerol, 100 mM Na₃ EDTA, 1 %

SDS, 0.1 % de azul de bromofenol, PH 8.0). Así mismo se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb para establecer el tamaño de los productos amplificados.

Los productos de PCR fueron separados por electroforesis a 100 volts, durante 50 minutos. Una vez terminada la electroforesis los geles de agarosa fueron teñidos con bromuro de etidio (40 mg/mL) en buffer TAE y se visualizaron mediante el transiluminador Gen Logic, realizándose la fotodocumentación del mismo.

3.9 Análisis estadístico de los resultados

En la presente investigación se analizó la proporción de osos con presencia de estructuras compatibles con microorganismos presentes en sangre de oso negro (*Ursus americanus*), utilizando Chi cuadrada, con un intervalo de confianza de 0.05, mediante el uso de Software Statistical Package for the Social Sciencies (SPSS).

4 RESULTADOS

4.1 Área de estudio y osos muestreados

Se analizaron un total de 20 muestras de oso negro de los municipios de Monterrey (2), Santiago (1) y Mina (1) del Estado de Nuevo León. Así como en Ramos Arizpe (1), Arteaga (12), Saltillo (2) y Parras (1) municipios del Estado de Coahuila. La siguiente figura muestra los sitios de geolocalización de cada ejemplar al momento de la captura.

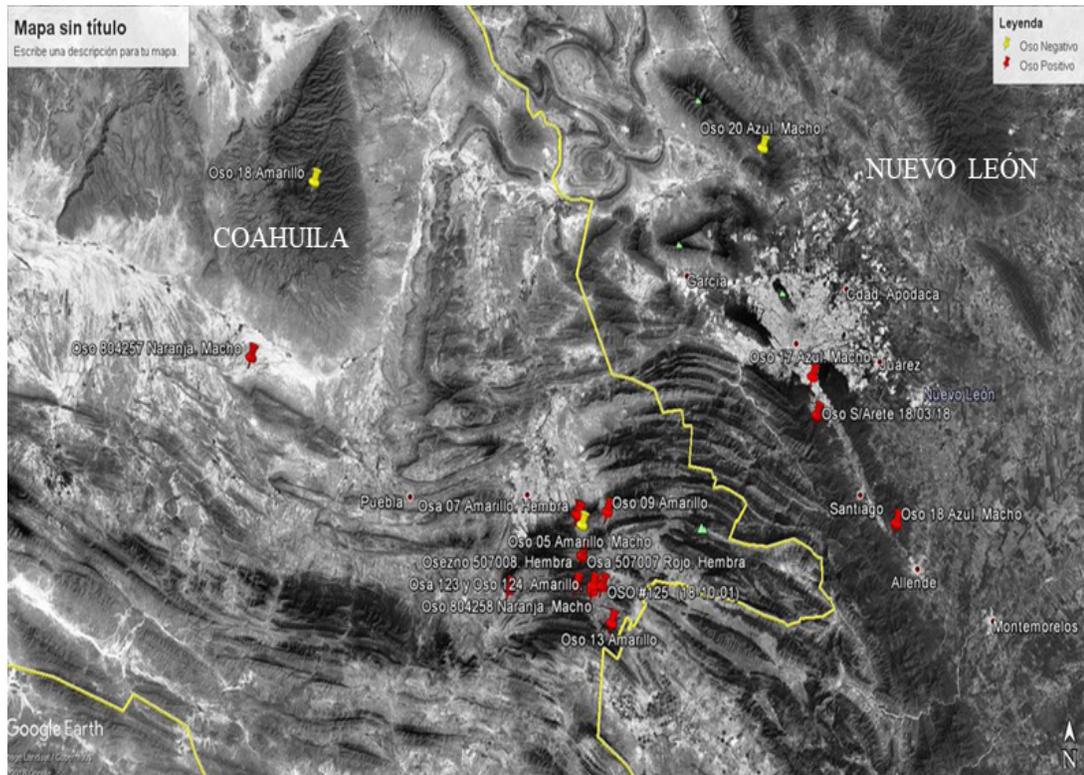


Figura 6. Sitios de geolocalización de ejemplares de oso negro muestreados en este estudio. La imagen muestra los sitios de ubicación donde fueron capturados los osos negros que se utilizaron para obtener muestras sanguíneas para este estudio, (marcados en rojo los ejemplares en los cuales se observaron estructuras con características flagelares, así como en color amarillo los ejemplares en los que no se observaron estructuras con dichas características).

El periodo de muestreo comprendió del mes de Julio de 2017 al mes Abril del 2019. Es importante referir que los ejemplares muestreados en este estudio, fueron en los meses más calurosos del año (Julio a Octubre), periodo en que estos animales tienen más presencia en las zonas conurbadas en busca de agua y alimento, (antropogénica), así como su presencia en las zonas de interfaz urbano-silvestre.

De un total de 20 osos negros, 14 de ellos fueron machos y 6 fueron hembras. Se realizó también un cálculo de la edad acorde a sus características físicas resultando 15 adultos, 3 juveniles y 2 oseznos. Los sitios de captura y fecha de las mismas, la edad, sexo y número de arete que se le colocó a cada oso capturado se resumen en la Tabla 7.

4.2 Características y condiciones de salud de la población muestreada

En lo que respecta en términos generales a las condiciones corporales de los ejemplares muestreados algunos presentaron deshidratación severa, desnutrición, presencia de zonas de alopecia, así como la presencia de ectoparásitos.

Tabla 7. Características de los ejemplares de oso negro muestreados en este estudio

Núm.	Fecha de captura	Arete	Edad	Sexo	Lugar de muestreo	Municipio/Estado	Coordenadas GPS (UTM)
1	19/07/2017	18/Amarillo	Adulto	Macho	Ejido El Cedral	Ramos Arizpe Coahuila	246198 2874146
2	11/08/2017	17/Azul	Adulto	Macho	Zona Mederos	Monterrey Nuevo León	371144.8 2832958.33
3	04/09/2017	18/Azul	Adulto	Macho	Ejido Las Margaritas	Santiago Nuevo León	391686.10 2803743.61
4	16/09/2017	20/Azul	Adulto	Macho	Rancho el Beveche Potrero Grande	Mina Nuevo León	359666.3 2878042.95
5	13/03/2018	Sin Arete (SI)	Juvenil	Hembra	Zona La Estanzuela	Monterrey Nuevo León	25.540089 100.273377
6	23/04/2018	05/Amarillo	Adulto	Macho	Ejido El Diamante	Arteaga/Coahuila	312256.67 2805363.48
7	11/05/2018	11/Amarillo	Adulto	Macho	Ejido San José de los Cerritos	Arteaga/Coahuila	310933 2807587
8	14/06/2018	23/Amarillo	Adulto	Macho	Ejido El Huachichil	Arteaga/Coahuila	310452 2793450
9	16/08/2018	08/Amarillo	Osezno	Macho	Ejido Los Olivos	Arteaga/Coahuila	316718.11 2797679.15
10	16/08/2018	07/Amarillo	Adulto	Hembra	Ejido El Diamante	Arteaga/Coahuila	311358.15 2807295.15

Continúa en hoja siguiente

Núm.	Fecha de captura	Arete	Edad	Sexo	Lugar de muestreo	Municipio/Estado	Coordenadas GPS (UTM)
11	24/08/18	123/Amarillo	Adulto	Hembra	Ejido Chapultepec	Arteaga/Coahuila	314619.38 2793374.27
12	24/08/18	124/Amarillo	Juvenil	Macho	Ejido Chapultepec	Arteaga/Coahuila	314619.38 2793374.27
13	24/09/18	09/Amarillo	Juvenil	Macho	Ejido El Chorro	Arteaga/Coahuila	318656 2807740
14	24/09/18	13/Amarillo	Adulto	Macho	Ejido El Huachichil	Arteaga/Coahuila	319220 2785992
15	01/10/18	125/Amarillo	Adulto	Hembra	Ejido Chapultepec	Arteaga/Coahuila	14R317070.91 2793199.45
16	22/01/19	Rojo/507007	Adulto	Hembra	Ejido Sierra Hermosa	Arteaga/Coahuila	14R312072 2799293
17	22/01/19	Rojo/507008	Osezno	Hembra	Ejido Sierra Hermosa	Arteaga/Coahuila	14R312072 2799293
18	29/01/19	Naranja/804254	Adulto	Macho	Ejido El Jagüey	Saltillo/Coahuila	14R293515.26 2793122.12
19	23/04/19	Naranja/804257	Adulto	Macho	Ejido El Mimbres	Parras/Coahuila	14R229416.492 2840153.08
20	30/04/19	Naranja/804258	Adulto	Macho	Ejido El Jagüey	Saltillo/Coahuila	14R293515.26 2793122.12

4.3 Características de estructuras en sangre en fresco

El examen microscópico de sangre en fresco se realizó a una población de 20 osos capturados, en los cuales se observó la presencia de estructuras con características flagelares en 11 machos y 6 hembras, los cuales incluyen a 3 pertenecientes al estado de Nuevo León y 14 osos correspondientes al estado de Coahuila de Zaragoza. Presentándose en un 85 % (17 animales) la presencia de estas en un total de 20 animales analizados. Solamente en 3 osos machos adultos capturados en Ramos Arizpe, y Arteaga en Coahuila (osos 1 y 6) un macho adulto capturado en Mina, Nuevo León (oso 4) no presentaron estas estructuras en sus muestras sanguíneas.

En la revisión de las muestras sanguíneas de oso negro de manera directa, se observó la presencia de estructuras con características flagelares uni y bipolares, con movimiento lento y continuo, en algunas muestras se observó la presencia de abundantes estructuras flagelares y escasos en otros, algunos se apreciaban alargados y otros ovoides como se muestra en la Figura 7, la cual es representativa de los osos analizados.

4.4 Forma y tamaño de estructuras flageladas en extendido sanguíneo de oso negro

Para establecer la morfología y el tamaño de los microorganismos observados en sangre de oso negro, se revisaron las extensiones sanguíneas realizadas a partir de muestras de sangre periférica, los cuales fueron teñidos con Giemsa (Jalmek®) y Romanowsky (HYCEL®).

En estas extensiones se encontró la presencia de estructuras con características flagelares uni y bipolares, presentándose además formas romboides, ovoides, forma de coma y algunos con extenso flagelo. A continuación, se muestran las imágenes de los microorganismos encontrados en los extendidos sanguíneos de muestras de 17 osos (Figuras de la 8 a la 24).

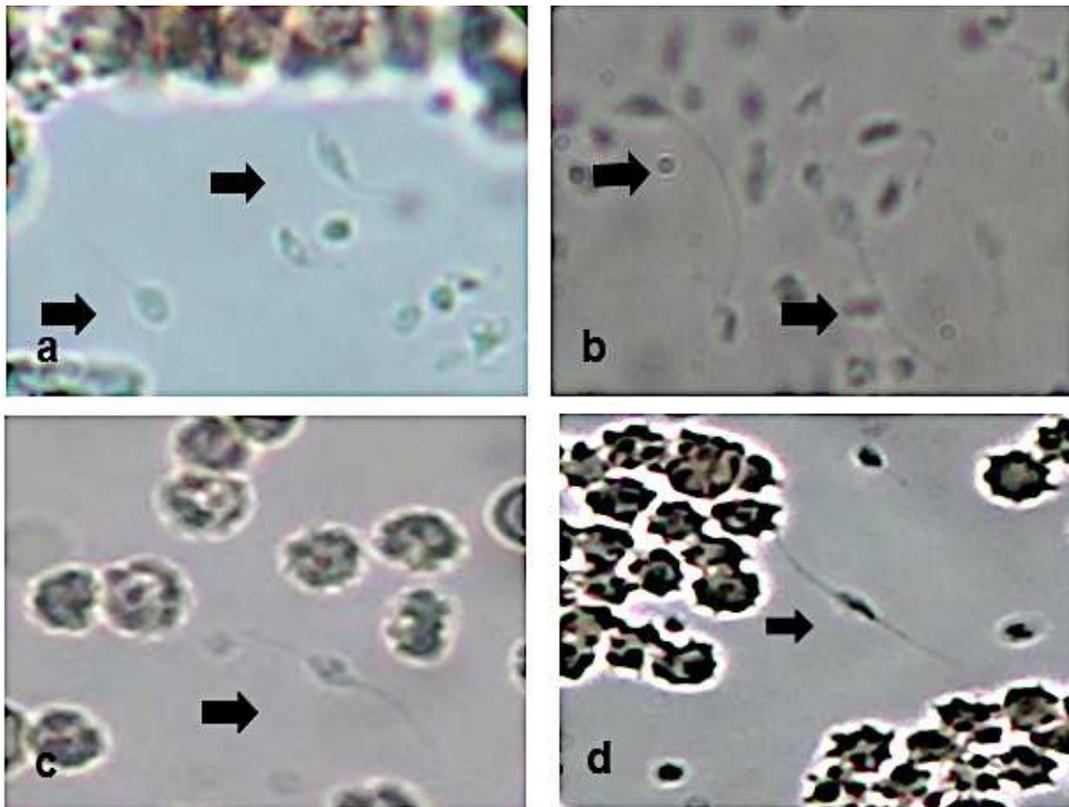


Figura 7. Resultados de la observación de muestras de sangre en fresco de oso negro analizado en este estudio. Muestras de sangre en fresco en diferentes osos analizados. a, b se aprecian formas alargadas y ovoides con un flagelo unipolar (Ver flechas). c, d formas ovoides y alargadas con flagelos bipolares (Ver flechas). 100 X.

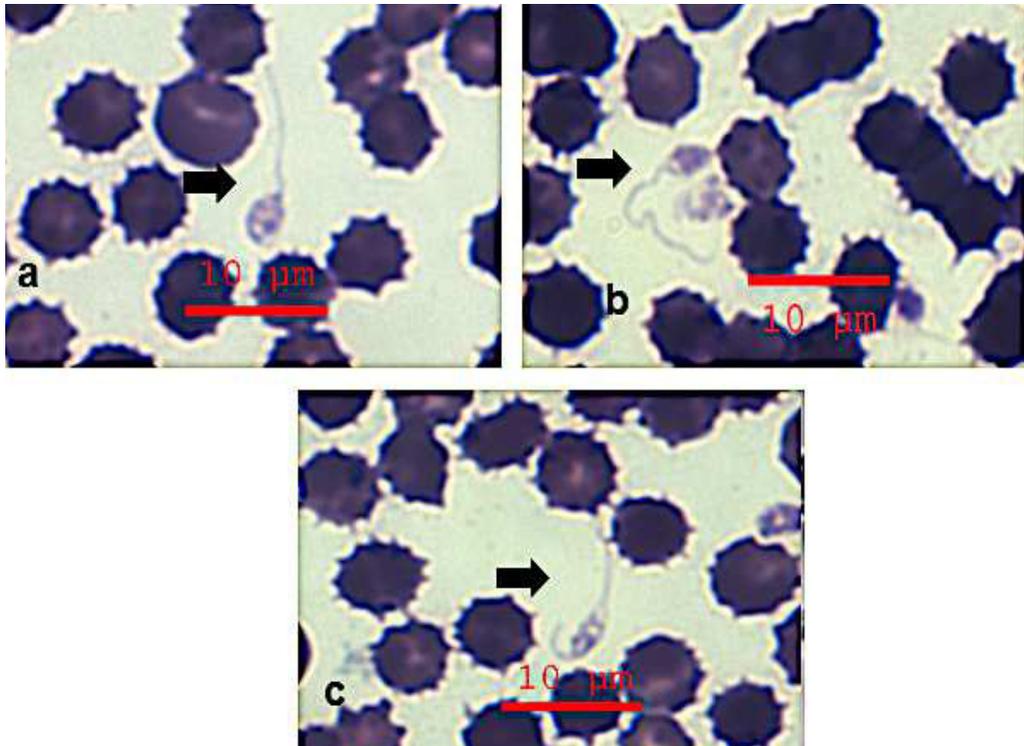


Figura 8. Microorganismos encontrados en muestras sanguíneas de un oso negro (arete 17/Azul, adulto, macho). Figura a y b, microorganismo con estructura ovoide con posible flagelo unipolar (Ver flechas). Figura c, microorganismo con estructura alargada y con flagelo bipolar. (Ver flecha) Tinción Romanowsky. 100 X. Tamaño de barra 10 μm .

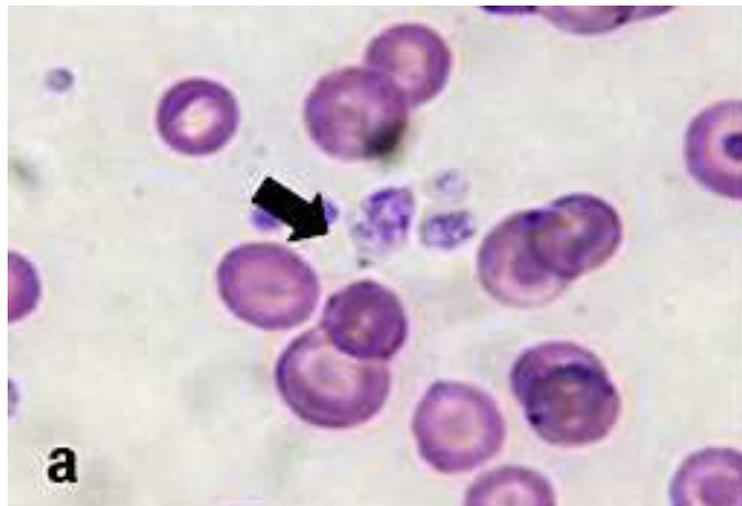


Figura 9. Microorganismo observado en sangre periférica de un oso negro, juvenil, hembra, sin arete (SI). En la imagen se puede observar una estructura romboide con citoplasma transparente y abundantes gránulos basófilos que posee un flagelo único, este microorganismo está rodeado por eritrocitos. Tinción de Romanowsky. 100 X. La flecha negra indica la estructura observada.

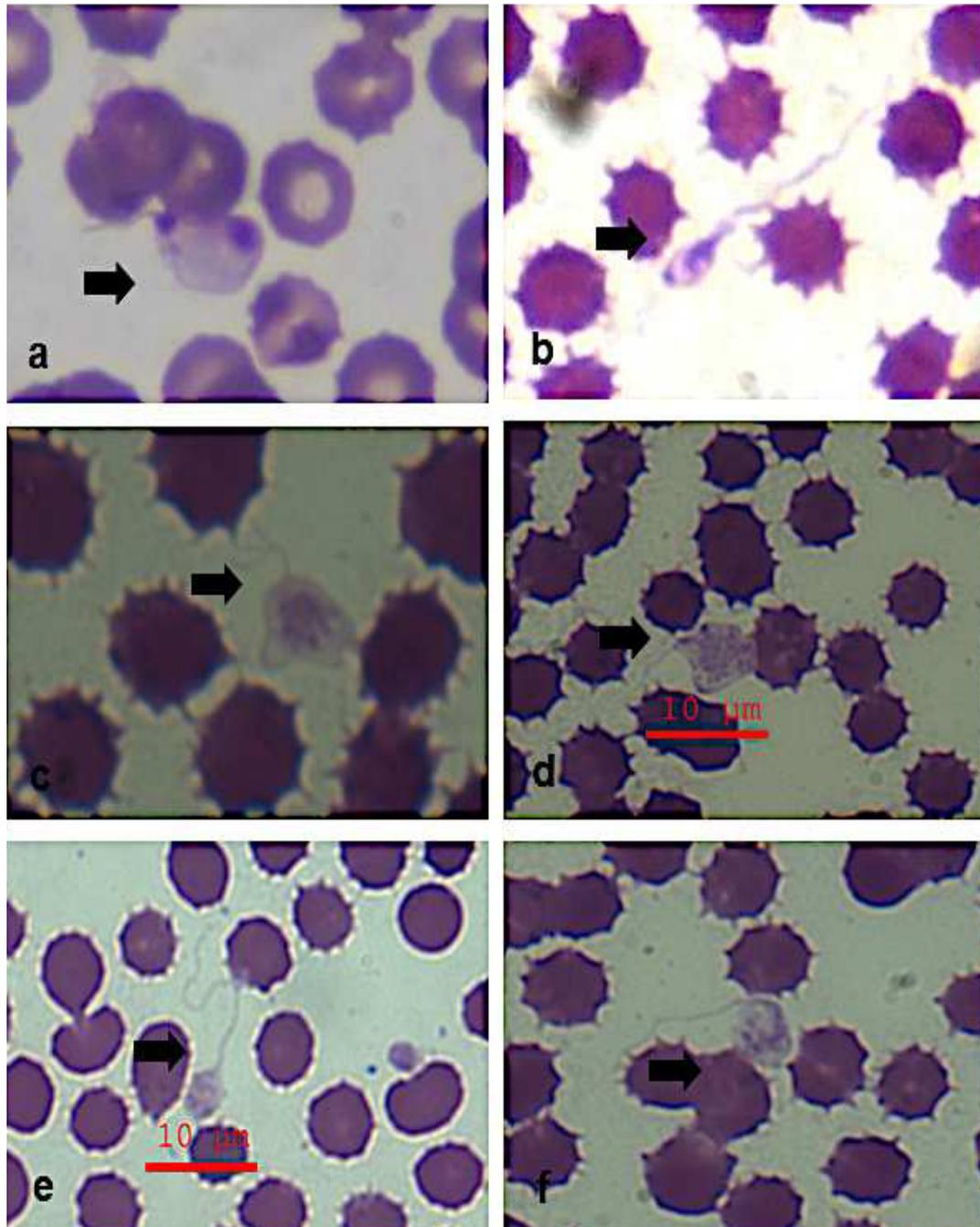


Figura 10. Microorganismos presentes en muestra de sangre de un oso negro, macho, adulto (arete 18/Azul). En las imágenes a y b, se observan microorganismos con estructura ovoidea con flagelos unipolares. (Ver flechas). Tinción de Giemsa. 100 X. Barra de tamaño 10 μm . En las imágenes c y d, se observa una estructura sin una forma definida con flagelo unipolar alargado. (Ver flechas). La imagen e y f, muestran estructuras ovoides con citoplasma granular y flagelo unipolar alargado. (Ver flechas). Tinción de Romanowsky. 100 X. Barra de tamaño 10 μm .

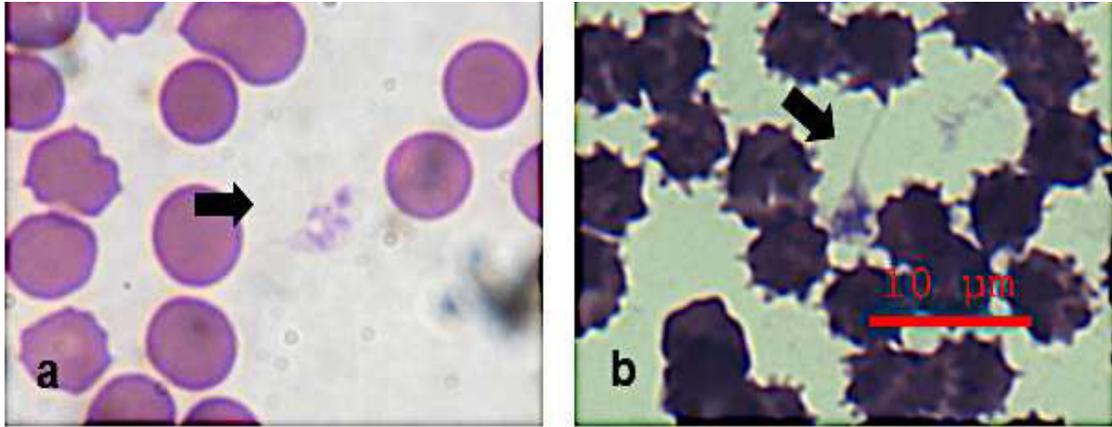


Figura 11. Microorganismo observado en sangre periférica de un oso negro, adulto, macho (arete 11/Amarillo). En la imagen a, se puede observar una estructura romboidal, en forma de coma con citoplasma granular y flagelo unipolar. (Ver flecha). La imagen b, muestra un microorganismo de estructura ovoide, con flagelo unipolar, alrededor de numerosos eritrocitos. (Ver flecha). Tinción de Romanowsky. 100 X. Barra de tamaño equivalente a 10 μm .

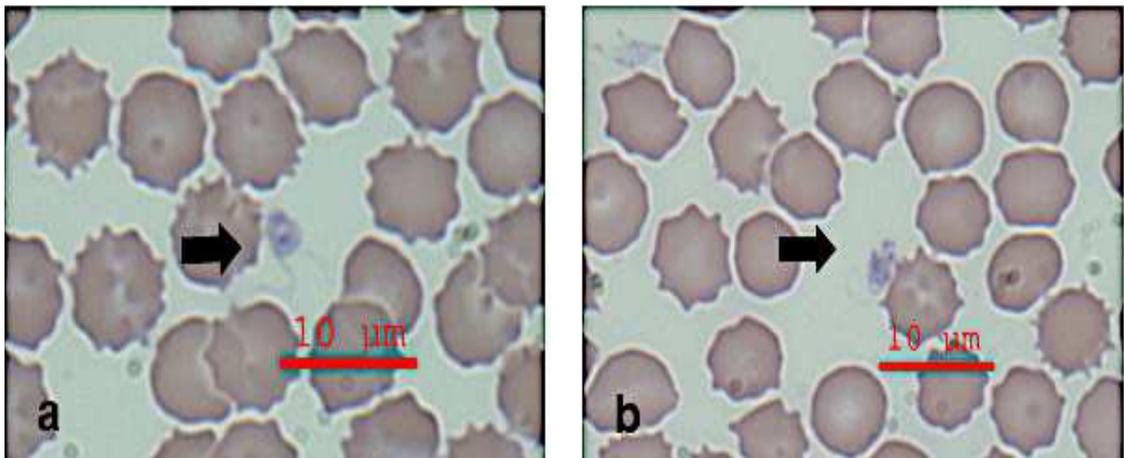


Figura 12. Microorganismo observado en sangre periférica de un oso negro, adulto macho (arete 23/Amarillo). La imagen a, muestra un microorganismo con estructura ovoide, con flagelos bipolares alargados (flecha). En la imagen b, se observa una estructura ovoide, con flagelo unipolar, el tamaño de esta estructura se puede comparar con el de los eritrocitos que la rodean (flecha). Tinción de Giemsa. 100 X. Barra de tamaño equivalente a 10 μm .

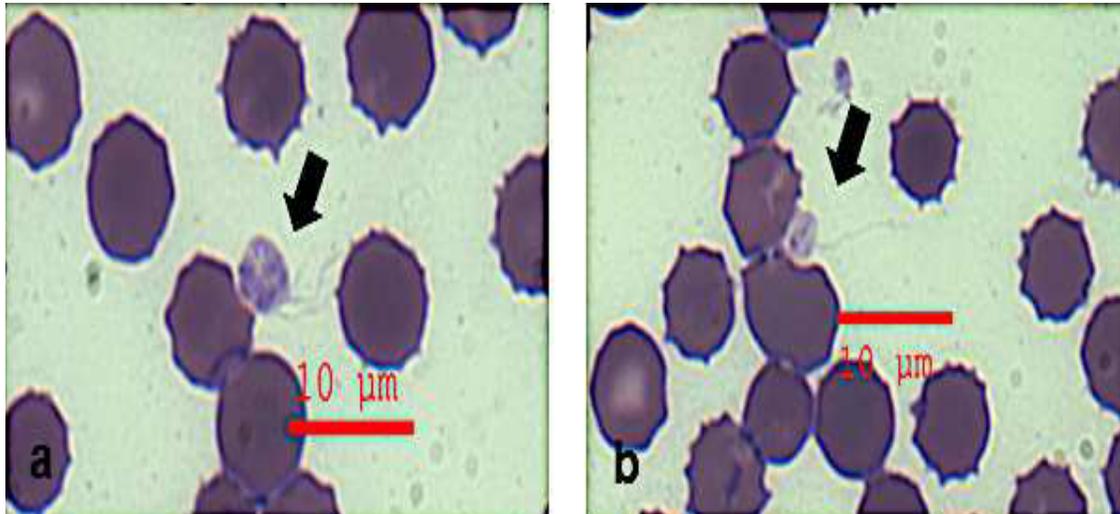


Figura 13. Microorganismo observado en sangre periférica de un oso negro, osezno, macho (arete 08/Amarillo). La imagen a, muestra un microorganismo con estructura redonda con múltiples flagelos y citoplasma granular basófilo (flecha). En la imagen b, se aprecia una forma ovoide con flagelo unipolar, alrededor de esta estructura se pueden apreciar eritrocitos abundantes. (Ver flecha). Tinción de Romanowsky. 100 X. Barra equivale a 10 µm.

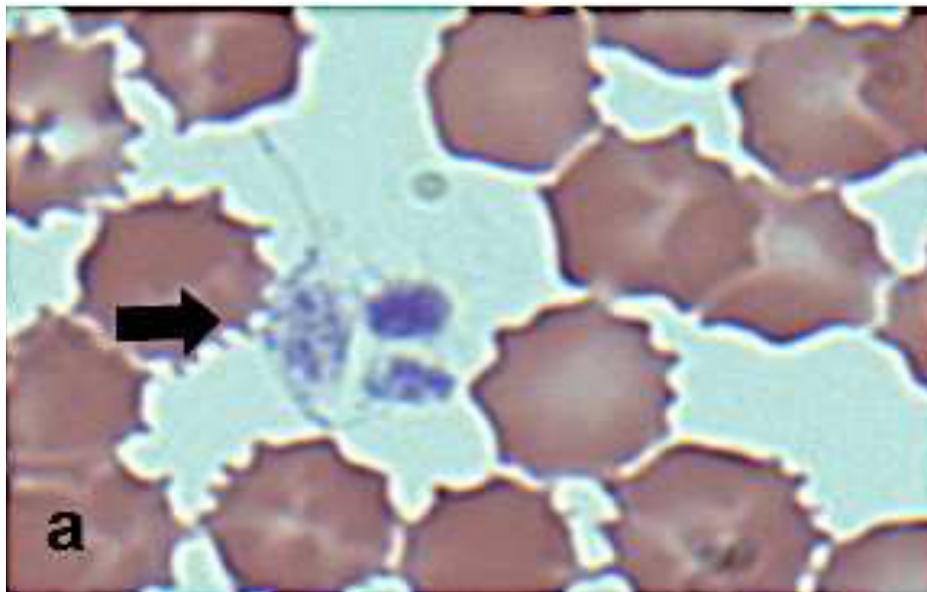


Figura 14. Microorganismo observado en sangre periférica de un oso negro, hembra, adulta (arete 07/Amarillo). En la imagen a, se observa un microorganismo con estructura romboide con flagelos bipolares y citoplasma granular basófilo. (flecha). Tinción de Giemsa. 100 X.

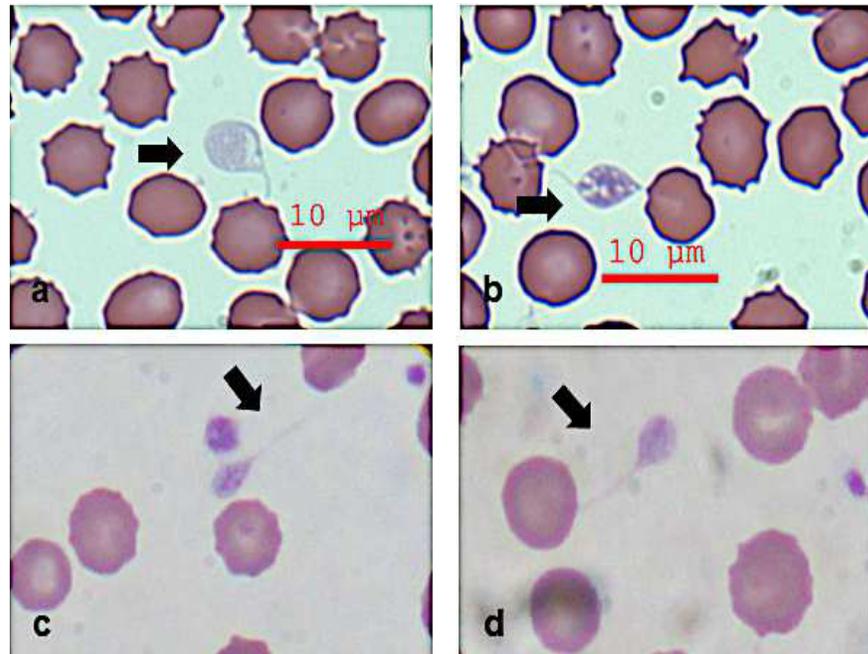


Figura 15. Microorganismos observados en sangre periférica de un oso negro, hembra, adulta (arete 123/Amarillo). Las imágenes a, b, muestran microorganismos con estructura ovoide de citoplasma transparente y gránulos basófilos, se aprecia también un flagelo unipolar (flechas). Las imágenes c, d, se aprecia una forma ovoide con flagelo unipolar. Tinción de Giemsa. 100 X. La barra de tamaño equivale a 10 μm .

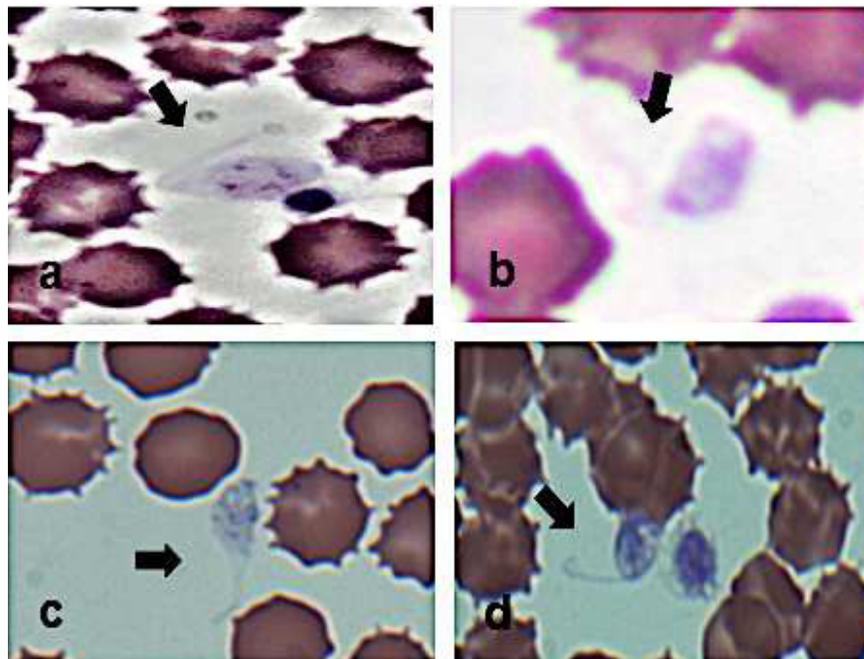


Figura 16. Microorganismos observados en sangre periférica de un oso negro, juvenil, macho (124/Amarillo). Las imágenes a, b, c y d; muestran microorganismos con estructuras romboide con flagelo unipolar y citoplasma granular. (flechas). Tinción de Giemsa. 100 X.

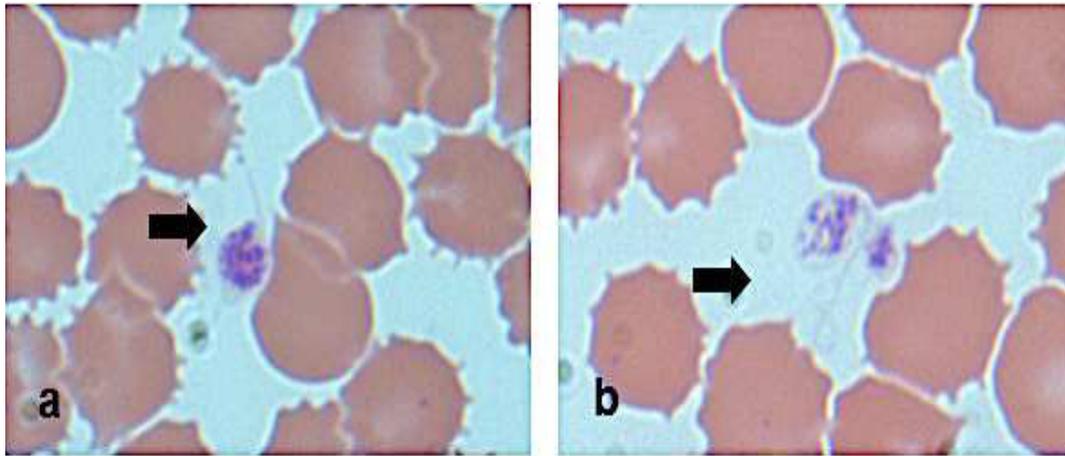


Figura 17. Microorganismos observados en sangre periférica de un oso negro, juvenil, macho (arete 09/Amarillo). La imagen a, muestra un microorganismo con estructura ovoide con flagelo bipolar y citoplasma granular. (flecha). En la imagen b, se observa una estructura romboide, con flagelo unipolar y citoplasma granular. (flecha). Tinción de Giemsa. 100 X.

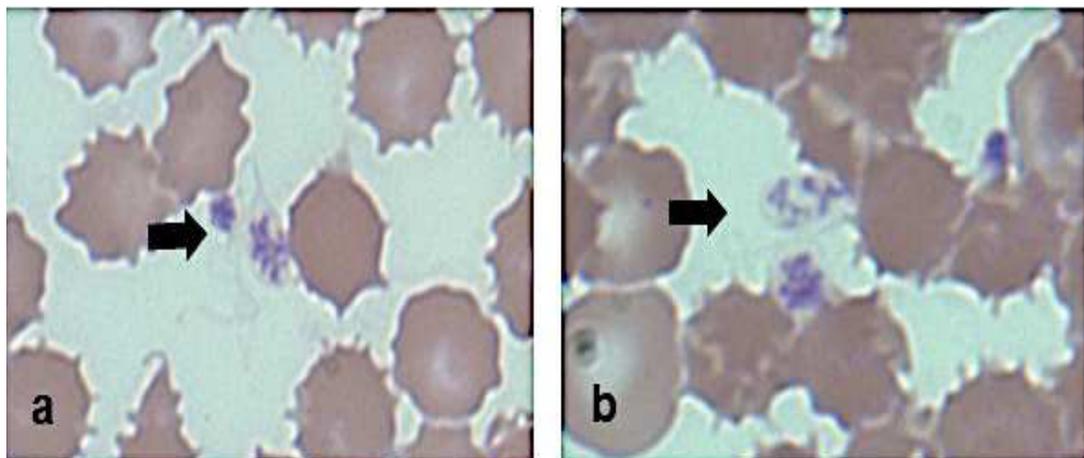


Figura 18. Microorganismos observados en sangre periférica de un oso negro, adulto, macho (arete 13/Amarillo). Microorganismos de estructura romboide con flagelo unipolar y citoplasma ligeramente granular pueden observarse en las imágenes a y b. Tinción de Romanowsky. 100 X.

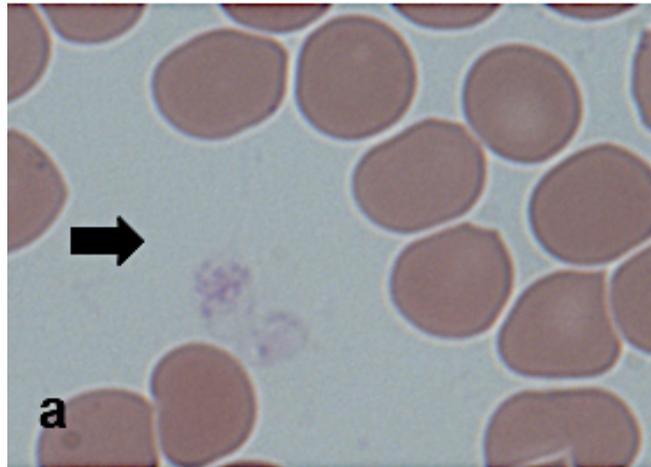


Figura 19. Microorganismo observado en sangre periférica de un oso negro, hembra, adulta (arete 125/Amarillo). La imagen muestra un organismo con estructura romboide de citoplasma transparente con flagelo unipolar, rodeada de eritrocitos (flecha). Tinción de Giemsa. 100 X.

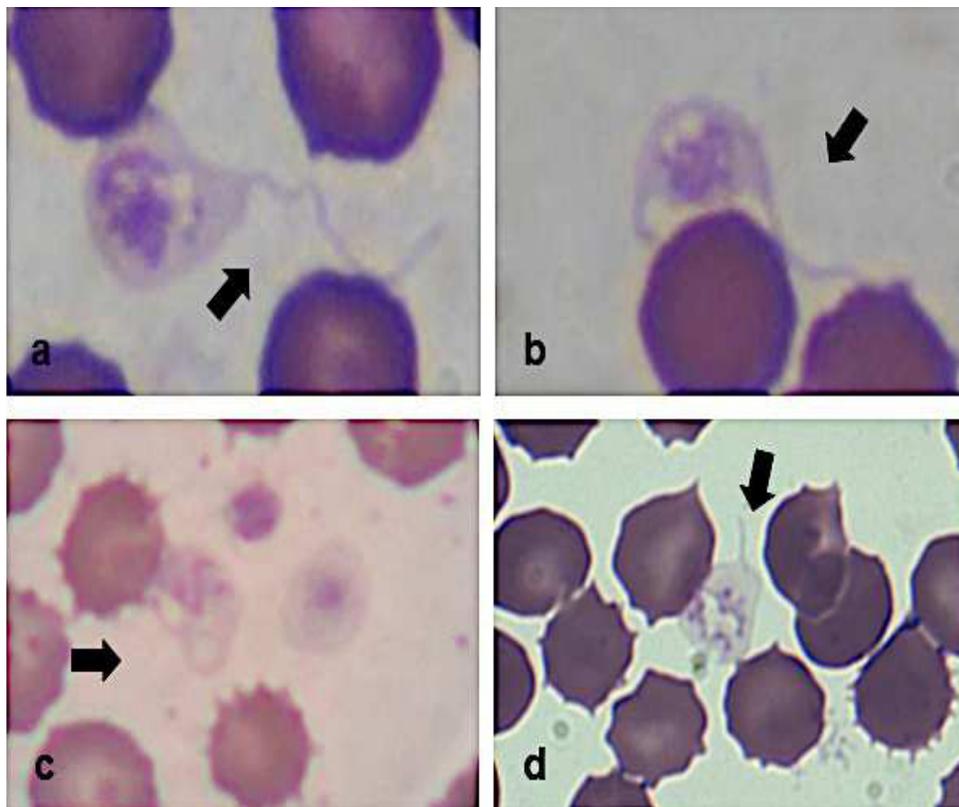


Figura 20. Microorganismos observados en sangre periférica de un oso negro, hembra, adulta (arete Rojo/507007). En la imagen a, se observa una estructura romboide con flagelo unipolar y citoplasma granular basófilo (flecha). La imagen b, muestra una estructura ovoide con flagelo bipolar y citoplasma granular. (flecha). Tinción de Romanowsky. 100 X. Las imágenes c y d, muestran estructuras amorfas con flagelos unipolares y citoplasma granular (flechas). Tinción de Giemsa y Romanowsky, respectivamente. 100 X.

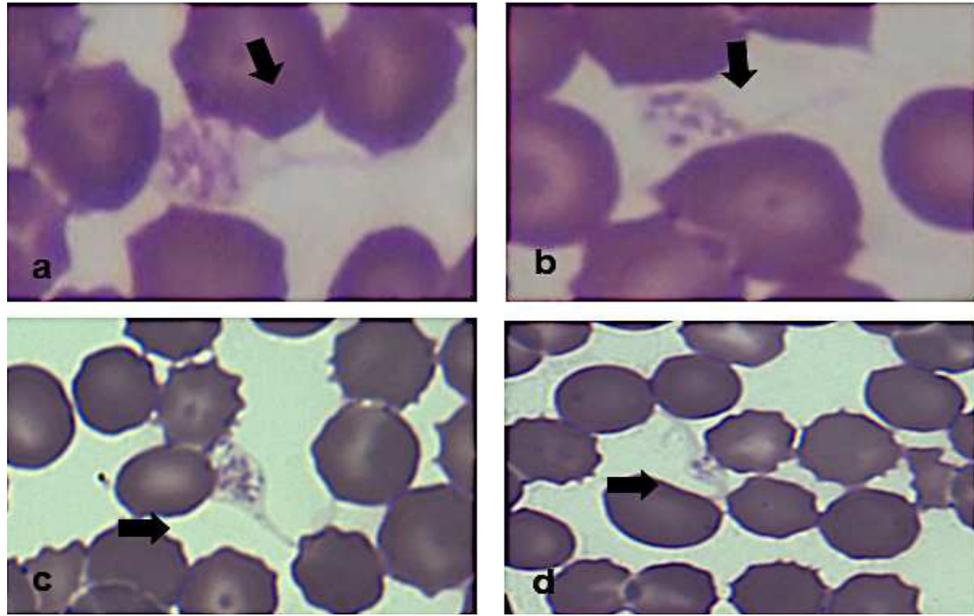


Figura 21. Microorganismos observados en sangre periférica de un oso negro, osezno, hembra (arete Rojo/507008). Las imágenes a, b y c; muestran estructuras ovoides con flagelos unipolares y citoplasma ligeramente granular basófilo (flechas). En la imagen d, se aprecia una estructura ovoide con flagelo bipolar (flecha). Tinción de Giemsa y de Romanowsky. 100 X.

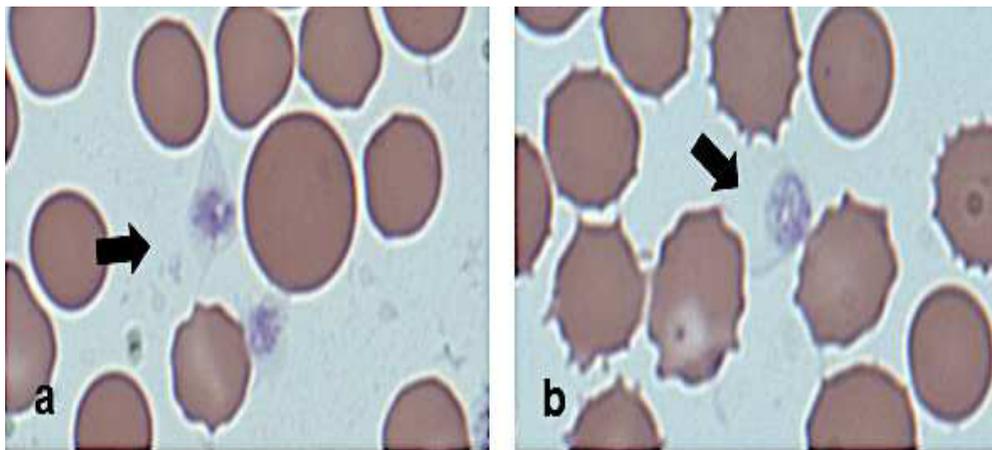


Figura 22. Microorganismos observados en sangre periférica de un oso negro, adulto, macho (arete Naranja/804254). a, estructura romboide con flagelo unipolar y citoplasma ligeramente granular, rodeado de eritrocitos. (Ver flecha). b, estructura ovoide con flagelo unipolar y citoplasma ligeramente granular. (Ver flecha). Tinción de Romanowsky. 100 X.

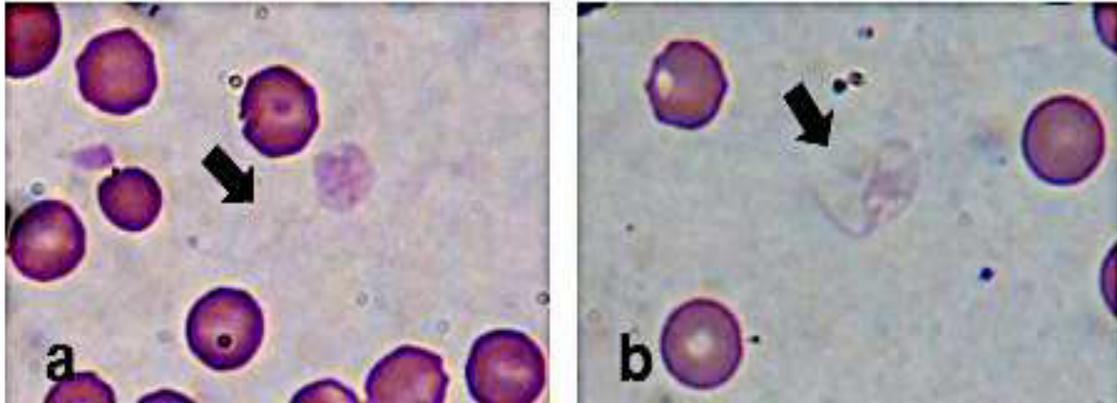


Figura 23. Microorganismos observados en sangre periférica de un oso negro, macho, adulto (arete Naranja/804257). Las imágenes a y b, muestran estructuras ovoides con flagelos unipolares y citoplasma ligeramente granular. (flecha). Tinción de Giemsa. 100 X.

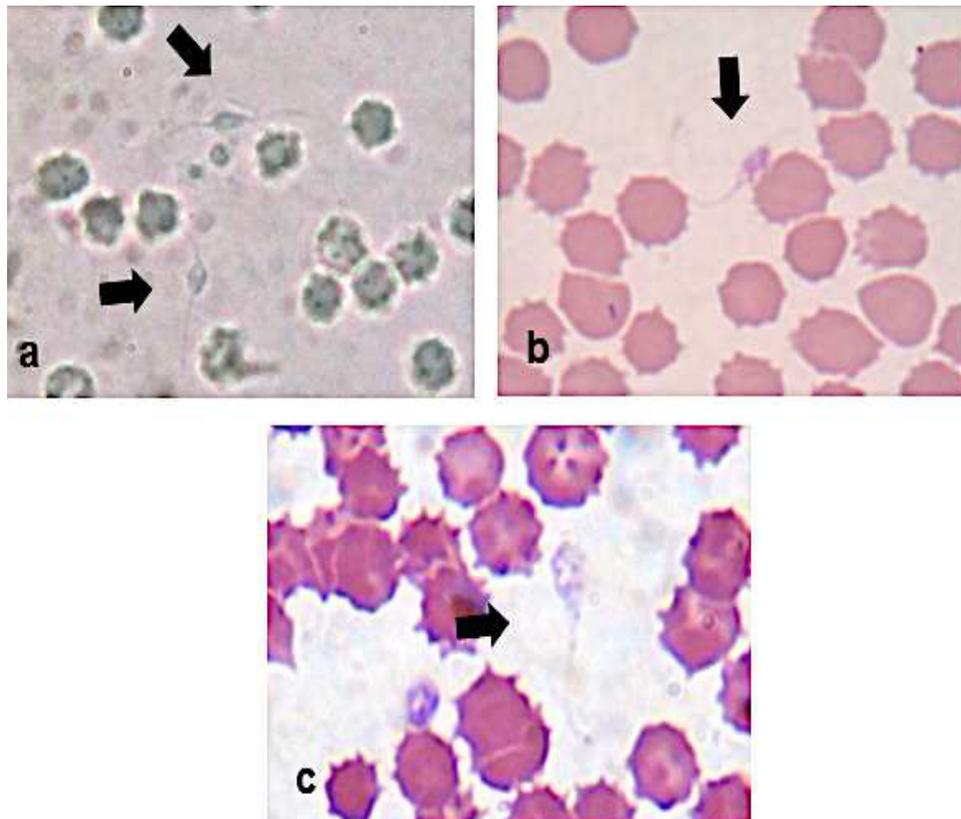


Figura 24. Microorganismo observado en sangre periférica de un oso negro, macho, adulto (arete Naranja/804258). La imagen a, muestra estructuras ovoides con flagelos bipolares entre eritrocitos (flechas) en un preparado de muestra de sangre en fresco. 100 X. Las imágenes b y c, muestran estructuras ovoides y romboides con flagelo unipolar y citoplasma ligeramente granular. (flecha) en muestras fijadas y con tinción de Giemsa. 100 X.

4.5 Identificación de microorganismos eucariotas en la sangre periférica del oso negro por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

4.5.1 PCR para detección de miembros de la Familia Trypanosomatidae

En 5 de las 17 muestras en las que se observaron estructuras con características flagelares, se realizó una PCR que amplifica un segmento del ADN que codifica para el ARNr, subunidad 18S de Tripanosomatidos (Tab. 8).

Esta PCR tiene un producto de amplificación entre 600 y 900 pb. El control positivo que se utilizó para esta PCR fue ADN extraído de una cepa de *T. cruzi*, la cual presento un producto de amplificación de 733 pb (Figura 25).

De los 5 osos analizados solo 4 presentaron dos amplicones con tamaños aproximados ente 600 y 900 pb. Los osos con número de arete 11/Amarillo y 23/Amarillo presentaron amplificados a ambos tamaños y los osos con arete 18/Azul y SI, los mismos amplificados, pero más tenues. Esto sugiere que los microorganismos en estos 4 osos encontrados en sangre periférica pudieran ser Tripanosomatidos (Fig. 25 y Tab. 8). De igual forma, y con una banda de ADN más tenue de aproximadamente 733pb, presentándose este resultado en las muestras de dos osos (11/Amarillo y 23/Amarillo), que corresponde con el tamaño de *T. cruzi* (Fig. 25 y Tab.8). Lo que sugiere que estos microorganismos en los osos pudieran ser *T. cruzi*.

En la siguiente imagen se muestran los amplicones generados en la PCR para Tripanosomatidos. Los análisis de las muestras se realizaron por duplicado y triplicado. La descripción de cada oso al cual corresponden los carriles se localiza en el pie de Figura 25, así como los amplificados presentados.

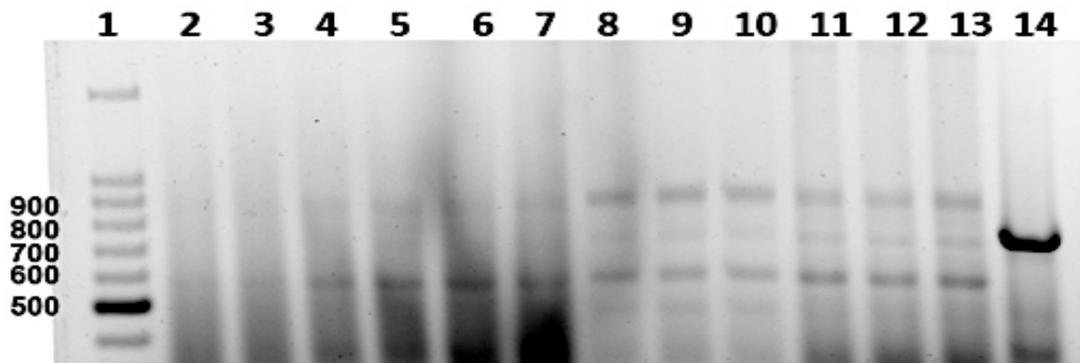


Figura 25. Electroforesis de los productos de PCR de un segmento de ADN que codifica para el ARNr, 18S de Tripanosomatidos. Se realizó un PCR con primers específicos para amplificar ADN del grupo de los Tripanosomatidos. **Carril 1.** Marcador de peso molecular de 100 pb. **Carril 2 y 3:** Muestras de ADN del oso 17/Azul, **Carril 4 y 5.** Muestras de ADN del oso 18/Azul, **Carril 6 y 7.** Muestras de ADN de oso SI, **Carril 8, 9 y 10:** Muestras de ADN del oso 11/Amarillo, **Carril 11, 12 y 13.** Muestra de ADN del oso 23/Amarillo, **Carril 14.** Control positivo, ADN de *T. Cruzi* (733 pb).

En la Tabla 8 se presenta el resultado de PCR para Tripanosomatidos, así como la identificación de cada oso como el arete, color, edad, sexo y el lugar de muestreo.

Tabla 8. Relación de osos analizados por PCR para Tripanosomatidos.

Núm.	Arete	Edad	Sexo	Lugar de muestreo	PCR Tripanosomatidos 600-900 pb
1	17/Azul	Adulto	Macho	Zona Mederos Monterrey NL.	No presento amplificado
2	18/Azul	Adulto	Macho	Ejido Las Margaritas Santiago NL.	Amplificado 600-900 pb
3	Sin Arete (SI)	Juvenil	Hembra	Zona Estanzuela Monterrey NL.	Amplificado 600-900 pb
4	11/Amarillo	Adulto	Macho	Ejido San José de los Cerritos Arteaga Coah.	Amplificado 600-900 pb 733 pb
5	23/Amarillo	Adulto	Macho	Ejido El Huachichil Arteaga Coah.	Amplificado 600-900 pb 733 pb

4.5.2 PCR para detección de miembros de la Familia Amoebidae

De las 17 muestras en las que se observaron estructuras con características flagelares en 9 de ellas se realizó una PCR específico para la Familia Amoebidae que amplificaba un segmento de ADN que codifica para el ARNr, 18S. Las muestras de sangre que fueron analizadas por esta técnica fueron las que se tomaron a partir de los osos con número de arete 17/Azul, SI, 11/Amarillo, 23/Amarillo, 123/Amarillo, 124/Amarillo, Rojo/507007, Rojo/507008, Naranja/804254).

El producto de amplificación de esta PCR presentó un tamaño de 750pb, banda que se presentó en el control positivo de *Entamoeba* sp. ya que todas las muestras analizadas fueron negativas. Los resultados de la electroforesis de los productos de PCR de algunas muestras procesadas se muestran en la Figura 26.

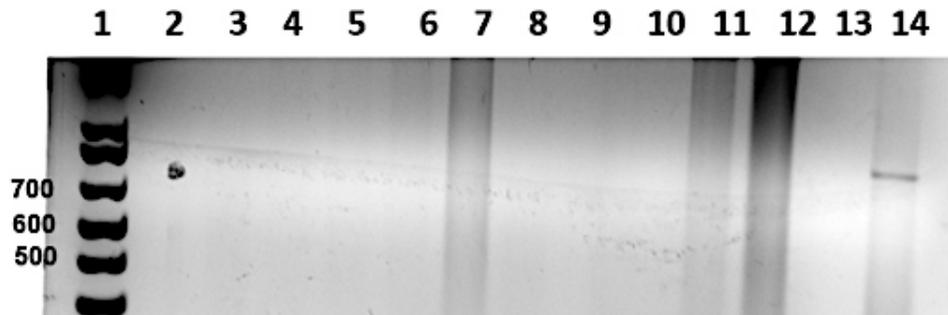


Figura 26. Electroforesis de los productos de PCR de un fragmento de ADN que codifica para el ARN ribosómico, subunidad 18S de Amebas. Se realizó un PCR con primers que amplificaban un segmento de ADN de 750 pb específico para miembros de la Familia *Amoebidae*. **Carril 1.** Marcador de peso molecular de 100 pb. **Carril 2.** Muestra de ADN de oso 17/Azul, **Carril 3.** Muestras de ADN de oso SI, **Carril 4.** Muestras de ADN del oso 11/Amarillo, **Carril 5.** Muestra de ADN del oso 23/Amarillo, **Carril 6.** Muestra de ADN del oso 123/Amarillo, **Carril 7.** Muestra de ADN del oso 124/Amarillo, **Carril 8.** Muestra de ADN del oso Rojo/507007, **Carril 9.** Muestra de ADN del oso Rojo/507008, **Carril 10.** Muestra de ADN del oso Naranja/804254, **Carril 11.** Control negativo (ADN negativo a *Entamoeba* sp.), **Carril 12.** Control negativo (ADN negativo a *Entamoeba* sp.). **Carril 13.** Control negativo de contaminación (Agua bidestilada), **Carril 14.** Control positivo (*Entamoeba* sp, 750 pb).

4.5.3 PCR para detección de miembros de la Familia Trichomonadidae

Otro de los microorganismos eucariotas con estructura similar a las observadas en los frotis sanguíneos son las *Trichomonas*. Para determinar si alguno de estos microorganismos pertenecía a este grupo, se realizó en 9 de las 17 muestras una PCR que amplificaba una secuencia de ADN específica para la Familia Trichomonadidae (ITS1-5.8s-ITS2) de aproximadamente 350-450pb. Como control positivo se utilizó ADN extraído de *Trichomonas vaginalis*, presentando un amplicón de 350-450 pb (Figura 27).

Las muestras de sangre periférica que se analizó con esta técnica fueron las que se tomaron de los osos con los siguientes números de arete: 17/Azul, SI,

11/Amarillo, 23/Amarillo, 123/Amarillo, 124/Amarillo, Rojo/507007, Rojo/507008, Naranja/804254.

Con esta técnica no se logró amplificar en ninguna de las muestras de osos algún producto de PCR con el tamaño específico para *Trichomonas* (Fig. 27).

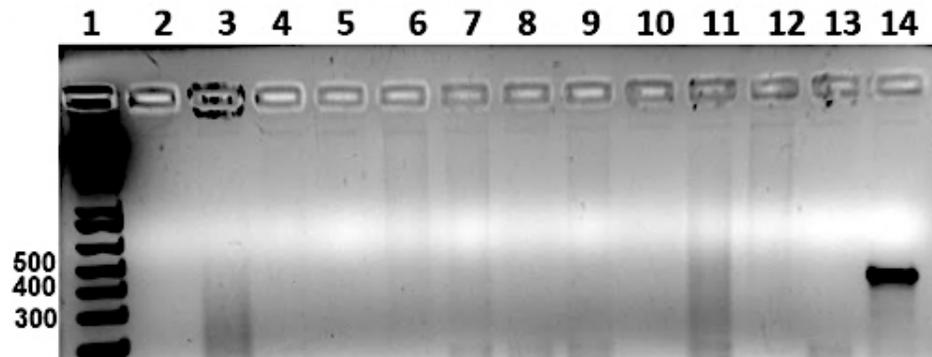


Figura 27. Electroforesis de los productos de PCR amplificando la secuencia intergénica ITS1-5.8s-ITS2 de Trichomonadidae. Con oligonucleótidos diseñados para amplificar un producto de 350-450 pb. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: muestra de ADN de oso 17/Azul, Carril 3: oso SI, Carril 4: 11/Amarillo, Carril 5: 23/Amarillo, Carril 6, 7: 123/Amarillo, Carril 8: 124/Amarillo, Carril 9: Rojo/507007, Carril 10: Rojo/507008, Carril 11: Naranja/804254, Carril 12: Control negativo (DNA negativo a *Trichomonas*), Carril 13: Control negativo de contaminación (Agua bidestilada), Carril 14: Control positivo *Trichomonas vaginalis* (350-450 pb).

4.5.4 PCR para detección de Eucariotas no mamíferos

Para establecer que las muestras sanguíneas de osos muestreados presentaban estructuras, con movimiento propio impulsados por flagelos y con características de parásitos unicelulares eucariotas, se utilizó un protocolo de PCR que amplifica un segmento de ADN específico de eucariotas (ARNr, 18S), se utilizó para este protocolo un oligonucleótido (primer Mammal_block_I-short_1391f) que

bloqueaba la amplificación de ADN de mamíferos (Vestheim y Jarman, 2008). Utilizando este protocolo se logró demostrar que los productos de PCR amplificados pertenecían a organismos eucariotas presentes en la muestra, pero no al oso (cuando se utilizaba el primer bloqueador).

Para validar el protocolo, se utilizó primero el ADN extraído a partir de un ratón como control del mamífero, un ratón infectado con una cepa de *T. cruzi* (control de infección eucariota mamífero/no mamífero) y ADN extraído a partir de una cepa de *T. cruzi* (control de eucariota no mamífero). Donde se pudo observar amplificación de 260 +/- 50 pb con los primers universales utilizados para amplificar el segmento de ADN blanco de eucariotas. Cuando se utilizó el primer bloqueador de mamífero el control que representaba al mamífero (ratón no infectado) salió negativo, no así la muestra del ratón infectado con *T. cruzi* y la muestra de *T. cruzi*.

En la siguiente imagen de electroforesis se presenta una muestra representativa de 4 osos (17/Azul, 18/Azul, SI y 11/Amarillo), así como ADN de ratón infectado, ADN de cepa de *T. cruzi*, ADN de ratón no infectado y la muestra control, a los cuales se le adicionó el primer de bloqueo de mamífero, presentándose en la muestra de oso (SI) amplificación para eucariotas de aproximadamente 260 +/- 50 pb, así como en el ratón infectado por *T. cruzi*, y el ADN de la cepa de *T. cruzi*, pero no mostró amplificado en el ADN de ratón no infectado ni en el control negativo, lo que nos indica la eficacia de los primer. Por otro lado, no se utilizó el

primer de bloqueo en ADN de ratón no infectado el cual mostró amplificación como se esperaba, así mismo el control negativo no amplificó (Figura 28). La lista de los osos analizados y positivos a esta técnica se describen en la tabla 9.

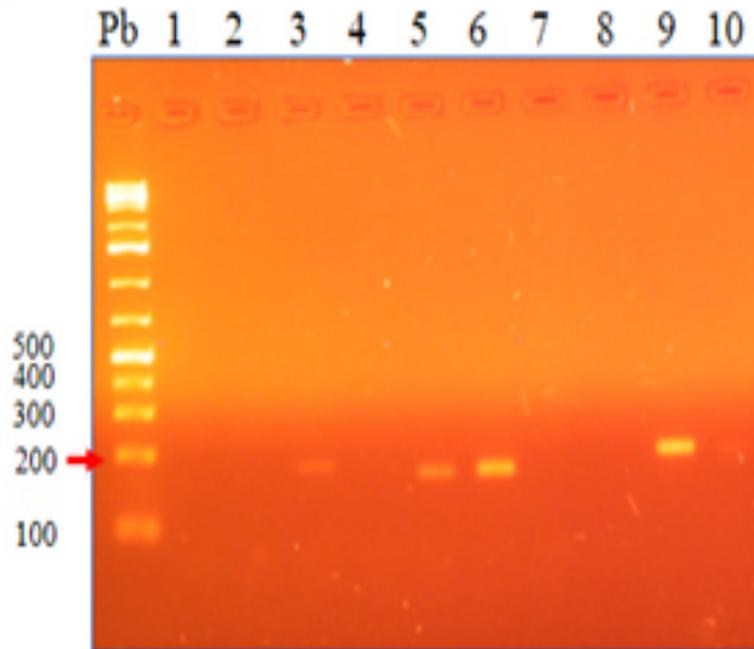


Figura 28. Electroforesis de los productos de PCR amplificados a partir de ADN que codifica para el ARNr, 18S utilizando un primer de bloqueo para mamífero. Se realizó un PCR para amplificar un segmento de ADN característico de eucariotas, pero bloqueando la amplificación del ADN de mamíferos (oso negro) que confirmó la presencia de microorganismos eucariotas en sangre de osos negro. **Carril Pb.** Marcador de Peso Molecular de 100 pb. **Carril 1.** Muestra de ADN extraída a partir de sangre periférica del oso negro con arete 17/Azul. **Carril 2.** Muestra de ADN extraída a partir de sangre periférica del oso negro con arete 18/Azul. **Carril 3.** Muestra de ADN extraída a partir de sangre periférica del oso negro SI. **Carril 4.** Muestra de ADN extraída a partir de sangre periférica del oso negro con arete 11/Amarillo. **Carril 5.** ADN extraído a partir de tejidos de mamífero (ratón) infectado con cepa de *T. cruzi* (control eucariota mamífero/no mamífero). **Carril 6** ADN extraído a partir de una cepa de *T. cruzi* (control de eucariota no mamífero). **Carril 7.** ADN extraído a partir de muestras de ratón no infectado (control de eucariota/mamífero) bloqueado. **Carril 8:** Control negativo de contaminación (Agua bidestilada). **Carril 9.** ADN extraído a partir de ratón no infectado (eucariota/ mamífero) (No bloqueador). **Carril 10.** Control Negativo (Agua bidestilada).

Tabla 9. Relación de osos negros analizados por PCR para detección de eucariotas no mamíferos.

Núm.	Arete	Edad	Sexo	Lugar de muestreo	PCR Eucariotas no mamíferos 260+/-50 pb
1	17/Azul	Adulto	Macho	Zona Mederos Monterrey NL.	Amplificado 260+/-50 pb
2	18/Azul	Adulto	Macho	Ejido las Margaritas Santiago NL.	Amplificado 260+/-50 pb
3	Sin Arete (SI)	Juvenil	Hembra	Zona Estanzuela Monterrey NL.	Amplificado 260+/-50 pb
4	11/Amarillo	Adulto	Macho	Ejido San José de los Cerritos Arteaga Coah.	Amplificado 260+/-50 pb
5	23/Amarillo	Adulto	Macho	Ejido El Huachichil Arteaga Coah.	Amplificado 260+/-50 pb
6	08/Amarillo	Osezno	Macho	Ejido Los Olivos Arteaga Coah.	Amplificado 260+/-50 pb
7	07/Amarillo	Adulto	Hembra	Ejido El Diamante Arteaga Coah.	Amplificado 260+/-50 pb
8	123/Amarillo	Adulto	Hembra	Ejido Chapultepec Arteaga Coah.	Amplificado 260+/-50 pb
9	124/Amarillo	Juvenil	Macho	Ejido Chapultepec Arteaga Coah.	Amplificado 260+/-50 pb
10	09/Amarillo	Juvenil	Macho	Ejido El Chorro Arteaga, Coah.	Amplificado 260+/-50 pb
11	13/Amarillo	Adulto	Macho	Ejido el Huachichil Arteaga, Coah.	Amplificado 260+/-50 pb
12	125/Amarillo	Adulto	Hembra	Ejido Chapultepec Arteaga, Coah.	Amplificado 260+/-50 pb

5 DISCUSIÓN

El constante crecimiento de la población humana, así como la invasión de áreas protegidas naturales provocan que la presencia de la fauna silvestre sea cada vez más frecuente en las zonas de interfaz-urbano silvestre, esto implica nuevos nichos ecológicos para animales superiores y los posibles microorganismos que causan enfermedades en poblaciones animales silvestres, lo que a su vez representa un riesgo para los animales domésticos y el propio hombre (Kaeslin et al., 2013). Existe muy poca evidencia documentada sobre el tipo de patógenos que afecta la fauna silvestre debido a las dificultades técnicas que implican los estudios epidemiológicos en estas especies.

Sin embargo, en las últimas décadas, los esfuerzos por proteger especies en peligro de extinción o que han sido involucradas en el surgimiento de enfermedades emergentes en animales domésticos o de tipo zoonótico han permitido un mejor conocimiento de aquellos agentes infecciosos que afectan a la fauna silvestre, su ciclo de vida y la patología que en ellos se ocasiona. (Thompson y Polley, 2014). En México no hay disponibilidad de información debido a la escasez de estudios que al respecto se han realizado, por lo que los estudios comparativos solo se limitan a la literatura disponible en otros países. Por ejemplo, En Maryland, E.U.A., Bronson detectó, la presencia de anticuerpos contra el virus de Distemper canino en osos negros, así mismo Stephenson en California, E.U.A., reportó una prevalencia de un 15% para el mismo virus

presente en la especie antes mencionada, así como un 0.6% para el parvovirus canino (Bronson et al., 2014; Stephenson et al., 2015).

Con respecto a este tema, en el Noreste de México los esfuerzos realizados por grupos de investigación en Fauna Silvestre, como el dirigido por el Dr. Carrera Treviño han mantenido un monitoreo constante de las poblaciones de osos negros permitiendo identificar patógenos zoonóticos en esta zona por ejemplo la detección de *Cryptosporidium* spp. en oso negro (Carrera-Treviño et al., 2019). Otros investigadores han encontrado en mapaches de la zona *Baylisascaris procyonis*, nemátodo que puede ser transmitido al humano, así como el virus de Distemper canino con alto potencial de transmisión a caninos domésticos y otros felinos silvestres (Trejo-Chávez et al., 2017). Otros virus de alta transmisión entre caninos domésticos y silvestres fueron recientemente encontrados en coyotes en el área, el parvovirus canino tipo 2 C (Cedillo-Rosales et al., 2019).

Por otro lado, el Noreste de México, en especial la zona de muestreo para este estudio, cuenta con un medio ambiente adecuado que permite el desarrollo y proliferación de garrapatas, mosquitos y otros vectores que pueden transmitir algunos patógenos entre poblaciones de animales silvestres, domésticos y el hombre, como lo es el ectoparásito *Dermacentor variabilis* encontrado en osos negros capturados en esta zona (Carrera-Treviño et al., 2019).

Tomando en cuenta estos antecedentes, se decidió establecer las condiciones y estado de salud que presentaron los osos negros que fueron capturados para su reubicación, en zonas conurbanas y rurales del estado de Nuevo León y

Coahuila. Entre otros procesos que se realizaron a estos ejemplares capturados y reubicados fueron, el aretado para su identificación, el establecimiento del sexo y edad, su condición física y la toma de muestras para diferentes estudios, entre ellas la de sangre periférica que fue el material de muestra para el estudio realizado en esta tesis.

Es importante señalar que el estado de salud de estos animales variaba dependiendo de la época del año, en algunos casos se presentaban un alto grado de deshidratación, algunos presentaron ectoparásitos o condiciones corporales pobres, siendo estas condiciones favorables para la presentación de enfermedades en esta especie.

En total se capturaron para su reubicación 20 osos negros que variaron en edad, sexo, condición corporal de Junio de 2017 hasta Abril del 2019, siendo la mayoría de ellos capturados en el estado de Coahuila y el resto en distintos municipios del estado de Nuevo León.

Sorprendentemente en un alto porcentaje (85%) de los ejemplares muestreados se encontraron abundantes estructuras flageladas con distintas formas y tamaños en sangre periférica, las cuales, no presentaron morfología o motilidad similar con respecto a otros hemoparásitos encontrados en animales de fauna silvestre y domésticos.

Dentro de los parásitos hemoflagelados más frecuentemente encontrados en fauna silvestre, animales domésticos e inclusive el humano, son los miembros de

la Familia Trypanosomatidae, entre ellos el más estudiado por ser de carácter zoonótico es *T. cruzi*. Estos hemoparásitos han sido aislados a partir de una gran variedad de especies de fauna silvestre, incluyendo marsupiales como la zarigüeya brasileña (*Didelphis aurita*), la zarigüeya de cuatro ojos (*M. nudicaudatus*), zarigüeya de tres rayas (*Monodelphis americana*), koala (*Phascolarctos cinereus*), (diversas especies de murciélagos (*Carollia perspicillata*; *Desmondus rotundus*, *M. nigricans*), osos (*Ursus maritimus*, *Ursus thibetanus*, *Selenarctos thibetanus*), coati (*Nasua nasua*), el zorro cangrejero (*Cerdocyon mil*) y el ocelote (*Leopardus pardalis*) roedores (*Rattus rattus*, *Rattus norvegicus*), entre otros alrededor del mundo (Dario et al., 2017; Torrico et al., 2013; Barbosa et al., 2016; Jaime-Andrade et al., 1997; Shahid et al., 2013; Muhammad et al., 2007; Santos et al., 2018; Carhuallanqui et al., 2017) incluyendo países de Latinoamérica como Brasil, Bolivia, Mexico, EUA. (Dario et al., 2017). Algunas variedades diferentes a *T. cruzi*, como *T.c. marinkellei*, *T. dionisii*, se ha demostrado su presencia en siendo también de carácter zoonótico (Torrico et al. 2013).

Al existir las condiciones tanto ambientales como los vectores que pudieran transmitir este parásito entre la población de osos negros de la zona se pensó en la presencia de *T. cruzi* en las muestras de sangre periférica tomadas para este estudio. Sin embargo, al observar los movimientos de los microorganismos presentes en las 17 muestras de sangre, no se pudo distinguir el movimiento característicos que presentan las formas de *T. cruzi* que se han encontrado en sangre periférica en otras especies animales como en zorrillos rayados (*Mephitis*

mephitis), perros (*Canis familiaris*), zarigüeyas (*Didelphis marsupialis*) y rata de campo (*Neotoma micropus*) reportados en el estado de Nuevo León (Galaviz-Silva et al., 2017).

Una vez que los especímenes fueron fijados y teñidos para la determinación de su estructura, los microorganismos observados en las muestras de sangre de los osos negros utilizados en este estudio no presentaron la forma característica de este parásito que se puede observar en sangre periférica, como se ha encontrado en otros estudios y que se distingue por presentar una morfología con citoplasma alargado, ondulado y con un cinetoplasto y núcleo visible con tinciones especiales, así como su flagelo característico y que se describe en la mayoría de los libros de parasitología de animales (De Souza, 2009). Sin embargo, algunos reportes mencionan morfología similar a lo observado en este estudio. De hecho, en osos han sido pocos los casos donde se han identificado Tripanosomatidos, encontrándose con un solo reporte en México de un caso de *T. cruzi* en un oso polar (*Ursus maritimus*) en cautiverio (Jaime-Andrade et al., 1997). Mientras que en osos asiáticos fue encontrado *T. evansi* (Muhammad et al., 2007; Shahid et al., 2013). Ambos reportes describen microorganismos con estructura con un cinetoplasto, núcleo y flagelo característico además de su citoplasma ondulado a lo largo del flagelo.

A diferencia de estos, se encontraron microorganismos unicelulares alargados y ovoides con uno o varios flagelos uni o bipolares, algunos de ellos con citoplasma

con abundantes gránulos basófilos; Morfología observada en microorganismos unicelulares del grupo de los protozoos, como las Tripanosomas, *Trichomonas* y Amebas. Por la alimentación antropogénica a la cual está habituado el oso negro es importante considerar a *Pentatrichomonas hominis* el cual es un protista flagelado amitochondrial, anaerobio el cual coloniza especialmente el intestino grueso (ciego y colon) de diversas especies como hámster, ratón, gato, perro, así como en primates no humanos y el hombre (Li et al., 2015). Implicado en enfermedades gastrointestinales en niños, así como, asociado con infecciones de vías respiratorias en humanos. Es considerado un agente comensal, que puede crecer en exceso en pacientes que presentan otras causas de diarrea (Brložnik et al, 2016). Se puede transmitir de manera cruzada entre estas especies. En estudios recientes, se ha encontrado que pueden adaptarse a nuevos hospedadores o migrar a zonas atípicas en huéspedes sanos. Además, este protozoario puede considerarse como un riesgo de transmisión zoonótica y antroponótica (Li et al., 2014, 2015).

Con respecto a las amebas es importante considerar que la causa de las infecciones por protozoos entéricos, es por medio de las heces las cuales pueden contaminar el medio ambiente y por ende ser ingeridos por la fauna silvestre, animales domésticos e incluso el hombre, dando como resultado una infección o enfermedad como lo es la presencia de *Entamoeba* spp. en monos aulladores, *Alouatta* spp. de México, siendo estas especies afectadas por la destrucción de su hábitat favoreciendo a las infecciones parasitarias (Villanueva et al., 2017).

Con respecto a la morfología ovoide con presencia de flagelo muestra una similitud con estructuras observadas en 2 marsupiales en Australia identificándose como *Trypanosoma copemani* n sp. y en un pequeño zorro volador identificándose como *T. teixeirae* (Austen et al., 2009; Barbosa et al., 2016). Por otro lado, también mostro una similitud con el Tripanosomatido reportado en murciélagos africanos, (*Rhinolophus landeri* y *Hipposideros caffer*) identificándose como *T. livingstonei* (Lima et al., 2013). Con respecto a las estructuras con patrón romboidal con flagelo alargado coincide con unas formas similares observadas en sangre de un ratón de campo rayado (*Apodemus agrarius*) en China denominado *Trypanosoma (Herpetosoma) grosi*, denominadas en este estudio como esferomastigotes (Guan et al., 2011). Las formas alargadas con flagelo bipolar que se apreciaron también al revisar los extendidos sanguíneos tienen similitud con un reporte en Koalas (*Phascolarctos cinereus*) en Australia denominado *T. vegrandis* (Barbosa et al., 2016). Por otro lado, algunas otras formas observadas llegan a tener similitud en forma y tamaño con distintos estadios de *T. cruzi* que se describen en un esquema en donde se detalla cada uno de los estadios de desarrollo de *T. cruzi* (De Souza, 2009).

Sin embargo, únicamente por las características de morfología y motilidad no se pudieron identificar los microorganismos presentes en sangre periférica de osos negros muestreados para este estudio. Por lo que se realizaron pruebas moleculares basadas en la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa que amplificaban fragmentos de ADN específicos para la familia Trypanosomatidae, Amoebidae, Trichomonadidae. Por esta metodología no se

logró obtener un resultado concluyente para estas familias, a excepción de 4 muestras que presentaron bandas de ADN del tamaño sugerente a la familia de los Trypanosomatidae y 2 de ellas que presentaron una banda tenue similar a la presentada por el control positivo a *T. cruzi*. Sin embargo, la morfología de las estructuras presentadas en estas muestras no concordó con la de *T. cruzi*; lo que, por un lado, pudiera sugerir que se trata de otro tipo de Tripanosomatido o como algunos de los mencionados anteriormente.

Sin embargo, se pudo demostrar a través de PCR y con el uso de un primer bloqueador de mamífero que, en las 12 muestras analizadas por este método, se encontraron microorganismos eucariotas en sangre periférica de osos negros en los estados de Nuevo León y Coahuila, como se ha realizado en otras especies como el bloqueo del ADN del krill antártico, debido a las bajas concentraciones del ADN del alimento en el contenido gástrico del propio hospedero (Vestheim y Jarman, 2008).

6 CONCLUSIÓN

En este estudio se observaron microorganismos, con estructuras ovoides, citoplasma transparente, algunos de ellos con gránulos basófilos abundantes y con uno o varios flagelos uni y bipolares en un 85% de los especímenes. Dichos microorganismos no pudieron ser identificados por su morfología, motilidad y tamaño.

Así mismo, se logró demostrar la presencia de microorganismos eucariotas gracias a una PCR para eucariotas utilizándose un primer de bloqueo que impidió la amplificación del ADN del gen 18S del del oso, en las 12 muestras procesadas por este método, siendo compatibles con lo observado en las muestras de sangre en fresco y los frotis sanguíneos teñidos.

A través de pruebas moleculares se obtuvieron resultados preliminares que sugieren que en 4 de estos osos presentan microorganismos pertenecientes a la familia Trypanosomatidae y dos de ellos a probables estadios de *T. cruzi*. Sin embargo, se sugiere que se realicen otras pruebas moleculares, en estas y el resto de las muestras como la secuenciación masiva que permita establecer el género y especie de los microorganismos observados.

Por otro lado, se sugiere se continúe con este estudio, ya que identificando el género y la especie de los microorganismos observados se podrán establecer los ciclos biológicos de los mismos y el riesgo de salud que representan para la población del oso negro en la región, así como el riesgo para la fauna silvestre y doméstica e incluso para los seres humanos.

7 CITAS BIBLIOGRÁFICAS

Atwood, T. C., Young, J. K., Beckman, J. P., Breck, S. W., Fike, J. Rhodes, O. E. and Bristow, K. D. 2011. Modeling connectivity of black bears in a desert sky island archipelago. *Biological Conservation* 144: 2851–2862.

Austen, J. M., Jefferies, R., Friend, J. A., Ryan, U., Adams, P., & Reid, S. A. 2009. Morphological and molecular characterization of *Trypanosoma copemani* n. sp. (Trypanosomatidae) isolated from Gilbert's potoroo (*Potorous gilbertii*) and quokka (*Setonix brachyurus*). *Parasitology*, 136(7), 783–792.

Bacon, E. S., and Burghardt, G. M. 1976. Ingestive behaviors of the American black bear. *International Conference on Bear Research and Management* 3, pp. 13-25.

Barbosa, A., Austen, J., Gillett, A., Warren, K., Papparini, A., Irwin, P., & Ryan, U. 2016. First report of *Trypanosoma vegrandis* in koalas (*Phascolarctos cinereus*). *Parasitology International*, 65(4), 316–318.

Barbosa, A. D., Mackie, J. T., Stenner, R., Gillett, A., Irwin, P., & Ryan, U. 2016. *Trypanosoma teixeirae*: A new species belonging to the *T. cruzi* clade causing trypanosomosis in an Australian little red flying fox (*Pteropus scapulatus*). *Veterinary Parasitology*, 223, 214–221.

Bard, S. M., & Cain, J. W. 2019. Pathogen prevalence in American black bears (*Ursus americanus amblyceps*) of the Jemez mountains, New Mexico, USA. *Journal of Wildlife Diseases*. 55:4.

Beckmann, J. P., and Berger, J. 2003. Using black bears to test ideal-free distribution models experimentally. *Journal of Mammalogy* 84(2): 594–606.

Boyer, R. H. 1949. Mountain coyotes kill yearling black bear in Sequoia National Park. *Journal of Mammalogy* 30:75.

Bradley, C.A and Altizer S. 2007. Urbanization and the ecology of wildlife diseases. *Trends in Ecology and Evolution* 22: 95–102.

Brložnik M, Faraguna S, Slavec B, Kostanjšek R, Rataj AV & Gruntar I. 2016. *Pentatrichomonas hominis* coinfection in a puppy from a Slovenian animal shelter. *Slovenian Veterinary Research* 53(4): 229–235.

Bronson, E., Spiker, H., Driscoll, C. P. 2014. Serosurvey for selected pathogens in free-ranging American black bears (*Ursus americanus*) in Maryland, USA. *Journal of Wildlife Diseases*, 50(4): 829–836.

Carhuallanqui P., A., Chávez V., A., & Pinedo V., R. 2017. *Trypanosoma* spp en Ratas (*Rattus rattus* y *Rattus norvegicus*) de Dos Medioambientes: Mercados de Abasto y Granjas Porcinas. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 28(4), 958.

Carrera-Treviño, R. & Lira-Torres, I. 2015. Manual para Resolver Conflictos entre las Actividades Humanas y el Oso Negro (*Ursus americanus* Pallas, 1780)

en el Parque Nacional Cumbres de Monterrey: Consideraciones técnicas para la prevención de daños, el uso de herramientas no-letales y el manejo de ejemplares. Laboratorio de Fauna Silvestre, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Nuevo León / Parque Nacional Cumbres de Monterrey / Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas / Protección de la Fauna Mexicana, A.C. (En Prensa)

Carrera-Treviño R, Zarco MM, Castillo NM, Monroy-Vilchis O. 2018. Manejo y conservación del oso negro (*Ursus americanus*) en México. En Situación actual de los grandes depredadores, Monroy V.O, Zarco U.M.V., Zarco G.M.M (eds). Ediciones Académicas Colofon. Ciudad de México, pp. 137-154.

Ceballos, G., S. Blanco, C. González y E. Martínez. 2006. Distribución potencial de *Ursus americanus* (oso negro americano). Extraído del Proyecto DS006 'Modelado de la distribución de las especies de mamíferos de México para un análisis GAP'. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). El Proyecto fue financiado por la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/?vns=gis_root/biodiv/spryp/sr_efn/sr_mamma/srcarniv/ursamegw

Cedillo-Rosales C, Busqueta-Médina A, Cedillo-Rosales D, Ávalos-Ramírez R, Contreras-Cordero JF, Pedroza-Roldan C, Zamora-Ávila DE. 2019. Caracterización de virus presentes en perros con gastroenteritis hemorrágica

aguda del área metropolitana de Monterrey. En XI Congreso Nacional de Virología. Guanajuato, Gto. Septiembre 4-7.

Costello, C.M., Jones, D.E., Green Hammond, K.A., Inman, R.M., Inman, K.H., Thompson, B.C., Deitner, R.A. and Quigley, H.B. 2001. A study of black bear ecology in New México with models for population dynamics and habitat suitability. Final Report Federal Aid in Wildlife Restoration Project W-131-R. New México Game and Fish Department, New Mexico, USA.

Cox, J. J., Murphy, S. M., Augustine, B. C., Guthrie, J. M., Hast, J. T., Maehr, S. C., & McDermott, J. 2017. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in American Black Bears (*Ursus americanus*) of the Central Appalachians, USA. Journal of Wildlife Diseases 53:3.

Curtis-Robles, R., Lewis, B. C., & Hamer, S. A. 2016. High *Trypanosoma cruzi* infection prevalence associated with minimal cardiac pathology among wild carnivores in central Texas. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, 5(2), 117–123.

Clutton-Brock, J. 2002. Mamíferos. Omega: Barcelona, pp. 234.

Dario, M.A., Lisboa, C.V., Costa, L.M., Moratelli, R., Nascimento, M.P., Costa, L.P., Reis Leite, Y.L., Llewellyn, M.S., Das Chagas Xavier, S.C., Rodrigues Roque, A.L., Jansenm A.M. 2017. High *Trypanosoma* spp. diversity is maintained by bats and triatomines in Espírito Santo state, Brazil. PLoS ONE, 12 (11).

Daszak, P., Cunningham, A. A., & Hyatt, A. D. 2000. Emerging infectious diseases of wildlife. Threats to biodiversity and human health. *Science* 287: 443-449.

Delgadillo, J.A., Gibert, S., García, M., Velazquez, R. 2014. Oso negro. En: *Ecología y manejo de fauna silvestre en México*. Valdez, R y Ortega -S, J.A. (eds). Biblioteca Básica de Agricultura. Editorial del Colegio de Postgraduados, Universidad Autónoma de Chapingo- IICA. Guadalajara, Jalisco. México, pp. 311-330.

De Souza, W. 2009. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 (SUPPL. 1): 89–100

Elliot, D. G. 1903. Descriptions of apparently new species of mammals of the genera *Heteromys* and *Ursus* from Mexico and Washington. *Field Columbian Museum Publications, Zoology Series* 3, 80:233–237.

Fimbres, J. P. 2017. Estimación de la densidad poblacional de oso negro (*Ursus americanus*) en el Parque Nacional Cumbres de Monterrey, a través del análisis de ADN. Tesis. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, México.

Galaviz -Silva, L., Mercado-Hernández, R., Zárate Ramos, JJ., Molina-Garza, ZJ. 2017. Prevalance of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs and small mammals in Nuevo León, México. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(3): 216-223.

Guan, G., Niu, Q., Yang, J., Li, Y., Gao, J., Luo, J., & Yin, H. 2011. *Trypanosoma (Herpetosoma) grosi*: First isolation from Chinese striped field mouse (*Apodemus agrarius*). *Parasitology International*, 60(1), 101–104.

INEGI. (2012). Instituto Nacional de Estadística y Geografía. INEGI.

Hall, E.R. 1981. *The mammals of North America*. John Wiley and Sons, New York, N.Y. pp. 118.

Jaime-Andrade J, Avila D., Lozano FJ., Hernández RJ, Magallón E, Kasten MJ & Lopes ER. 1997. Cardiopatía aguda de Chagas en un oso polar (*Ursus maritimus*) en Guadalajara, México. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*.

Juárez-Casillas, L.A., y Varas, C. 2013. Revisión bibliográfica actualizada del oso negro en México. *Therya*. 4(3): 447-465.

Jongwutiwes S, Silachamroon U, Putaporntip C. 2000. *Pentatrichomonas hominis* in empyema thoracis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 94:185–186

Kaeslin, E., Redmond, I, Dudley, N. 2013. La fauna silvestre en un clima cambiante. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Roma, Italia, 167: 47-54.

Larter, N. C., Elkin, B. T., Forbes, L. B., Wagner, B., & Allaire, D. G. 2017. *Trichinella* Surveillance in Black Bears (*Ursus americanus*) from the Dehcho

Region, Northwest Territories, Canada, 2002–15. *Journal of Wildlife Diseases*, 53(2): 405–407.

LeCount, A. L. 1987. Causes of black bear cub mortality. *International Conference on Bear Research and Management* 7, pp.75-82.

Lima, L., Espinosa-Álvarez, O., Hamilton, P. B., Neves, L., Takata, C. S., Campaner, M., Attias, M., De Sousa, W., Camargo, EP., Teixeira, M. M. 2013. *Trypanosoma livingstonei*: A new species from African bats supports the bat seeding hypothesis for the *Trypanosoma cruzi* clade. *Parasites and Vectors*, 6(1).

Li WC, Gong PT, Ying M, Li JH, Yang J, Li H, Zheng TY, Zhang GC, Zhang XC. 2014. *Pentatrachomonas hominis*: First isolation from the feces of a dog with diarrhea in China. *Parasitology Research* 113(5): 1795–1801.

Li WC, Ying M, Gong PT, Li, JH, Yang J, Li H, & Zhang XC. 2015. *Pentatrachomonas hominis*: Prevalence and molecular characterization in humans, dogs, and monkeys in Northern China. *Parasitology Research* 115(2): 569–574.

López-Farías, A., Monroy-Vilchis, O., Carrera-Treviño, R. 2019. Oso negro en México: un gigante en peligro de extinción. *Ciencia UANL* 95:8-13

Martínez-Hernández, F., Rendon-Franco, E., Gama-Campillo, L. M., Villanueva-García, C., Romero-Valdovinos, M., Maravilla, P., Alejandre-Aguilar, R., Rivas, N., Cordova-Aguilar, A. Muñoz-García, C.I., Villalobos, G. 2014. Follow up of natural infection with *Trypanosoma cruzi* in two mammals

species, *Nasua narica* and *Procyon lotor* (Carnivora: Procyonidae): Evidence of infection control? *Parasites and Vectors* 7(1):405.

McCleery, R. 2010. Urban mammals. In: Aitkenhead-Peterson, J and Volder A. 2010. *Urban Ecosystem Ecology*. Agronomy Monographs 55. Madison, WI. USA. pp. 87-102.

McLellan, B, Reiner, D.C. 1994. A review of bear evolution. *International Conference on Bear Research and Management*, 9 (1) pp. 85-96.

McKinney, M.L. 2002. Urbanization, biodiversity, and conservation. *Bioscience* 52:883–890.

McKinney, B. R. y J. A. Delgadillo. 2004. Manual para el manejo de oso negro mexicano. Guía para manejadores. Cemex, Monterrey, N.L. México. pp. 71.

Merriam, C. H. 1904. Four new bears from North America. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 17:153–156

Michalski, M. L., Bain, O., Fischer, K., Fischer, P. U., Kumar, S., & Foster, J. M. 2010. Identification and Phylogenetic Analysis of *Dirofilaria ursi* (Nematoda: Filarioidea) from Wisconsin Black Bears (*Ursus americanus*) and its Wolbachia Endosymbiont. *Journal of Parasitology* 96(2): 412–419.

Muhammad, G., Saqib, M., Sajid, M. S., & Naureen. 2007. *Trypanosoma evansi* infections in Himalayan black bears (*Selenarctos thibetanus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. Official Publication of the American Association of Zoo Veterinarians, 38(1): 97–100.

Pallas, P. S. 1780. Spicilegia Zoologica, quibus novae imprimis et obscurae animalium species iconibus. Berolini, G. A. Lange, 1774-1780. Fascicle 14, p. 5 (not seen, cited in Catalogue of the Library of the Museum of Comparative Zoology 6, pp: 506.

Pelton, M.R. Coley, A.B. Eason, T.H. Doan-Martínez, D.L. Pederson, J.A. Van, F.T. Weaver, K.M. 1999. American Black Bear Conservation Action Plan. In Status Survey and Conservation action Plan, Bears. Servheen, C. Herrero, S y Peyton, B (eds). IUCN/SSC Bear Specialist Group. E.U.A. pp. 144-156.

Rangel-Gamboa, L., Lopez-Garcia, L., Moreno-Sanchez, F., Hoyo-Ulloa, I., Vega Mémije, ME., Mendoza-Bazan, N., Romero-Valdovinos, M., Olivo-Diaz, A., Villalobos, G., Martinez-Hernandez, F. 2019. *Trypanosoma cruzi* infection associated with atypical clinical manifestation during the acute phase of the Chagas disease. Parasites & Vectors.

Robbins, C.T., Lopez-Alfaro, C., Rode, K.D., Tøien, Ø., Nelson, O.L. 2012. Hibernation and seasonal fasting in bears: the energetic costs and consequences for polar bears. Journal of Mammalogy 93: 1493-1503.

Rogers, L. L. 1976. Effects of mast and berry crop failures on survival, growth, and reproductive success of black bears. Transactions of the North American Wildlife and Natural Resources Conference 41. pp. 431-438.

Rogers, L. L. 1980. Inheritance of coat color and changes in pelage coloration in black bears in northeastern Minnesota. Journal of Mammalogy 61:324-327.

Rogers, L. L. y Mech, L.D. 1981. Interactions of wolves and black bears in northeastern Minnesota. *Journal of Mammalogy* 62:434-436.

Sambrook J, Fitsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Volume 1. In 3rd edition. Edited by Cold Spring Harbor. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001:6–13

SEMARNAT. 2010. Norma Oficial Mexicana. NOM–059–SEMARNAT–2010, Protección ambiental – Especies nativas de México de Flora y Fauna Silvestres – Categorías de Riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio– Lista de Especies en Riesgo. Diario Oficial de la Federación 2ª Sección, 30 de diciembre del 2010.

Shahid, M., Janjua, S., Abbas, F. I., & Burbach, J. S. 2013. PCR-based detection of *Trypanosoma evansi* infection in semi-captive asiatic black bears (*Ursus thibetanus*). *Pakistan Veterinary Journal* 33(4): 442–445.

Shimozuru, M., Iibuchi, R., Yoshimoto, T., Nagashima, A., Tanaka, J., & Tsubota, T. 2013. Pregnancy during hibernation in Japanese black bears: effects on body temperature and blood biochemical profiles. *Journal of Mammalogy* 94(3): 618–627.

Stephenson, N., Higley, J. M., Sajecki, J. L., Chomel, B. B., Brown, R. N., & Foley, J. E. 2015. Demographic characteristics and infectious diseases of a population of American black bears in Humboldt County, California. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 15(2): 116–123.

Tenório, M. S., Oliveira e Sousa, L., Alves-Martin, M. F., Paixão, M. S., Rodrigues, M. V., Starke-Buzetti, W.A., Araújo, J.P., Lucheis, S. B. 2014. Molecular identification of trypanosomatids in wild animals. *Veterinary Parasitology* 203: 203–206.

Thompson, R. C. A., & Polley, L. 2014. Parasitology and One Health. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 3(3): A1–A2.

Torrice M.C., Téllez T, Tenorio O, Rojas L, Huaranca J.C., De la Barra A, García A.L., and Torrico F. 2013. “Trypanosomatidae Isolated from Wild Mammals in Three Departments of Bolivia (Cochabamba, Potosí and Santa Cruz de La Sierra.” *Gaceta Médica Boliviana VO - 36 36 (1):* 6.

Trejo-Chávez, Armando, Flores K, Ávalos R, Zamora D, Nevárez A, Rodríguez L, Zarate JJ, Cedillo S. 2017. Infección por el virus del distemper canino en un mapache (*Procyon lotor*), en el Estado de Nuevo León. Informe de un caso. En Vilchez JF, Gómez D, Bosques FJ (eds). En XXIX Congreso Nacional de Investigación en Medicina “Translational Medicine From Bench to Beside”. Monterrey, Nuevo León, México. Octubre 04-07.

Santos, F. M., De Macedo, G. C., Barreto, W. T. G., Oliveira-Santos, L. G. R., Garcia, C. M., Garcia, C.M., De Miranda Mourão, G., De Oliveira Porfirio, G.E., Marino, E.D., André, M.R., Perles, De Oliveira E.C, de Andrade GB, Jansen AM, Herrera, H. M. 2018. Outcomes of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* infections on health of Southern coati (*Nasua nasua*), crab-eating fox

(*Cerdocyon thous*), and ocelot (*Leopardus pardalis*) in the Brazilian Pantanal. PLoS ONE, 13: 8.

Vega S & Náquira C. 2005. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la trypanosomiosis americana (enfermedad de Chagas). Serie de Normas Técnicas (Vol. 1, p. 104). Instituto Nacional de Salud.

Vestheim, H., & Jarman, S. N. 2008. Blocking primers to enhance PCR amplification of rare sequences in mixed samples – a case study on prey DNA in Antarctic krill stomachs. *Frontiers in Zoology*, 5(1), 12.

Villanueva-García, C., Gordillo-Chávez, E. J., Baños-Ojeda, C., Rendón-Franco, E., Muñoz-García, C. I., Carrero, J. Córdoba-Aguilar, A., Maravilla, P., Galian, J., Martínez- Hernández, F., Villalobos, G. 2017. New Entamoeba group in howler monkeys (*Alouatta* spp.) associated with parasites of reptiles. *Parasitology Research*, 116(8), 2341–2346.

Wunderlin, A. M., Waliszewski, N. T., Katz, C. J., Hinickle, A. R., Anderson, S. C., Nye, S. A., & Howe, R. W. 2007. West Nile Virus Exposure in Black Bears of Northeastern Wisconsin. *Journal of Wildlife Management* 71(2): 634–636.