

## Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

# Guía para elaborar el informe final de investigaciones cofinanciadas por Digi 2023

### Información General

Elaborar el informe final, con tipo de letra *Times New Roman* 12 puntos, interlineado 1 ½ y justificado. Utilice las Normas APA (*American Psychological Association*) 7a. edición para citas, referencias, tablas y figuras.

### Formato de informe final (carátula)

Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud  
(nombre del programa universitario de investigación de la Digi)

Caracterización de la microbiota intestinal de *Triatoma dimidiata* infectadas con *Trypanosoma cruzi* en Guatemala  
nombre del proyecto de investigación

4.8.63.4.54  
Partida presupuestaria

Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas -IIQB-  
Unidad académica o centro no adscrito a unidad académica avaladora

Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares - Coordinador  
Lic. Francisco Josué López Hun - Investigador  
Lic. César Camilo Carías Alvarado - Investigador  
Br. Astrid Alejandra Morales Cabrera - Auxiliar de Investigación

Nombre del coordinador del proyecto y equipo de investigación contratado por Digi

Guatemala, 29/02/2024  
Lugar y fecha de presentación del informe final dd/mm/año



## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

### **Contraportada (reverso de la portada)**

#### **Autoridades**

Dra. Alice Burgos Paniagua  
Directora General de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar  
Coordinador General de Programas

PhD. Hilda Valencia de Abril  
Coordinadora Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud  
DIGI/USAC

#### **Autores**

Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares  
Coordinador del proyecto

Lic. Francisco Josué López Hun  
Investigador

Lic. César Camilo Carías Alvarado  
Investigador

Br. Astrid Alejandra Morales Cabrera  
Auxiliar de investigación

#### **Colaboradores**

Lic. Antonieta Guadalupe Rodas Retana - Laboratorio de Entomología Aplicada y  
Parasitología

Lic. Juan Carlos Barrios Menéndez - Escuela de Biología

Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación (Digi), 2023. El contenido de este informe de investigación es responsabilidad exclusiva de sus autores. Esta investigación fue cofinanciada con recursos del Fondo de Investigación de la Digi de la Universidad de San Carlos de Guatemala a través de la partida presupuestaria 4.8.63.4.54 en el Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud. Los autores son responsables del contenido, de las condiciones éticas y legales de la investigación desarrollada.



## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

### **1 Índice general**

Resumen	9
Palabras clave	9
Abstract	9
Keywords	9
Introducción	10
Antecedentes	12
Planteamiento del problema	13
Marco teórico	15
Estado del arte	22
Objetivos	24
Objetivo General	24
Objetivos Específicos	24
Hipótesis	24
Materiales y métodos	24
Enfoque de la investigación	24
Método	25
Recolección de información	26
Técnicas e instrumentos	27
Colecta de especímenes	27
Identificación Taxonómica de <i>T. dimidiata</i>	27
Detección de <i>T. cruzi</i>	28

## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

Diseción de especímenes y extracción de ADN	28
Secuenciación de las regiones V3-V5 del gen 16s rRNA	29
Procesamiento y análisis de la información	30
Análisis de Secuencias	30
Perfiles taxonómicos y presencia de bacterias paratransgénicas	30
Índices de Alpha y Beta diversidad, distancia entre grupos y Biomarcadores	31
Resultados y discusión	31
Resultados	31
Tabla 1. Datos de colecta de especímenes de <i>Triatoma dimidiata</i>	31
Tabla 2 Concentraciones y calidad de ADN extraídos	33
Tabla 3 Resultados de la secuenciación del gen 16S rRNA de 23 muestras	35
Tabla 4 Comparación de la microbiota presente en <i>T. dimidiata</i> mediante análisis de varianza multivariado permutacional (perMANOVA)	37
Figura 1 Abundancia relativa de los Filos presentes en <i>T. dimidiata</i> infectadas y no infectadas por <i>T. cruzi</i>	38
Figura 2 Abundancia relativa de las Familias presentes en <i>T. dimidiata</i> infectadas y no infectadas por <i>T. cruzi</i>	39
Figura 3 Abundancia relativa de los Géneros presentes en <i>T. dimidiata</i> infectadas y no infectadas por <i>T. cruzi</i>	40
Figura 4 Diversidad alfa de la microbiota presente en <i>T. dimidiata</i> infectadas y no infectadas por <i>T. cruzi</i>	41
Figura 5 Diversidad alfa e índices de rarefacción de la microbiota presente en <i>T. dimidiata</i> infectadas y no infectadas por <i>T. cruzi</i>	41



## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

Figura 6	Diversidad beta de la microbiota presente en <i>T. dimidiata</i> infectadas y no infectadas por <i>T. cruzi</i>	42
Figura 7	Análisis comparativo de la microbiota presente en <i>T. dimidiata</i> infectadas y no infectadas por <i>T. cruzi</i> a partir de PCA y PCoA	43
Figura 8	Abundancia relativa de los Filos presentes en <i>T. dimidiata</i> provenientes de las localidades Aldea La Brea y Aldea El Ciprés	44
Figura 9	Abundancia relativa de las Familias presentes en <i>T. dimidiata</i> provenientes de las localidades Aldea La Brea y Aldea El Ciprés	45
Figura 10	Abundancia relativa de los Géneros presentes en <i>T. dimidiata</i> provenientes de las localidades Aldea La Brea y Aldea El Ciprés	46
Figura 11	Diversidad alfa de la microbiota presente en <i>T. dimidiata</i> provenientes de las localidades Aldea La Brea y Aldea El Ciprés	47
Figura 12	Diversidad beta de la microbiota presente en <i>T. dimidiata</i> provenientes de las localidades Aldea La Brea y Aldea El Ciprés	
Figura 13	Gráfico de NMDS de la microbiota de especímenes de <i>T. dimidiata</i> provenientes de las localidades Aldea La Brea y Aldea El Ciprés calculado con distancias de Bray-Curtis	48
Figura 14	Biomarcadores de la microbiota presente en <i>T. dimidiata</i> provenientes de las localidades Aldea La Brea y Aldea El Ciprés	48
	Discusión de resultados	49
	Conclusiones	54
	Recomendaciones	55
	Referencias	55
	Apéndice	66

## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

Vinculación	66
Estrategia de difusión, divulgación y protección intelectual	66
Aporte de la propuesta de investigación a las Prioridades Nacionales de Desarrollo (PND) identificando su meta correspondiente	67
Orden de pago final	68
Declaración del Coordinador(a) del proyecto de investigación	69
Aval del Director(a) del instituto, centro o departamento de investigación o Coordinador de investigación del centro regional universitario	70
Visado de la Dirección General de Investigación	71

## Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

### 2 Resumen

En Guatemala, el principal vector de la enfermedad de Chagas es *Triatoma dimidiata* infectadas con *Trypanosoma cruzi*. A pesar de que se han realizado muchos esfuerzos de control en zonas de riesgo, la especie *T. dimidiata* aún no se encuentra controlada y sigue siendo un problema de salud pública en Guatemala. Actualmente la paratransgénesis es una alternativa al control de los parásitos transmitidos por insectos vectores a partir del uso de simbiontes bacterianos intestinales, por lo que el estudio de la microbiota de *T. dimidiata* representa un punto de partida importante. El objetivo de este estudio fue el de caracterizar la microbiota intestinal de *T. dimidiata* domésticas infectadas con *T. cruzi*. Esto se realizó mediante secuenciación de nueva generación de las regiones hipervariables del gen 16S rRNA en muestras intestinales de *T. dimidiata*. Mediante este estudio se obtuvieron los perfiles taxonómicos y se analizó la diversidad de la microbiota intestinal de *T. dimidiata*. Así mismo, se conocieron los taxones bacterianos distintivos y se determinó la presencia de bacterias con potencial de paratransgénesis. En el presente estudio se obtuvo que la diversidad de la microbiota intestinal de los especímenes de *T. dimidiata* domésticos e infectadas con *T. cruzi* ha sido similar a la de aquellos especímenes no infectados con *T. cruzi*. Se han encontrado diferencias en la diversidad y composición de la microbiota intestinal de los especímenes de *T. dimidiata* domésticos en función de la localidad de origen y se identificaron los géneros *Corynebacterium* y *Staphylococcus* se presentan como taxones con potencial paratransgénico.

**Palabras clave:** Gen 16S rRNA, secuenciación de nueva generación, perfil taxonómico, bacterias, enfermedad de Chagas.

### Abstract

In Guatemala, the main vector of Chagas disease is *Triatoma dimidiata* infected with *Trypanosoma cruzi*. Although many control efforts have been made in risk areas, the species *T. dimidiata* is still not controlled and continues to be a public health problem in



## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

Guatemala. Currently, paratransgenesis is an alternative to the control of parasites transmitted by insect vectors through the use of intestinal bacterial symbionts, so the study of the microbiota of *T. dimidiata* represents an important starting point. The objective of this study was to characterize the intestinal microbiota of domestic *T. dimidiata* infected with *T. cruzi*. This was performed by next-generation sequencing of the hypervariable regions of the 16S rRNA gene in intestinal samples of *T. dimidiata*. Through this study, taxonomic profiles were obtained and the diversity of the intestinal microbiota of *T. dimidiata* was analyzed. Likewise, the distinctive bacterial taxa were known and the presence of bacteria with paratransgenesis potential was determined. In the present study, it was found that the diversity of the intestinal microbiota of domestic *T. dimidiata* specimens infected with *T. cruzi* has been similar to that of those specimens not infected with *T. cruzi*. Differences have been found in the diversity and composition of the intestinal microbiota of domestic *T. dimidiata* specimens depending on the locality of origin and the genera *Corynebacterium* and *Staphylococcus* are presented as taxa with paratransgenic potential.

**Keywords:** 16S rRNA gene, next generation sequencing, taxonomic profile, bacteria, Chagas disease.

### **3 Introducción**

La enfermedad de Chagas es una enfermedad endémica del continente americano, es conocida como una enfermedad zoonótica de importancia en los países con bajos ingresos de América Latina (Bern, 2015). Así mismo, es una enfermedad que puede producir síntomas leves como fatiga, celulitis facial y fiebre, o puede presentarse miocarditis o meningoencefalitis en algunos casos graves (Bertocci et al., 2013). Es transmitida por vectores hematófagos de la subfamilia de insectos Triatomíneos que han sido infectados por el parásito *Trypanosoma cruzi* (Coura, 2014). El parásito *T. cruzi* ingresa al ser humano por medio de la picadura del triatominio, encontrándose en las



## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

heces del insecto (Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012). El vector, se alimenta de la sangre del hospedero y defeca en el sitio de la picadura, entrando así, el parásito al torrente sanguíneo del hospedero (Pérez-Molina & Molina, 2018). Para Guatemala, el principal vector que transmite a *T. cruzi* a los humanos, es *Triatoma dimidiata* (Bustamante et al., 2014). *T. dimidiata* es una especie nativa de la región, que ha logrado colonizar tanto ambientes selváticos como ambientes habitados por seres humanos (Flores-Ferrer et al., 2019). Esto le ha permitido alimentarse de animales domésticos, como gallinas, perros y gatos y también directamente de los seres humanos (Torres-Montero et al., 2012). Estas características vectoriales, han permitido que los países menos desarrollados y con poblaciones más vulnerables, presenten una prevalencia mayor para la enfermedad de Chagas en comparación con los de los países más desarrollados. A nivel mundial, se estima que entre 6 y 7 millones de personas sufren de esta enfermedad, mientras que 100 millones de personas se encuentran en riesgo en el continente americano (Mills, 2020). Específicamente para Guatemala, la prevalencia se encuentra en 1.2 personas infectadas, por cada 100 habitantes y 1.4 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad (World Health Organization, 2015).

Es por ello que, para contrarrestar los efectos de esta enfermedad sobre la población guatemalteca, se han invertido una gran cantidad de recursos económicos destinados a combatir la reproducción del vector *T. dimidiata*, empleando principalmente insecticidas en el interior de las viviendas aledañas a zonas selváticas y zonas definidas como zonas de riesgo (Waleckx et al., 2015). Sin embargo, estas metodologías no han tenido los resultados deseados debido a varios factores ecológicos del vector y factores socioeconómicos de los pobladores. Así mismo, es de suma importancia mencionar el alto costo de estos esfuerzos, tanto a nivel económico como en el uso de personal y el tiempo necesario para llevar a cabo estos programas de control vectorial (Gürtler & Yadon, 2015). Dado que los países más afectados son países de bajos recursos económicos, es de suma importancia dirigir los recursos económicos de tal manera que los esfuerzos tengan un efecto beneficioso. Además, se ha demostrado que *T. dimidiata*

## Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

presenta resistencia a ciertos insecticidas, haciendo necesario el uso de nuevas herramientas para el control vectorial (Reyes et al., 2007). En la actualidad, uno de los temas más importantes en el control de vectores, es la paratransgenésis (Wilke & Marelli, 2015), que consiste en el uso de simbioses bacterianas de insectos, para interferir con la transmisión de patógenos transmitidos por vectores, técnica que ha demostrado ser eficaz en el control de vectores (Lopez-Ordóñez et al., 2018), dado que los simbioses bacterianos desempeñan un papel vital en el metabolismo de los insectos vectores hematófagos.

Sin embargo, poco se conoce de la microbiota presente en los intestinos de *T. dimidiata*, ya que es una técnica novedosa y que ha cobrado auge en las últimas dos décadas, siendo necesario que se realicen análisis de los componentes de la microbiota que puedan jugar un papel importante en la infección de *T. dimidiata* por *T. cruzi*. Es por ello que mediante el presente estudio se realizó un análisis genómico de la microbiota de individuos de la especie *T. dimidiata* que presenten infección por *T. cruzi* y lo cual permitió conocer los componentes presentes en su microbiota, con el objetivo de ser utilizados en el control de la infección por *T. cruzi*. Esto se realizó a partir de un análisis comparativo entre la microbiota de individuos de *T. dimidiata* que presenten al parásito *T. cruzi*, con la microbiota de individuos que no presenten infección por *T. cruzi*. Con ello se pudo conocer las diferencias entre los simbioses bacterianos que se encuentran en los intestinos del insecto que puedan jugar un papel importante en la infección de *T. dimidiata* por *T. cruzi*.

#### 4 Antecedentes

Desde la década pasada se han realizado estudios para comprender la microbiota intestinal de *T. dimidiata*. En Brasil evaluó las regiones V6–V8 del gen 16s rRNA y obtuvo una baja diversidad en la microbiota intestinal de *T. dimidiata*, siendo el género *Arsenophonus* el más predominante en *T. dimidiata* (Gumiel et al., 2015). Así mismo, en

## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

el estudio realizado por Lopez-Ordoñez y colaboradores (2018) se obtuvieron a los filos Firmicutes, Actinobacteria y Proteobacteria, como los más importantes. De dichos filos los géneros más representativos fueron *Staphylococcus*, *Brevibacterium* y *Delftia*, respectivamente. Otro analizó la microbiota de *T. dimidiata* por medio del gen 16S encontrando que la diversidad era menor en ninfas respecto a especímenes adultos. Además, se presentaron diferencias en la composición de la microbiota de *T. dimidiata* al evaluar la infección de *T. cruzi*, demostrándose que en los especímenes infectados se encontraron bacterias de las familias como Nocardiaceae y Pseudomonadaceae, mientras que en aquellos especímenes no infectados se observaron bacterias de las familias Staphylococcaceae, Comamonadaceae, Flavobacteriaceae, Bacillaceae, Moraxellaceae y Enterobacteriaceae (Polonio et al., 2021). De igual manera, se ha reportado que especímenes de *T. dimidiata* infectados por *T. cruzi* poseen significativamente más especies de bacterias que aquellos especímenes que no están infectados (Orantes et al., 2018). En otro estudio se reportaron diferencias entre ninfas y adultos. Siendo que las ninfas presentan especies de bacterias de las familias Mycobacteriaceae, Salinisphaeraceae, Methylobacteriaceae y Nocardiospsaceae (Murillo-Solano et al., 2021). Por último, es importante mencionar que otras especies de triatominos también han sido estudiadas. Tal es el caso de las especies *T. pseudomaculata* y *T. brasiliensis*, de las cuales la microbiota intestinal se compone principalmente de bacterias pertenecientes a los filos Proteobacteria y Actinobacteria. Así mismo, el género más abundante fue *Serratia* (Gumiel et al., 2015).

### **5 Planteamiento del problema**

La enfermedad de Chagas consiste en una antropozoonosis causada por el parásito *T. cruzi*. La enfermedad afecta a un aproximado de 6-8 millones de personas alrededor del mundo y causa un aproximado de 50,000 muertes anuales. Así mismo, alrededor de 100 millones de personas se encuentran con riesgo de adquirir la enfermedad en Latinoamérica. Siendo, de esta manera, uno de los principales problemas de salud pública



## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

en la región (Lidani et al., 2019; Molina, Salvador & Sánchez-Montalvá, 2016). La principal forma de transmisión del *T. cruzi* a los humanos es por medio del contacto con las heces de especies de triatomíneos quienes son principales vectores de la enfermedad, siendo en Guatemala la especie *T. dimidiata* el principal vector. No obstante, la transmisión también puede darse a través de transfusiones sanguíneas, trasplantes de órganos y transmisión vertical de madre a hijo (Polonio et al., 2021). A pesar de que se han realizado muchos esfuerzos de control en zonas de riesgo, las especies de triatomíneos aún no se encuentran del todo controladas y sigue siendo un problema de salud pública en el país. El Laboratorio de Entomología Aplicada (LENAP) ha realizado varios estudios para comprender la enfermedad. De ellos se pueden mencionar, un estudio de 5 años realizado en los 22 departamentos del país en el cual se obtuvieron 1,675 especímenes de *T. dimidiata* de 4,218 triatomíneos colectados. Así mismo, se observó una tasa de infección por *T. cruzi* del 20.6% (Monroy et al., 2003). Recientemente, en un estudio realizado en once comunidades de Jutiapa se observó que cinco comunidades se encontraron con muy altas tasas de infección (Monroy et al., 2022).

El control de la enfermedad de Chagas se ha abordado de diferentes maneras siendo la mejora de vivienda y los enfoques ecológicos y de intervención tradicional, entre otros, los llevados a cabo en el país obteniendo resultados positivos (Castro-Arroyave, Monroy & Irurita, 2020; Monroy et al., 2012; Pennington et al., 2021). Actualmente, la paratransgénesis se posiciona como una alternativa al control de los parásitos transmitidos por insectos vectores a partir del uso de simbiosis bacterianas intestinales que los insectos poseen (Hurwitz et al., 2011), por lo que el estudio de la microbiota de *T. dimidiata* representa un punto de partida importante para la paratransgénesis en el país (Polonio et al., 2021). De tal manera, estudios recientes sugieren que las especies *Staphylococcus saprophyticus*, *Micrococcus luteus* y *Bacillus megaterium* cuentan con un potencial uso en paratransgénesis (Lopez-Ordóñez et al., 2018). Así mismo, otros estudios como el realizado por Polonio y colaboradores (2021) sugieren que interferir el desarrollo de la microbiota asociada durante el desarrollo ontogénico del hospedero

## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

proveería una estrategia para el control del vector, por lo que el conocer la microbiota de especímenes *T. dimidiata* del país genera un potencial grande en el control de la enfermedad de Chagas.

### **6 Marco teórico**

#### **Enfermedad de Chagas**

##### *Generalidades*

La enfermedad de Chagas es una enfermedad endémica del continente americano, presentando mayor prevalencia e incidencia en los países menos desarrollados de América Latina (Steverding, 2014). La Organización Mundial contra la Salud ha descrito a esta enfermedad como un indicador de la pobreza y la desventaja, ya que afecta a poblaciones con poca visibilidad y poca voz política, siendo causa de estigma y discriminación, es relativamente descuidada por los investigadores, y tiene un impacto considerable en morbilidad y mortalidad en países pobres (World Health Organization, 2010). La enfermedad de Chagas es endémica en 21 países latinoamericanos, desde el sur de USA hasta el norte de Argentina y Chile (Malik et al., 2015). La distribución actual de la enfermedad de Chagas es consecuencia de dos principales causas: la transmisión vectorial doméstica en la población de América Latina y migración a gran escala de las zonas rurales a las urbanas en los últimos 50 años (Razi & Rezzende, 2012). La prevalencia de esta enfermedad es notablemente más alta en Bolivia (6.1 casos/100 habitantes), Argentina (3.6/100 habitantes), Paraguay (2.1/100 habitantes), Ecuador (1.4/100 habitantes), El Salvador (1.3/100 habitantes) y Guatemala (1.2/100 habitantes) (WHO, 2015).

Esta enfermedad es una enfermedad zoonótica, transmitida por vectores de los insectos de la subfamilia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) y causada por los kinetoplastidos *T. cruzi* (de Oliveira et al., 2018). La manera en la que se transmite es a partir del momento que el insecto hematófago, infectado por *T. cruzi*, se alimenta de la sangre del



## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

humano (Rossi et al., 2003). *T. cruzi* es excretado en las heces de un triatomino infectado sobre la piel humana o cerca de las membranas mucosas. Los parásitos atraviesan la dermis a través de excoriaciones en la piel y obtienen acceso sistémico. Una vez dentro de las células huésped, se reproducen, lo que conduce a la lisis celular y la diseminación en la sangre (Jansen et al., 2020). Los síntomas causados por el parásito incluyen una fase aguda y una fase crónica. La fase aguda puede ocurrir en los primeros años de la infección y normalmente es asintomática, pero en ocasiones presenta fiebre, inflamación en el sitio de inoculación, edema palpebral en un sólo párpado, linfadenopatía y hepatoesplenomegalia. Esta fase dura de 4 a 8 semanas y la parasitemia disminuye sustancialmente a partir de los 90 días (Bern, 2015). La fase crónica inicia espontáneamente conforme la parasitemia se ve disminuida. Afecciones a órganos ocurren en el 30-40% de los pacientes que desarrollan una fase crónica, incluyendo daño al corazón, hígado, bazo, esófago, intestino grueso y cerebro (Pérez-Molina & Molina, 2018).

### ***Trypanosoma cruzi***

El protozoo hemoflagelado *T. cruzi* causa la enfermedad de Chagas, una de las enfermedades tropicales desatendidas más importantes de la humanidad (Bern et al., 2011). En 1909 fue descrita como una especie nueva de parásito y fue descubierta por el médico brasileño Carlos Justiniano Ribeiro Chagas. La especie *T. cruzi* está compuesta por una población heterogénea de diversas cepas circulantes en la naturaleza, con variabilidad genética observada entre ellas (Zingales, 2018). Los animales hospederos de este parásito incluyen mamíferos y un insecto hematófago que actúa como vector, perteneciente al orden Hemiptera, familia Reduviidae, subfamilia Triatominae (Jansen et al., 2020). El protozoo tiene tres formas que han sido clasificados morfológicamente por la posición que presenta su cinetoplasto en relación al núcleo de la célula y por la aparición del flagelo: amastigotes, epimastigotes y tripomastigotes (Martins et al., 2012). El amastigote es la forma intracelular del parásito, que se encuentra en los tejidos de los



## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

mamíferos infectados, este carece de flagelo exterior y membrana ondulada (De Souza et al., 2010). Por su parte, la forma de epimastigote se encuentra en el aparato digestivo del triatomino, presenta flagelo libre, cinetoplasto anterior al núcleo y membrana ondulante poco desarrollada (Hernández et al., 2012). Por último, el tripomastigote no posee capacidad de replicarse y corresponde a la forma infecciosa extracelular, que se encuentra tanto en los huéspedes invertebrados como en los vertebrados (Cardoso et al., 2016).

### ***Triatoma dimidiata***

*T. dimidiata* (Latreille, 1811), es conocido como uno de los vectores de la enfermedad de Chagas, son insectos reduvidos hematófagos del orden Hemiptera, Familia Heteroptera y pertenecientes a la subfamilia Triatominae (Dujardin et al., 2000). Es una especie muy variable con un amplio rango geográfico: desde México, a través de América Central hacia Venezuela, Colombia, Ecuador y el norte de Perú (Dumonteil & Gourbiere, 2004). El origen de la especie parece ser del sur de México/norte de Guatemala. Es actualmente el principal vector de Chagas en Guatemala, El Salvador, Nicaragua y Costa Rica, y el segundo más importante en Honduras y Colombia (Pech-May et al., 2019). Es una especie variable, con formas que poseen distinto comportamiento, patrones cromáticos y proporciones en dimensiones corporales y estructuras genitales (Fernández et al., 2005). Diferencias entre las poblaciones de *T. dimidiata* parecen tener un efecto directo sobre el control vectorial, por ejemplo, en algunas áreas de Nicaragua no se observa reinfestación tras insecticida, sin embargo, en otras áreas, como en el departamento de Jutiapa en Guatemala, existen reportes de reinfestación de los domicilios y peridomicilios (Acevedo et al., 2000; Nakagawa et al., 2003). *T. dimidiata* presenta un comportamiento social, comparten hábitat entre grandes grupos, se alimentan de una gran variedad de huéspedes, los cuales incluyen especies silvestres y domésticas, así como el ser humano. La sangre humana se encuentra frecuentemente en los componentes intestinales de individuos de *T. dimidiata* encontradas en sitios domiciliarios o peri domiciliarios (Quirós-Gómez et al.,

## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

2017). Como parte de la dinámica de transmisión de *T. cruzi*, en Guatemala se ha reportado un índice de infección de 19.1% (Monroy et al., 2003).

### **Enfermedad de Chagas en Guatemala**

La enfermedad de Chagas es un problema de salud pública en Guatemala, comunidades dentro de 21 de los 22 departamentos nacionales presentan triatomos dentro de viviendas en comunidades rurales y periurbanas, afectando principalmente a los departamentos del oriente del país (Tabaru et al., 1999). En la actualidad, Guatemala cuenta con el reporte de 3 vectores de la enfermedad de Chagas: los triatomos *T. dimidiata*, *T. nitida* y *Rhodnius prolixus*, con *T. dimidiata* como el principal vector, ya que frecuenta áreas domiciliarias (Calderón et al., 2004). Por su parte, esfuerzos basados en fumigación empleando insecticidas químicos, resultó en la erradicación del vector *R. prolixus*. Sin embargo, *T. dimidiata* es un organismo más complejo ecológicamente y sugiere un mayor riesgo para la población guatemalteca (Hashimoto & Schofield, 2012). Esta es una especie nativa y originaria de Guatemala, sumamente adaptada a los ambientes selváticos y áreas domiciliarias, se ha reportado que estos insectos se alimentan de humanos, animales domésticos y animales silvestres (Moller Molina, 2016). Se conoce que el parásito transmitido por el triatomo, *T. cruzi*, se encuentra en poblaciones silvestres de armadillos (*Dasypus novemcinctus*) y zarigüeya (*Didelphis virginiana*) (Rosypal et al., 2011). En las zonas donde la enfermedad de Chagas es endémica, *T. dimidiata* generalmente se puede encontrar en casas rurales y estructuras peridomésticas. Esta especie se esconde en grietas en paredes de adobe, bajo yeso suelto, detrás de muebles, detrás de cuadros u otros adornos de pared, y debajo de las camas (World Health Organization, 2002). Como medidas para el control vectorial, se realizaron encuestas entomológicas a cargo de las municipalidades, para determinar la distribución del vector. Estas encuestas fueron seguidas por la implementación de un Programa Nacional de Control de la Enfermedad de Chagas que aplicó insecticidas en todos los municipios afectados. Las evaluaciones de la iniciativa mostraron que los niveles de



## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

infestación de *T. dimidiata* se redujeron hasta nueve veces en muchos municipios (Hashimoto et al., 2012). Sin embargo, a pesar de las múltiples aplicaciones de insecticidas, los niveles de infestación permanecieron agrupados en algunos sitios y continúan siendo elevados (Manne et al., 2012). Como se ha mencionado anteriormente, la enfermedad de Chagas continúa afectando a una gran cantidad de pobladores de bajos recursos del país a pesar de los esfuerzos realizados, presentando la enfermedad en 1.2 personas de cada 100 habitantes (World Health Organization, 2015).

### **Microbiota de *T. dimidiata***

Se han realizado diversos estudios para conocer y evaluar la microbiota de *T. dimidiata*. Un estudio realizado en Brasil evaluó las regiones V6–V8 del gen 16s rDNA y obtuvo una baja diversidad en la microbiota intestinal de *T. dimidiata*, habiendo poco menos de veinte especies predominantes, siendo el género *Arsenophonus* el más predominante en *T. dimidiata* (Gumiel et al., 2015). Así mismo, en el estudio realizado por Lopez-Ordoñez y colaboradores (2018) se obtuvieron a los filos Firmicutes, Actinobacteria y Proteobacteria, como los más importantes. De dichos filos los géneros más representativos fueron *Staphylococcus*, *Brevibacterium* y *Delftia*, respectivamente. Otro estudio que analizó la microbiota de *T. dimidiata* por medio del gen 16S mostró que la diversidad era menor en ninfas al comparar con especímenes adultos. Así mismo, la beta diversidad indicó que en las ninfas se observó una mayor abundancia de bacterias pertenecientes a las familias *Staphylococcaceae*, *Brevibacteriaceae*, y *Bacillaceae*, mientras que en los adultos la diversidad se compuso de diversas familias. Finalmente, de manera interesante se presentaron diferencias en la composición de la microbiota de *T. dimidiata* al evaluar la infección de *T. cruzi*, demostrándose que en los especímenes infectados se encontraron bacterias de las familias como *Nocardiaceae* y *Pseudomonadaceae*, mientras que en aquellos especímenes no infectados se observaron bacterias de las familias *Staphylococcaceae*, *Comamonadaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Moraxellaceae* y *Enterobacteriaceae* (Polonio et al., 2021). De igual manera,

## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

se ha reportado que especímenes de *T. dimidiata* infectados por *T. cruzi* poseen significativamente más especies de bacterias que aquellos especímenes que no están infectados (Orantes et al., 2018). En otro estudio se observó que especies de las familias Mycobacteriaceae, Salinisphaeraceae, Methylobacteriaceae y Nocardiospsaceae se encontraron únicamente en ninfas de *T. dimidiata*, mientras que especies de las familias Pseudonocardiaceae, Streptomycetaceae y Sphingomonadaceae fueron más abundantes en ninfas que en adultos (Murillo-Solano et al., 2021).

Otras especies de triatominos también han sido estudiadas. Tal es el caso de las especies *T. pseudomaculata* y *T. brasiliensis*, de las cuales la microbiota intestinal se compone principalmente de bacterias pertenecientes a los filos Proteobacteria y Actinobacteria. Por otro lado, Firmicutes y Bacteroidetes también fueron detectados pero en menores proporciones. Finalmente, el género más abundante fue *Serratia* y especies como *S. marcescens*, *Dietzia sp.*, *Gordonia terrae*, *Corynebacterium stationis* y *Corynebacterium glutamicum* también fueron encontradas (Gumiel et al., 2015).

### **Paratransgénesis**

La paratransgénesis consiste en el uso de bacterias simbiotes genéticamente modificadas para expresar moléculas efectoras al volver a ser introducidas dentro de vectores de interés (Durvasula et al., 1997; Hurwitz et al., 2011). La paratransgénesis es una metodología de control, ya utilizada en vectores como *Anopheles*, *Aedes* y *Culex*, entre otros, transmisores de dengue, chikungunya, zika, etc. (Wilke & Marrelli, 2015). La paratransgénesis requiere la previa caracterización de la microbiota del vector, haciendo énfasis en aquellas bacterias que se encuentran establecidas en los vectores de interés y que pueden ser transmitidos a las siguientes generaciones (Pidiyar et al., 2004).

Entre las características necesarias que las bacterias potenciales para paratransgénesis deben presentar, son que la molécula efectora debe lograr el efecto deseado sobre el vector, la bacteria debe poseer un mecanismo para transmitir la molécula al vector y las

## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

bacterias deben tener la capacidad de sobrevivir en el vector por un tiempo suficiente para que la producción de moléculas efectoras sea en las cantidades necesarias para que ejerzan un efecto sobre el vector (Riehle et al., 2007). Entre otras características necesarias resalta que la población de bacterias simbióticas debe existir dentro del vector a estudiar y estas deben ser específicas para un determinado vector, las bacterias deben ser susceptibles a cultivo y manipulación genética, las bacterias genéticamente modificadas deben ser estables y su capacidad para volver a infectar al vector huésped no debe verse afectada, las moléculas efectoras producidas por las bacterias deben poder interactuar con el patógeno de interés y es necesario un método efectivo para que las bacterias genéticamente modificadas puedan ser dispersadas entre las poblaciones naturales de los vectores (Beard et al., 2002).

La utilidad de la paratransgénesis se ha evaluado en diferentes vectores de enfermedades. En especies de mosquitos como *Aedes aegypti* y *Phlebotomus argentipes* se han evaluado especies de bacterias que se encuentran asociadas a las funciones de digestión y en procesos anabólicos como la vitelogenénesis y ovogénesis. Se ha probado que al erradicar dichas bacterias (*Bacillus megaterium* y *Brevibacterium linens*) la fecundación se ve afectada y se produce una tasa de crecimiento mucho menor, siendo esta una posibilidad para controlar las poblaciones de mosquitos y prevenir la transmisión de patógenos (Gaio et al., 2011; Hillesland et al., 2008).

### **Paratransgénesis en triatominos como alternativa de control de la enfermedad de Chagas**

Actualmente la paratransgénesis se posiciona como una alternativa al control de los parásitos transmitidos por insectos vectores a partir del uso de simbiontes bacterianos intestinales (Hurwitz et al., 2011). Diversos estudios en paratransgénesis de *T. dimidiata* han generado resultados prometedores en los que se sugieren que especies como *S. saprophyticus*, *M. luteus* y *B. megaterium* poseen un potencial uso en paratransgénesis

## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

destinada al control de *T. dimidiata* (Lopez-Ordenez et al., 2018). De igual forma, hay estudios que, al evaluar la microbiota de *T. dimidiata* en diferentes estadios de su ciclo de vida, han podido identificar bacterias asociadas al desarrollo ontogénico. Por lo tanto, dichos estudios sugieren que al interferir, por medio de paratransgénesis, en el desarrollo de la microbiota asociada al desarrollo ontogénico del hospedero se podría conseguir una estrategia para el control del vector y de esa manera un control en la enfermedad de Chagas (Polonio et al., 2021).

En otras especies de triatominos se ha evaluado la paratransgénesis. Ejemplo de ello son los estudios llevados a cabo con *Rhodnius prolixus* en los que se ha sugerido el potencial de *Rhodococcus rhodnii* para infectar a *T. cruzi* y de esa manera representa un candidato para controlar la enfermedad por medio de paratransgénesis (Beard et al., 2002).

### **7 Estado del arte**

Durante los años más recientes ha surgido el tema de paratransgénesis como una herramienta a futuro próximo para el control de insectos que actúan como vectores de distintas enfermedades (Ratcliffe et al., 2022). Esto ha sido uno de los impulsores para el interés en el estudio de la microbiota de insectos vectores de enfermedades que afectan al ser humano. Varios autores han mencionado la importancia acerca de la microbiota de los insectos capaces de ser vectores y su capacidad vectorial. La microbiota asociada al intestino puede interferir directamente con los patógenos a través de mecanismos como la lisis y la formación de biopelículas (Song et al., 2018) o indirectamente al afectar aspectos intrínsecos del vector que determinan su competencia vectorial, como las barreras del intestino medio y las glándulas salivales y su sistema inmunitario (Cansado-Utrilla et al., 2021). Un ejemplo de esto, es la comparación en la composición de la microbiota de garrapatas transmisoras de enfermedades vectoriales. En este estudio, encontraron que las garrapatas infectadas con *Theileria* sp. presentan una menor diversidad en su microbiota intestinal, al ser comparadas con las que no presentan



## Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

*Theileria* (Adegoke et al., 2020). Así mismo, hay varios trabajos dedicados a dípteros, en los que se analiza la opción de utilizar la paratransgénesis para combatir enfermedades como la malaria, leishmaniasis y la enfermedad del sueño (Huang et al., 2022; Wijerathna et al., 2020; Yang et al., 2021). Por su parte, para el género *Triatoma*, existe un estudio que analizó la microbiota de 5 especies de éste género: *T. gerstaeckeri*, *T. sanguisuga*, *T. indictiva*, *T. lecticularia* y *T. protracta*. En dicho trabajo, se comparó la microbiota de los individuos de triatomíneos que presentaban infección por *T. cruzi* con los que no la presentaban. Este estudio, mostró que la presencia de *T. cruzi* no se veía relacionada con la composición de las comunidades bacterianas en el interior del intestino de estos triatomíneos (Mann et al., 2020). Esto contrastando con los resultados obtenidos por Montoya-Porras y colaboradores. Estos autores reportaron que la infección en triatomíneos por *T. cruzi* está asociada con una mayor diversidad bacteriana en el microbioma intestinal (Montoya-Porras et al., 2018). Con respecto al uso y los avances en la paratransgénesis, Ratcliffe y colaboradores (2022) publicaron una revisión en la que incluye los avances de esta técnica en el control de las enfermedades vectoriales. En esta se incluyen avances realizados en dípteros y hemípteros. Para los hemípteros presenta una tabla con los resultados de varios estudios, en los cuales se ha logrado liberar moléculas contra *T. cruzi* a partir de bacterias simbiotes modificadas genéticamente. Gracias a esto, hay evidencia de la eliminación del parásito a partir de paratransgénesis, aunque ninguno de estos estudios fue realizado en *T. dimidiata* (Ratcliffe et al., 2022).



## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

### **8 Objetivos**

#### **8.1 Objetivo General**

**8.1.1** Caracterizar la microbiota bacteriana intestinal de *Triatoma dimidiata* domésticas infectadas y no infectadas con *Trypanosoma cruzi* provenientes de Guatemala.

#### **8.2 Objetivos Específicos**

**8.2.1** Establecer la biodiversidad involucrada en la microbiota intestinal de *T. dimidiata* domésticas infectadas y no infectadas con *T. cruzi*.

**8.2.2** Describir la distribución taxonómica bacteriana de *T. dimidiata* domésticas infectadas y no infectadas con *T. cruzi*.

**8.2.3** Identificar los biomarcadores microbianos de *T. dimidiata* domésticas infectadas y no infectadas con *T. cruzi*.

**8.2.4** Identificar las especies de bacterias con potencial de paratransgénico presentes en la microbiota intestinal de *T. dimidiata* domésticas infectadas con *T. cruzi*.

### **9 Hipótesis**

El componente bacteriano de la microbiota intestinal de *Triatoma dimidiata* domésticas infectadas con *Trypanosoma cruzi* será más diverso a la de aquellos individuos que no se encuentren infectados con *Trypanosoma cruzi*.

### **10 Materiales y métodos**

#### **10.1 Enfoque de la investigación**

Enfoque cuantitativo.

## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

### **10.2 Método**

Se llevaron a cabo colectas manuales domiciliarios y peridomiciliarios de individuos adultos vivos de *T. dimidiata* en los departamentos de Jutiapa, Huehuetenango y El Progreso. La colecta fue llevada a cabo por el personal técnico experimentado del programa vectores de la Dirección de Área de Salud de los departamentos. Los especímenes recolectados fueron enviados al LENAP en donde se verificó la especie de los individuos colectados mediante claves dicotómicas y se determinó la presencia y ausencia de *T. cruzi* mediante el análisis microscópico de las heces de los especímenes. Posterior a esto se realizó la disección de los individuos en condiciones asépticas para la obtención de la muestra intestinal de cada individuo. Cada muestra intestinal fue almacenada en un tubo eppendorf y se almacenó en un congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la extracción del ADN. La identificación taxonómica, la determinación de la presencia y ausencia de *T. cruzi* y la disección de individuos fue guiada por biólogos y químicos biólogos experimentados en dichos procedimientos.

El laboratorio de biología molecular del LENAP cuenta con una área de extracción de ADN en donde se realizó el proceso de extracción de ADN genómico para cada una de las muestras intestinales. El análisis microbiano intestinal para cada muestra se realizó mediante el método de secuenciación de nueva generación para el Gen 16s rRNA. Esto se realizó mediante la plataforma Miseq de Illumina utilizando el kit de secuenciación Floracheck™ (Admera Health). La secuenciación fue realizada por la empresa Admera Health (New Jersey, USA) especializada en biología molecular. Por último, para realizar los análisis bioinformáticos y estadísticos, el equipo contó con biólogos con experiencia para realizar dichos análisis y elaborar el informe final.

## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

### **10.3 Recolección de información**

Las muestras empleadas en este estudio fueron de individuos vivos adultos de *T. dimidiata* infectados y no infectados con *T. cruzi* provenientes de Jutiapa, Huehuetenango y El Progreso. Las muestras fueron colectadas durante los meses de marzo a septiembre del 2023. Se realizó un muestreo a conveniencia de 15 especímenes infectados con *T. cruzi* y 15 no infectados con *T. cruzi* para un total de 30 muestras. La muestra definida a conveniencia se debe a que se trata de un estudio exploratorio y a los elevados costos para la secuenciación de ADN. Todos los individuos que se incluyeron en el estudio fueron disectados en la zona intestinal bajo condiciones asépticas y se realizó una extracción de ADN genómico de dicha zona intestinal. La identificación taxonómica, análisis de microscopía para la determinación de la presencia y ausencia de *T. cruzi* y la disección intestinal fue realizada por biólogos y químicos biólogos. La extracción de ADN genómico de las muestras intestinales se realizó mediante el protocolo de extracción de tejido de insectos con DNazol.

Universo o población: especímenes de *T. dimidiata* de Jutiapa, Huehuetenango y El Progreso.

Muestra: 15 especímenes de *T. dimidiata* infectados con *T. cruzi* y 15 especímenes de *T. dimidiata* no infectados con *T. cruzi* colectados en los departamentos de Jutiapa, Huehuetenango y El Progreso. Muestra definida a conveniencia debido a que se trata de un estudio exploratorio y a los elevados costos de secuenciación.

Criterios de inclusión: Especímenes vivos de estadio adultos y de la especie *T. dimidiata*.

Criterios de no inclusión: Especímenes muertos de estadios inmaduros y que no pertenecen a la especie *T. dimidiata*.

Criterios de selección de informantes: No aplica.



## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

Instituciones: Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología (LENAP), Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala; Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

### **10.4 Técnicas e instrumentos**

#### **Colecta de especímenes**

Se realizaron colectas directas (manuales) de *T. dimidiata* adultos y vivos en los departamentos de Jutiapa, Huehuetenango y El Progreso durante los meses de Marzo a Septiembre del 2023. Las colectas fueron dentro de los domiciliarios y peridomiciliarios y fue llevada a cabo por el personal técnico del programa vectores de la Dirección de Área de Salud de dichos departamentos. Los domicilios donde se realizaron las colectas, fueron seleccionados por los técnicos del área de vectores según la accesibilidad que estos tuvieron al domicilio. Pinzas entomológicas y linternas fueron usadas para la colecta de los especímenes vivos y estos fueron depositados en frascos colectores. Las colectas fueron llevadas a cabo hasta que se contó con 15 especímenes de *T. dimidiata* infectados con *T. cruzi* y 15 especímenes de *T. dimidiata* no infectados con *T. cruzi*. Los especímenes recolectados fueron enviados vivos al LENAP donde se verificó la especie de cada uno de los especímenes, se determinó si están infectados con *T. cruzi*, se disectaron para la obtención de los intestinos y se realizó la extracción de ADN de cada una de las muestras.

#### **Identificación Taxonómica de *T. dimidiata***

La identificación taxonómica de los especímenes a nivel de especie se realizó mediante claves dicotómicas entomológicas. Los especímenes recolectados vivos fueron anestesiados mediante su exposición a una temperatura de -20 °C por 5 minutos. A los especímenes se les asignó un código de muestra único.

## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

### **Detección de *T. cruzi***

La detección de *T. cruzi* en los especímenes de *T. dimidiata* se realizó mediante microscopía. Para esto, se presionó el abdomen de los especímenes vivos hasta obtener gotas de heces fecales. Las heces fecales fueron colectadas, diluidas en 1 gota de solución salina y fueron observadas en un microscopio a un aumento de 220x y 400x por 5 minutos para la búsqueda de *T. cruzi* activos.

### **Disección de especímenes y extracción de ADN**

Los especímenes recolectados fueron sacrificados por medio de incubación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La superficie de los especímenes fue esterilizada mediante una solución de Hipoclorito de sodio al 0.50% y lavados utilizando agua destilada antes de su disección. La disección de los especímenes se realizó bajo condiciones asépticas y usando equipo de protección personal (guantes, mascarilla y lentes), esta consistió en realizar un corte lateral en la membrana conectiva y retirando la cutícula dorsal mediante un fórceps esterilizado, agujas de disección descartables y un estereomicroscopio. Posterior a esto, se obtuvo el intestino desde el proventrículo hasta el recto y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso correspondiente.

El ADN genómico fue extraído de las muestras intestinales de manera individual mediante DNAzol (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante con ligeras variantes para optimizar la recuperación del ADN. El intestino de cada muestra fue individualizado en tubos eppendorf de 1.5 mL. Se añadió a cada muestra intestinal 100  $\mu\text{L}$  de DNAzol y se procesó con un pistilo estéril hasta no ver partes reconocibles. Los tubos se centrifugaron por 10 minutos a una velocidad de 10,400 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante resultante de cada muestra se transfirió a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL. El pellet resultante del macerado se almacenó a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior uso en extracciones de ADN. Fueron añadidos 500  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto a cada tubo con el sobrenadante de cada muestra y se mezcló por inversión 8 veces. Se

## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 3 minutos y luego se centrifugaron a una velocidad de 6,600 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se removió el sobrenadante de cada muestra y se lavó el pellet con 800  $\mu\text{L}$  de etanol al 70%. Posteriormente se hizo una mezcla por inversión 6 veces y centrifugación a una velocidad de 6,600 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se removió el sobrenadante de cada muestra, y el pellet fue lavado con 800  $\mu\text{L}$  de etanol 70%, se mezcló por inversión 6 veces y centrifugación a 6,600 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Se removió el sobrenadante y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente por aproximadamente 30 a 45 minutos. Posteriormente el pellet fue resuspendido en 50 $\mu\text{L}$  de agua DEPC, cuantificado y almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

La cuantificación de ADN genómico para cada muestra fue realizada mediante el NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific). Cada muestra fue agitada vigorosamente utilizando un vortex y se centrifugó brevemente. Posteriormente se usó 1  $\mu\text{L}$  de agua DEPC como blanco de lectura en el pedestal del NanoDrop One. Posteriormente se colocó un 1  $\mu\text{L}$  de cada muestra individualmente para ser cuantificada. Se anotaron los valores de: concentración en  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , 260/280 y 260/230.

### **Secuenciación de las regiones V3-V5 del gen 16s rRNA**

Fueron enviados 20  $\mu\text{l}$  de ADN genómico de cada muestra a una concentración de 12.5  $\text{ng}/\mu\text{l}$  en cadena fría a la empresa Admera Health, empresa que proveyó el servicio de secuenciación. Las muestras fueron analizadas mediante secuenciación de nueva generación del gen 16s rRNA utilizando las regiones hipervariables V3-V5. La plataforma utilizada fue Illumina MiSeq y se obtuvieron lecturas con un largo de 2x250 (Paired-end). Los resultados de las secuenciaciones fueron obtenidas en formato FASTQ para su posterior análisis.

## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

### **10.5 Procesamiento y análisis de la información**

#### **Análisis de Secuencias**

Mediante el programa FASTQC versión 0.11.9 se evaluó la calidad de los datos en formato FASTQ, obtenidos de la secuenciación. Los factores de calidad evaluados mediante este programa fueron la calidad de secuencia por base, calidad de secuencia por mosaicos, puntuaciones de calidad por secuencia, contenido de nucleótidos por posición, porcentaje de GC en las secuencias, contenido de N en las secuencias, distribución del largo de las secuencias, nivel de secuencias duplicadas, sobrerrepresentación de secuencias y contenido de adaptadores. Se utilizó Cutadapta versión v1.16 versión para eliminar cada uno de los índices de las secuencias forward y reverse. Posterior a esto se utilizó el paquete DADA2 versión 1.16 (Callahan et al., 2016) para generar y analizar las gráficas de perfiles de calidad para las secuencias forward y reverse, filtrar, cortar, combinar y emparejar las lecturas forward y reverse, construir tablas de amplicones de secuencia de variantes (ASV), eliminar secuencias quimeras y realizar la asignación taxonómica a las ASV. La asignación taxonómica por DADA2 fueron realizadas mediante método de clasificación bayesiano. Se utilizó un valor 30 de calidad media para realizar el filtrado y corte de secuencias. Todas aquellas posiciones que presenten un valor de calidad media menor a 30 fueron eliminadas. Para la asignación taxonómica se utilizó la base de datos de referencia Silva 138 (Yilmaz, et al., 2014).

#### **Perfiles taxonómicos y presencia de bacterias paratransgénicas**

Mediante los paquetes Phyloseq versión 1.32.0 (McMurdie & Holmes, 2013), Ggplot2 versión 3.3.5 (Wickham, 2011) y MicrobiotaProcess v1.6.4, del ambiente estadístico R, se obtuvieron los perfiles taxonómicos correspondientes para cada grupo a nivel de dominio, filo, clase, orden, familia, género y especie.

#### **Índices de Alpha y Beta diversidad, distancia entre grupos y Biomarcadores**

## Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

La biodiversidad de *T. dimidiata* infectadas y no infectadas con *T. cruzi* fue evaluada mediante la diversidad alfa y beta. La diversidad alfa de la microbiota del grupo de *T. dimidiata* infectada con *T. cruzi* y del grupo de *T. dimidiata* no infectadas con *T. cruzi* fue evaluada mediante los índices Shannon, Shannon Inverso y diversidad observada mediante el paquete MicrobiotaProcess. La beta diversidad entre los grupos de *T. dimidiata* infectadas con *T. cruzi* y *T. dimidiata* fue evaluada mediante los valores de distanciamiento de Bray-Curtis utilizando el paquete MicrobiotaProcess v1.6.4. Biomarcadores para cada uno de los grupos fueron determinados mediante el análisis diferencial de expresión (Xu, *et al.*, 2023), usando el paquete de MicrobiotaProcess v1.6.4, utilizando un valor de significancia de  $p = 0.05$ .

### 11 Resultados y discusión

#### 11.1 Resultados

Se listan los datos de colectas de 34 especímenes de *T. dimidiata* colectados. De ellos 18 fueron positivos para *T. cruzi*, mientras que 17 fueron negativos. Obteniendo una positividad de infección de *T. cruzi* de 53% La mayoría de especímenes fueron recolectados en el departamento de Jutiapa (85%). La mayoría de especímenes recolectados fueron hembras (47%).

**Tabla 1.** Datos de colecta de especímenes de *Triatoma dimidiata*.

Número de muestra	Departamento	Municipio	Localidad	Estadio	<i>Trypanosoma cruzi</i>
1	Jutiapa	Jutiapa	Aldea El Cipres, Canton Valencia	Macho	Negativo



## Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

2	Jutiapa	Jutiapa	Aldea El Cipres, Canton Valencia	Macho	Negativo
3	El Progreso	Guastatoya	Barrio Cueva del Negro	Hembra	Positivo
4	Jutiapa	Jutiapa	Aldea El Cipres, Canton Valencia	5to	Negativo
5	Jutiapa	Jutiapa	Aldea El Cipres, Canton Valencia	5to	Negativo
6	Jutiapa	Jutiapa	Aldea El Cipres, Canton Valencia	Macho	Negativo
7	Jutiapa	Jutiapa	Aldea El Cipres, Canton Valencia	4to	Negativo
8	Jutiapa	Jutiapa	Aldea El Cipres, Canton Valencia	Hembra	Negativo
9	Jutiapa	Jutiapa	Aldea El Cipres, Canton Valencia	Macho	Negativo
10	Jutiapa	Jutiapa	Aldea El Cipres, Canton Valencia	Hembra	Positivo
11	Jutiapa	Jutiapa	Aldea El Cipres, Canton Valencia	Hembra	Positivo
12	Jutiapa	Jutiapa	Aldea El Cipres, Canton Valencia	Hembra	Positivo
13	Jutiapa	Jutiapa	Aldea El Cipres, Canton Valencia	Macho	Positivo
14	Jutiapa	Jutiapa	Aldea El Cipres, Canton Valencia	Hembra	Positivo
15	Jutiapa	Jutiapa	Aldea El Cipres, Canton Valencia	Macho	Positivo
16	Huehuetenango	Aguacatán San	Exchimal	Hembra	Positivo
17	Huehuetenango	Antonio Huista	Caserio Cahul	Hembra	Negativo
18	Huehuetenango	San Antonio	Caserio Las galeras	Hembra	Negativo



## Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

Huista					
19	El Progreso	Guastatoya	Cueva del negro	Hembra	Negativo
20	Jutiapa	Quesada	Aldea La Brea	Hembra	Negativo
21	Jutiapa	Quesada	Aldea La Brea	Hembra	Negativo
22	Jutiapa	Quesada	Aldea La Brea	4to	Negativo
23	Jutiapa	Quesada	Aldea La Brea	Macho	Negativo
24	Jutiapa	Quesada	Aldea La Brea	5to	Positivo
25	Jutiapa	Quesada	Aldea La Brea	5to	Positivo
26	Jutiapa	Quesada	Aldea La Brea	5to	Positivo
27	Jutiapa	Quesada	Aldea La Brea	Macho	Positivo
28	Jutiapa	Quesada	Aldea La Brea	Macho	Positivo
29	Jutiapa	Quesada	Aldea La Brea	Hembra	Positivo
30	Jutiapa	Quesada	Aldea La Brea	Macho	Positivo
31	Jutiapa	Quesada	Aldea La Brea	Hembra	Positivo
32	Jutiapa	Quesada	Aldea La Brea	3er	Positivo
33	Jutiapa	Quesada	Aldea La Brea	Hembra	Positivo
34	Jutiapa	Quesada	Aldea La Brea	Hembra	Positivo

Fuente: resultados de proyecto de investigación.

Se listan los valores de concentración y calidad del ADN extraído provenientes de 34 especímenes de *T. dimidiata*.

**Tabla 2.** Concentraciones y calidad de ADN extraídos.

Número de muestra	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Volumen	ng/ul	260/280	260/230
1	Negativo	49 µl	21,46	1,8	0,81
2	Negativo	49 µl	12,91	1,76	0,68
3	Positivo	49 µl	4,23	1,73	0,12
4	Negativo	49 µl	39,66	1,47	0,47
5	Negativo	49 µl	13,01	1,4	0,14
6	Negativo	49 µl	121,5	0,33	0,29

## Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

7	Negativo	49 µl	14,64	2,01	0,97
8	Negativo	49 µl	2,14	1,41	0,09
10	Negativo	49 µl	6,98	1,89	0,13
11	Positivo	49 µl	8,58	1,44	0,2
12	Positivo	49 µl	180,17	2,02	0,7
13	Positivo	49 µl	321,51	2,03	1,5
14	Positivo	49 µl	543,6	1,84	1,3
15	Positivo	49 µl	1,7	1,99	0,06
16	Positivo	49 µl	8,53	2,05	1,45
17	Negativo	49 µl	7,65	1,12	0,28
18	Negativo	49 µl	4,23	1,53	0,28
19	Negativo	49 µl	97,5	1,86	0,53
20	Negativo	49 µl	299,46	2,03	1,58
21	Negativo	49 µl	4,48	3,08	0,11
22	Negativo	49 µl	26,38	1,44	0,34
23	Negativo	49 µl	94,83	1,96	1,73
24	Positivo	49 µl	10,88	1,82	0,12
25	Positivo	49 µl	5,78	1,96	0,5
26	Positivo	49 µl	10,76	1,57	0,48
27	Positivo	49 µl	93,43	2,04	0,5
28	Positivo	49 µl	633,65	1,99	1,24
29	Positivo	49 µl	20,85	2,07	0,1
30	Positivo	49 µl	50,85	1,77	0,24
31	Positivo	49 µl	107,14	1,9	0,37
32	Positivo	49 µl	2815,81	1,81	1,93
33	Positivo	49 µl	433,07	1,93	1,08
34	Positivo	49 µl	90,16	1,73	0,46

Fuente: resultados de proyecto de investigación.



## Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

Se listan los resultados de la secuenciación del gen 16S rRNA de 23 muestras. Por cada muestra se obtuvieron secuencias paired-end. Las secuencias totales obtenidas por muestra fueron entre 118588 y 153675. Las bases totales obtenidas por muestra fueron entre 29.4 y 38.5 Mbp. Las longitudes de las secuencias obtenidas fueron de 53 pb. Los %GC obtenidas fueron entre 52 y 57.

**Tabla 3.** Resultados de la secuenciación del gen 16S rRNA de 23 muestras.

Número de muestra		Secuencias totales	Bases totales (Mbp)	Longitud de la secuencia (bp)	%GC*
23223D-01-01	Forward (R1)	153675	38.5	251	52
	Reverse (R2)	153675	38.5	251	52
23223D-01-02	Forward (R1)	119551	30	251	53
	Reverse (R2)	119551	30	251	53
23223D-01-03	Forward (R1)	128471	32.2	251	54
	Reverse (R2)	128471	32.2	251	52
23223D-01-06	Forward (R1)	121045	30.3	251	54
	Reverse (R2)	121045	30.3	251	52
23223D-01-09	Forward (R1)	123810	31	251	56
	Reverse (R2)	123810	31	251	56
23223D-01-010	Forward (R1)	121405	30.4	251	53
	Reverse (R2)	121405	30.4	251	53
23223D-01-011	Forward (R1)	138450	34.7	251	53
	Reverse (R2)	138450	34.7	251	54



## Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

23223D-01-012	Forward (R1)	117308	29.4	251	55
	Reverse (R2)	117308	29.4	251	55
23223D-01-015	Forward (R1)	125583	31.5	251	54
	Reverse (R2)	125583	31.5	251	53
23223D-01-016	Forward (R1)	118592	29.7	251	53
	Reverse (R2)	118592	29.7	251	53
23223D-01-017	Forward (R1)	125300	31.4	251	53
	Reverse (R2)	125300	31.4	251	53
23223D-01-018	Forward (R1)	116358	29.2	251	53
	Reverse (R2)	116358	29.2	251	53
23223D-01-019	Forward (R1)	121497	30.4	251	56
	Reverse (R2)	121497	30.4	251	57
23223D-01-020	Forward (R1)	123593	31	251	54
	Reverse (R2)	123593	31	251	54
23223D-01-021	Forward (R1)	120715	30.2	251	54
	Reverse (R2)	120715	30.2	251	53
23223D-01-022	Forward (R1)	124176	31.1	251	53
	Reverse (R2)	124176	31.1	251	53
23223D-01-023	Forward (R1)	137914	34.6	251	53
	Reverse (R2)	137914	34.6	251	53
23223D-01-024	Forward (R1)	122342	30.7	251	53
	Reverse (R2)	122342	30.7	251	53
23223D-01-025	Forward (R1)	143798	36	251	55

## Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

	Reverse (R2)	143798	36	251	54
23223D-01-026	Forward (R1)	129445	32.4	251	53
	Reverse (R2)	129445	32.4	251	53
23223D-01-027	Forward (R1)	118588	29.7	251	53
	Reverse (R2)	118588	29.7	251	53
23223D-01-028	Forward (R1)	128101	32.1	251	53
	Reverse (R2)	128101	32.1	251	53
23223D-01-029	Forward (R1)	130421	32.7	251	53
	Reverse (R2)	130421	32.7	251	53

\*%GC = Porcentaje de guanina y citosina.

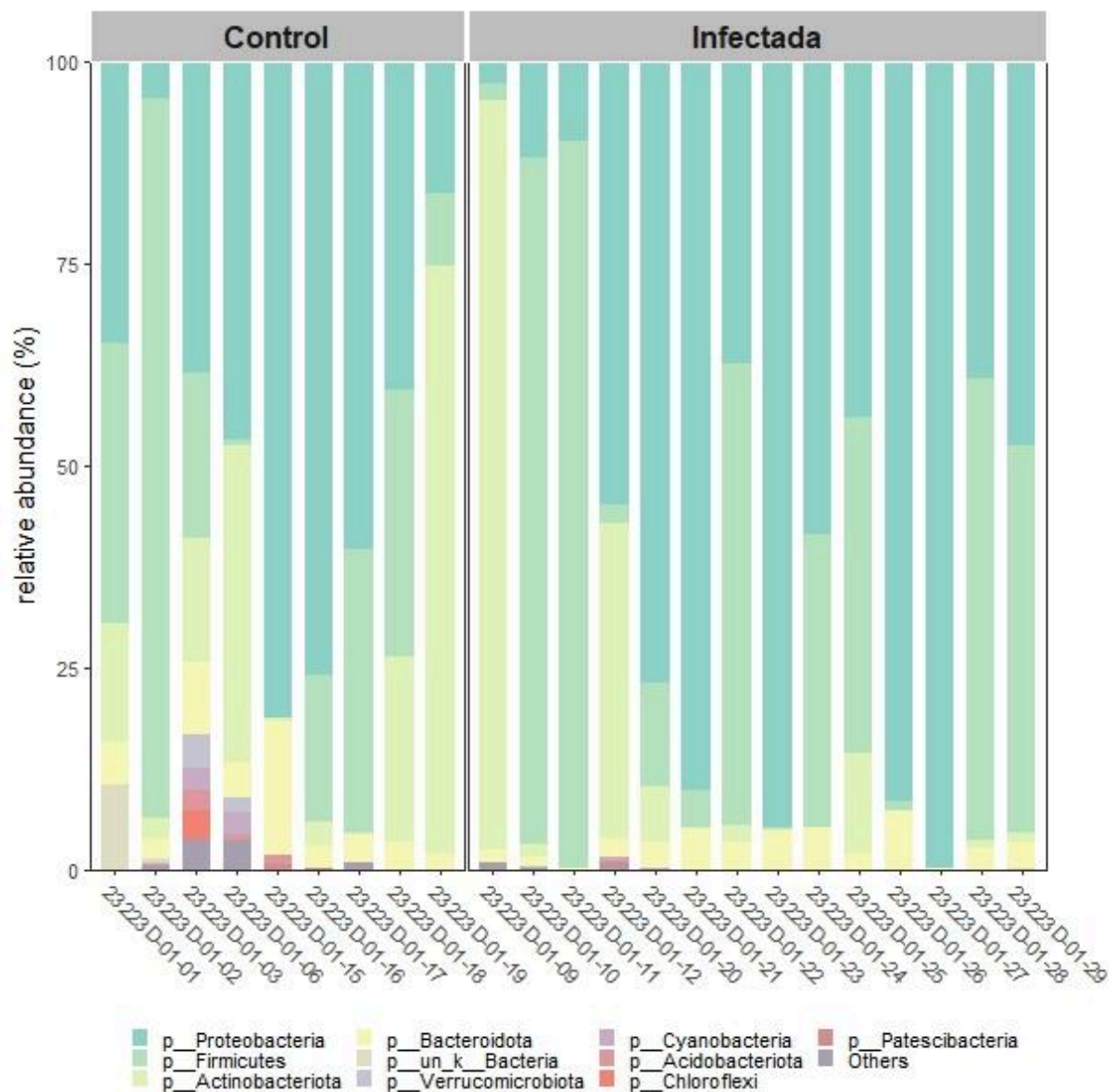
Fuente: resultados de proyecto de investigación.

El análisis de perMANOVA indica una diferencia significativa entre la microbiota de los especímenes de *T. dimidiata* a partir de la localidad de origen de los mismos.

**Tabla 4.** Comparación de la microbiota presente en *T. dimidiata* mediante análisis de varianza multivariado permutacional (perMANOVA).

Variable	<i>F</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>	<i>p</i>
<i>Trypanosoma cruzi</i>	1.8861	0.07904	0.099
Localidad	4.4057	0.18463	<b>0.003</b>
Estadio	1.0790	0.09043	0.331
Sitio de Captura	0.5454	0.02286	0.762

## Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

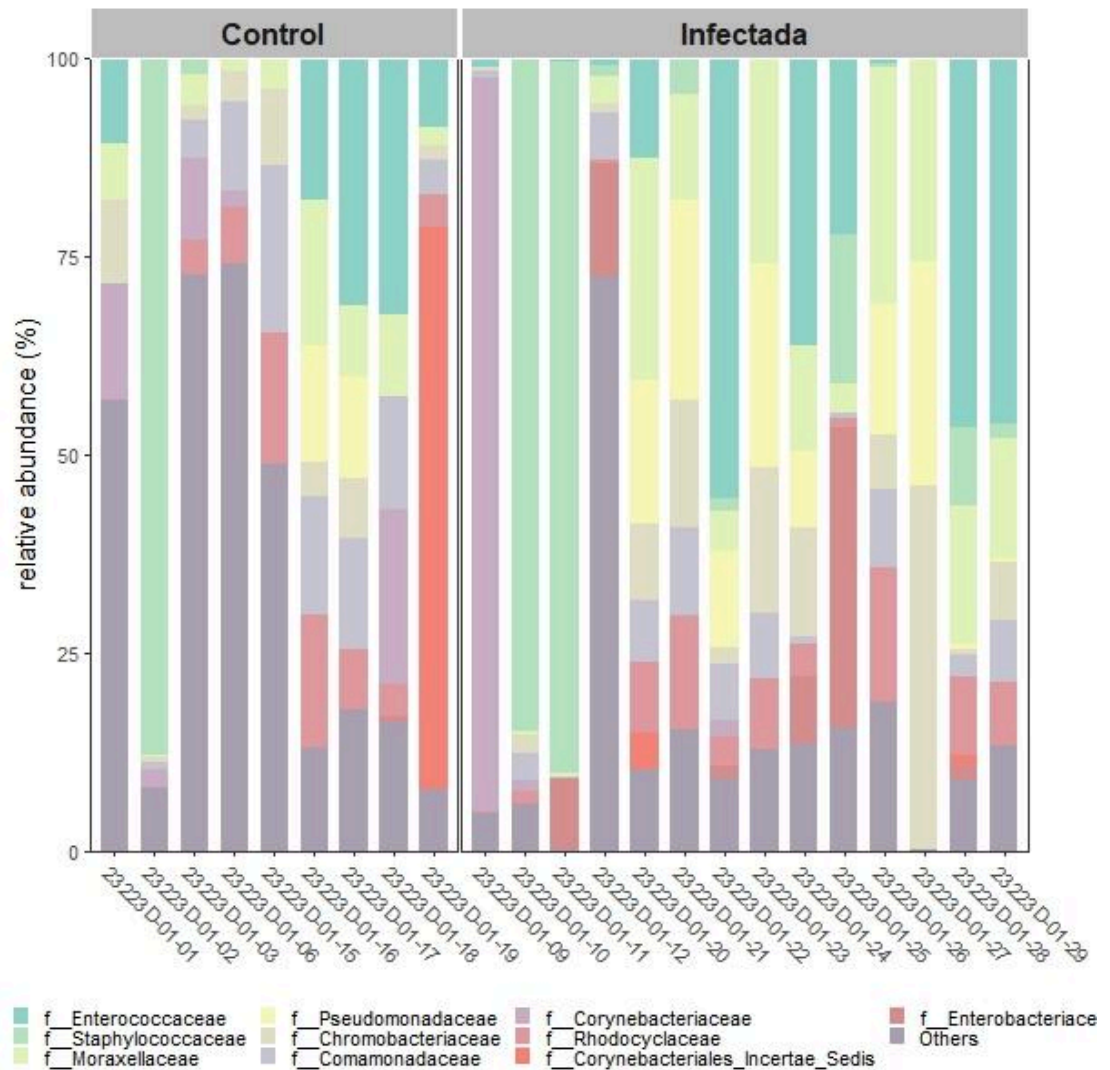


**Figura 1.** Abundancia relativa de los Filos presentes en *T. dimidiata* infectadas y no infectadas por *T. cruzi*.

La abundancia relativa obtenida entre ambos grupos es similar. En ambos grupos los filos más abundantes fueron Proteobacteria, Firmicutes y Actinobacteriota, en ese orden respectivo.



## Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

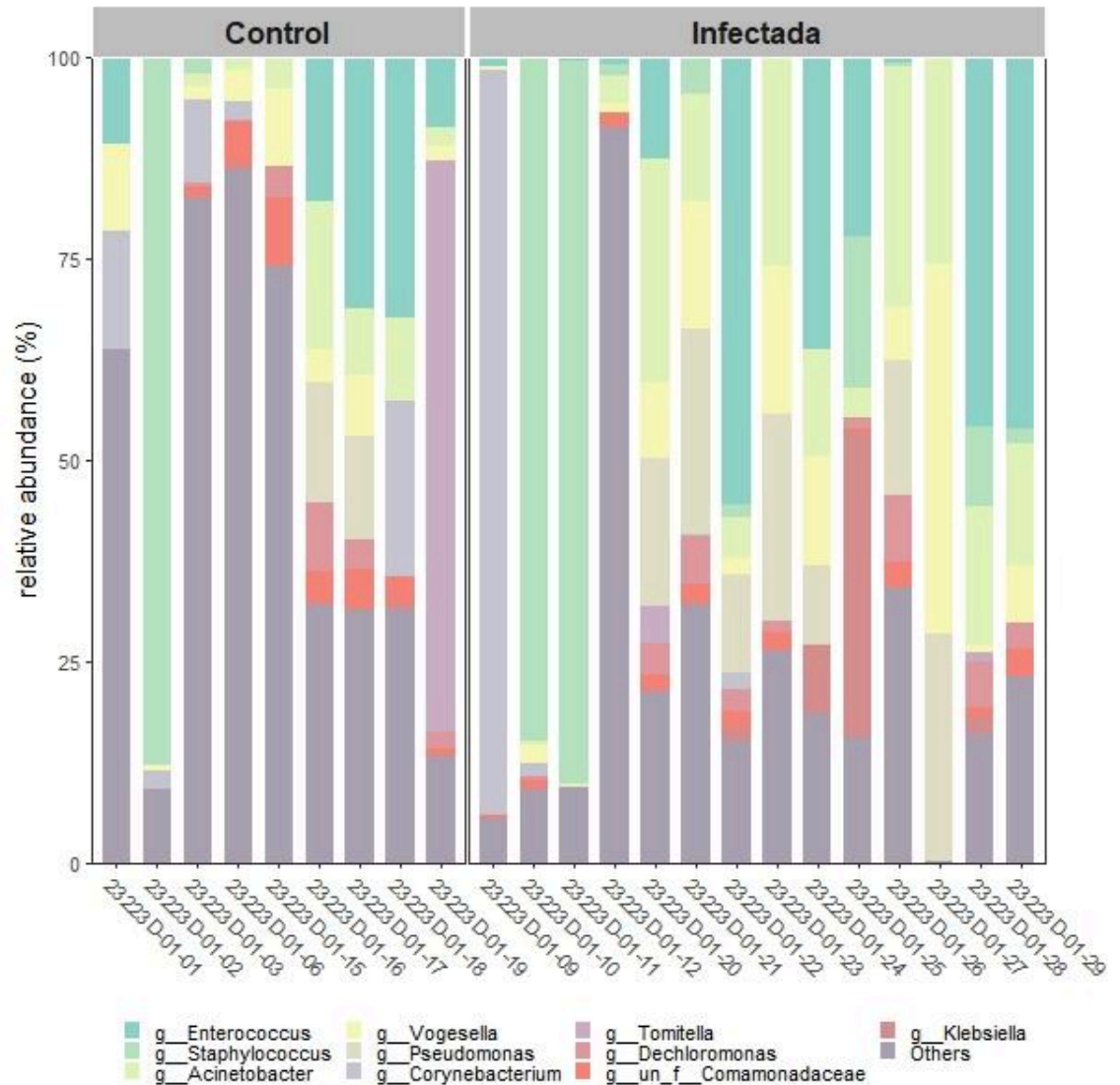


**Figura 2.** Abundancia relativa de las Familias presentes en *T. dimidiata* infectadas y no infectadas por *T. cruzi*.

Se observan abundancias relativas similares entre ambos grupos a nivel de Familia. En el grupo de infectadas las familias más abundantes fueron Pseudomonadaceae, Staphylococcaceae, Enterococcaceae y Enterobacteriaceae. En el grupo de controles las familias más abundantes fueron Rhodocyclaceae, Staphylococcaceae y Comamonadaceae.



## Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

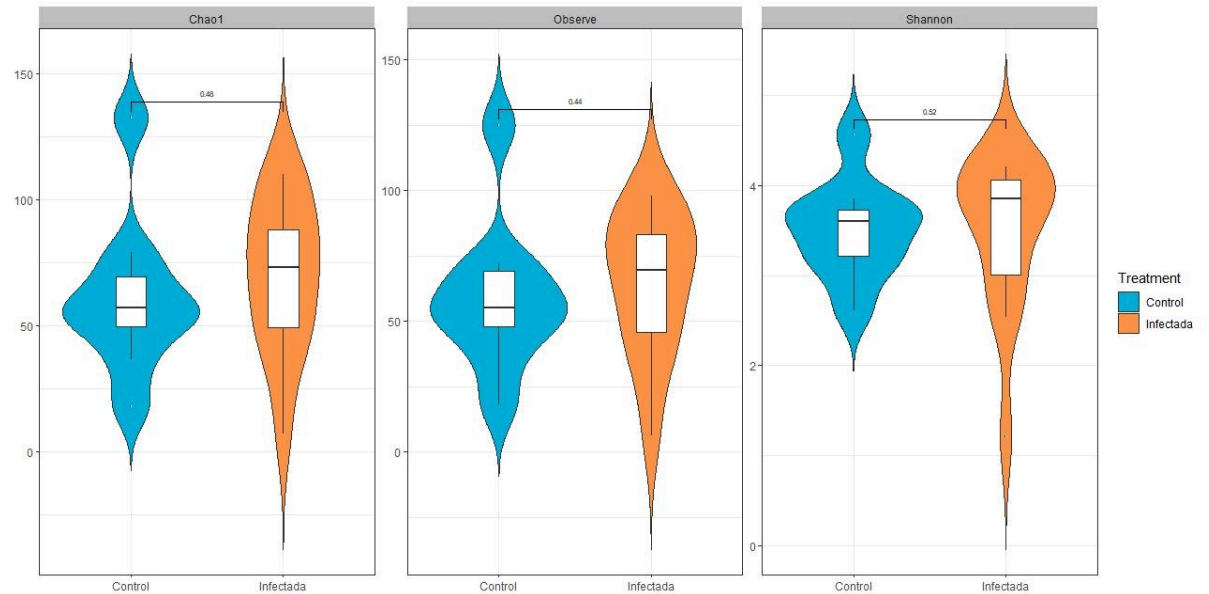


**Figura 3.** Abundancia relativa de los Géneros presentes en *T. dimidiata* infectadas y no infectadas por *T. cruzi*.

Se observan abundancias relativas similares entre ambos grupos a nivel de Género. En el grupo de infectadas los géneros más abundantes fueron *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Enterococcus*. En el grupo de controles los géneros más abundantes fueron *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Enterococcus* y *Acinetobacter*.

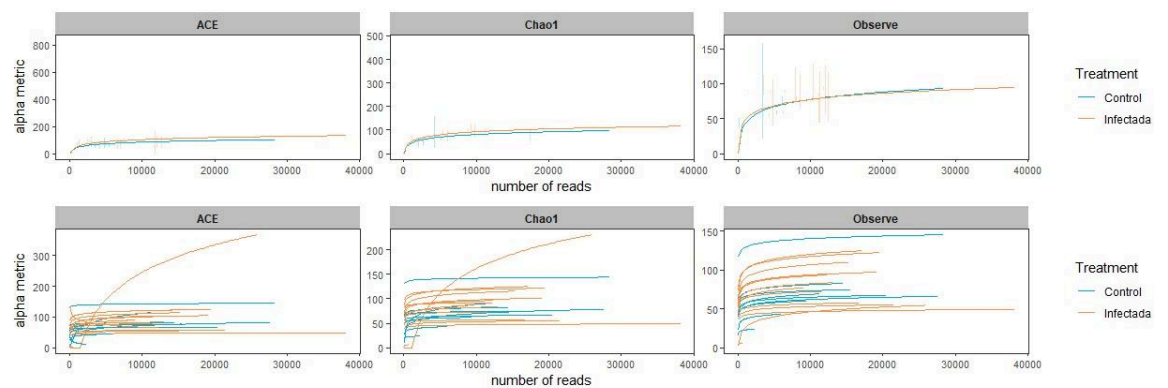


## Informe final de proyecto de investigación. Año 2023



**Figura 4.** Diversidad alfa de la microbiota presente en *T. dimidiata* infectadas y no infectadas por *T. cruzi*.

El análisis de alfa diversidad llevado a cabo mediante Chao1, Observada y Shannon indica que no hay una diferencia significativa entre ambos grupos comparados, con valores de  $p$  de 0.48, 0.44 y 0.58, respectivamente.

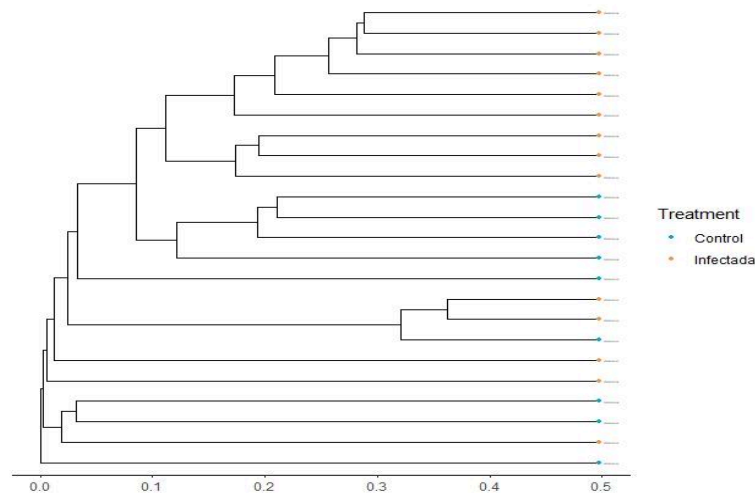


**Figura 5.** Diversidad alfa e índices de rarefacción de la microbiota presente en *T. dimidiata* infectadas y no infectadas por *T. cruzi*.



## Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

El análisis de alfa diversidad e índices de rarefacción llevados a cabo mediante ACE, Chao1 y Observada indican que la diversidad presente en ambos grupos es similar.



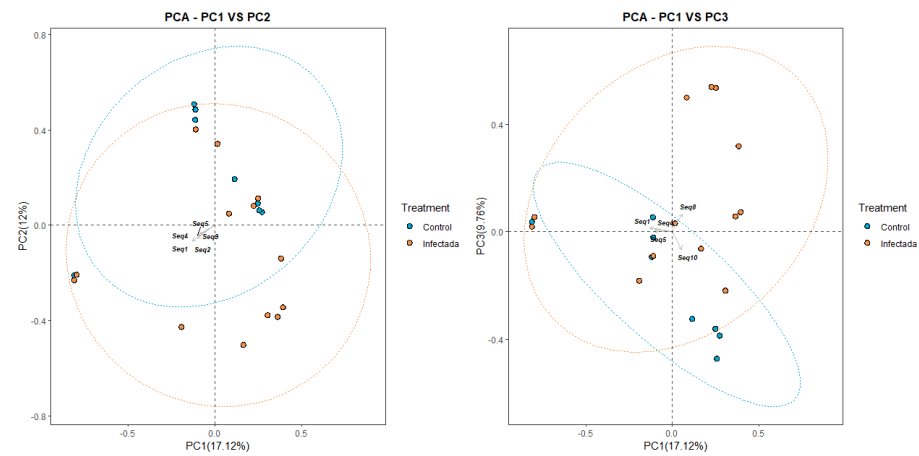
**Figura 6.** Diversidad beta de la microbiota presente en *T. dimidiata* infectadas y no infectadas por *T. cruzi*.

El dendrograma realizado por medio de distancias de Bray-Curtis indica la existencia de tres grupos definidos. Los primeros dos compuestos por la microbiota presente en *T. dimidiata* infectadas y no infectadas por *T. cruzi*, respectivamente; mientras que el tercer grupo se encuentra compuesto por microbiota presente tanto en *T. dimidiata* infectadas como no infectadas.

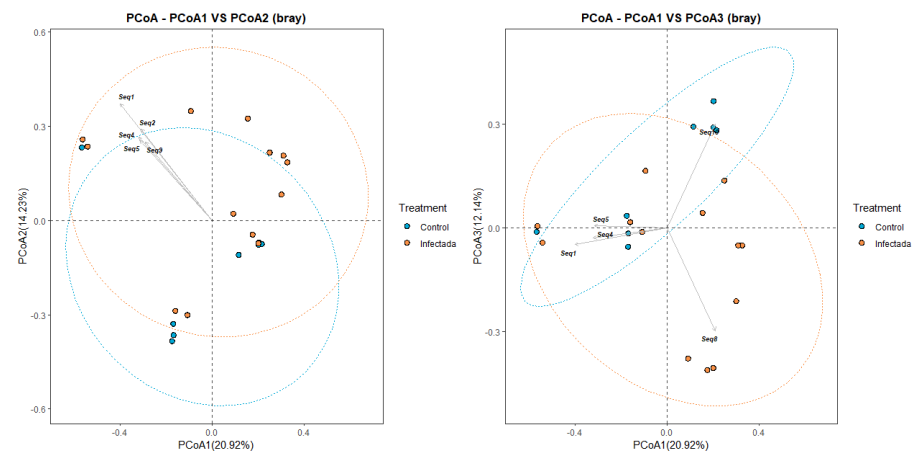




## Informe final de proyecto de investigación. Año 2023



A



B

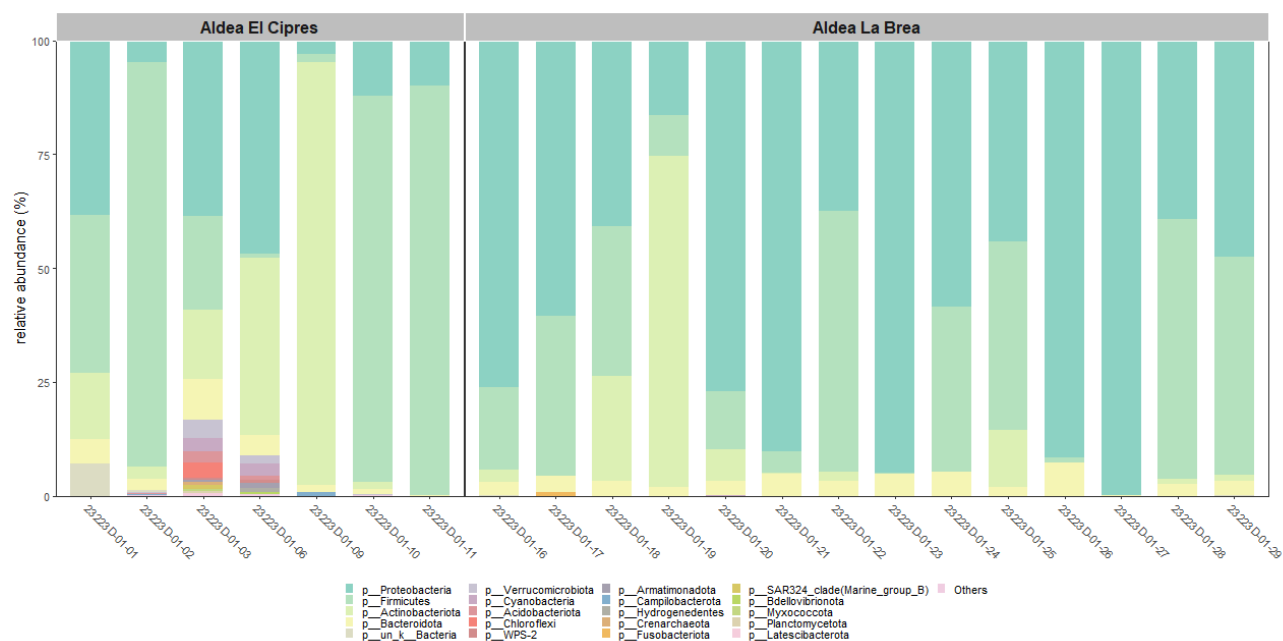
**Figura 7.** Análisis comparativo de la microbiota presente en *T. dimidiata* infectadas y no infectadas por *T. cruzi* a partir de PCA y PCoA.

A=PCA. B=PCoA.

Los gráficos de PCA y PCoA obtenidos demuestran que no existen diferencias en la microbiota presente en *T. dimidiata* infectadas y no infectadas por *T. cruzi*.

## Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

Al haberse encontrado una diferencia significativa entre la microbiota de los especímenes de *T. dimidiata* a partir de la localidad de origen de los mismos por medio del análisis de perMANOVA, se procedió a caracterizar la microbiota bacteriana de los especímenes de *T. dimidiata* en función de dicha variable. A continuación, se presentan y describen los resultados correspondientes a dichos análisis.

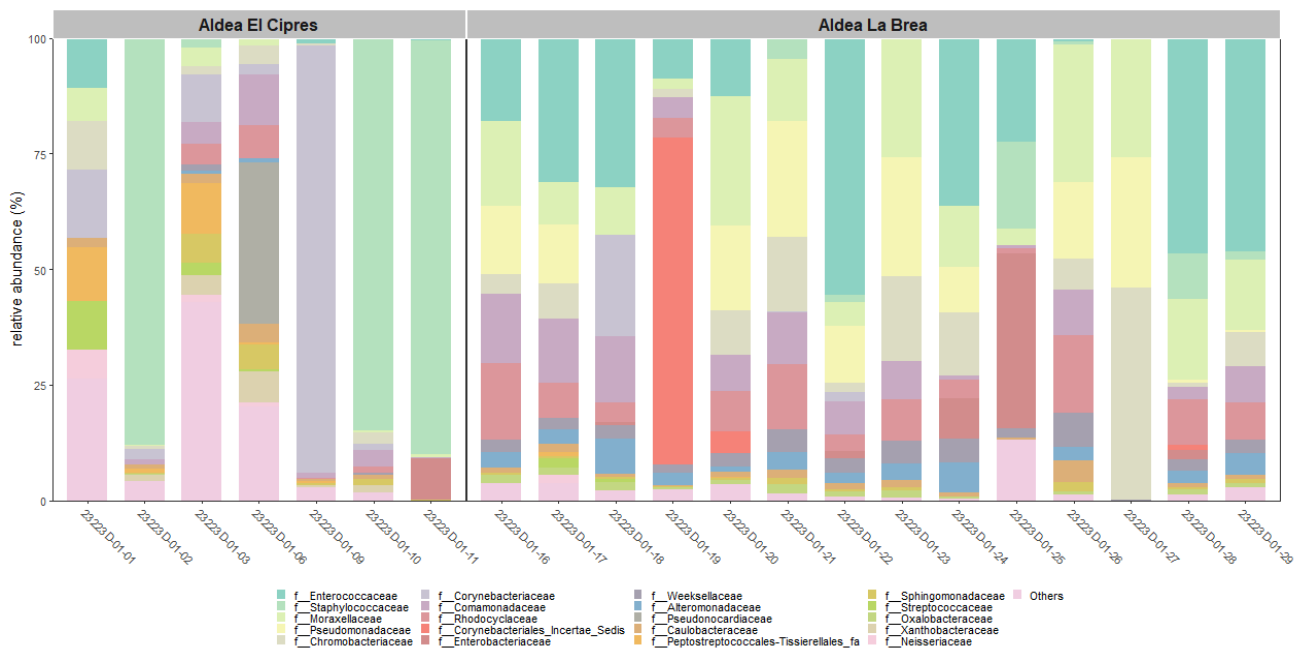


**Figura 8.** Abundancia relativa de los Filos presentes en *T. dimidiata* provenientes de las localidades Aldea La Brea y Aldea El Ciprés.

Se presentan las abundancias relativas entre ambos grupos a nivel de Filo. En la localidad Aldea La Brea se obtuvo una mayor abundancia relativa del Filo Proteobacteria. Por otro lado, los especímenes de la Aldea El Ciprés presentaron una mayor abundancia relativa del Filo Firmicutes.



## Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

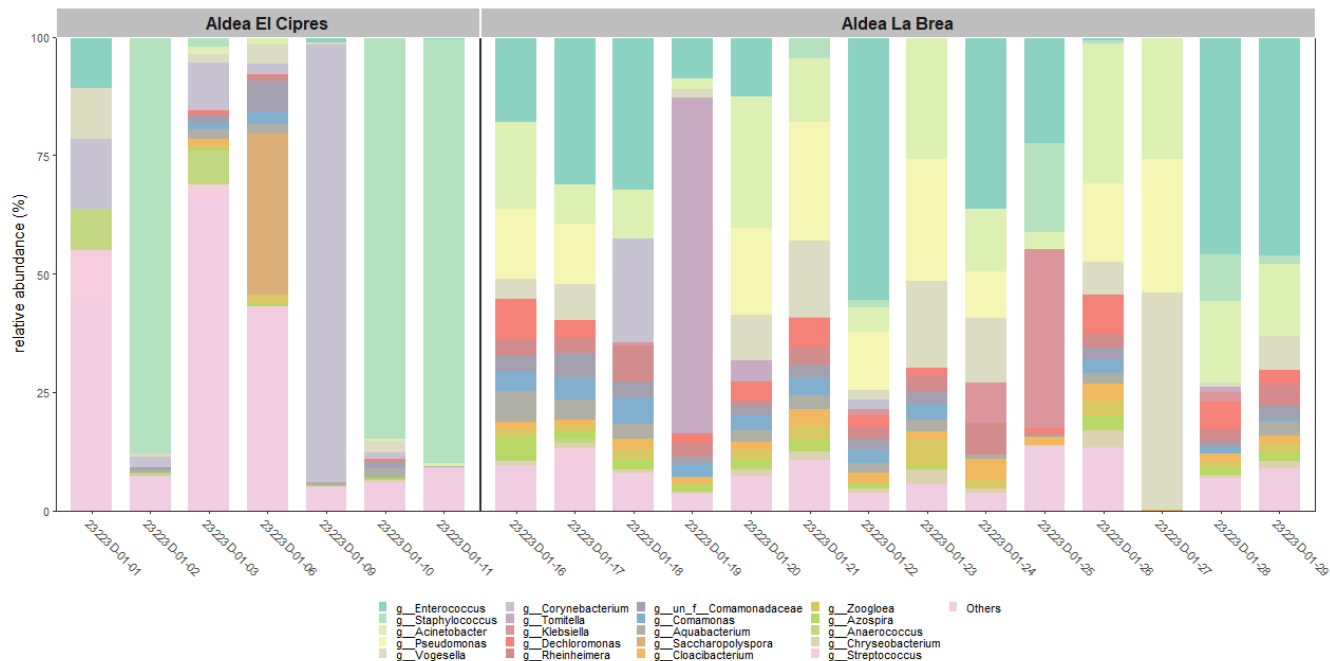


**Figura 9.** Abundancia relativa de las Familias presentes en *T. dimidiata* provenientes de las localidades Aldea La Brea y Aldea El Ciprés.

Se presentan las abundancias relativas entre ambos grupos a nivel de Familia. En la localidad Aldea El Ciprés se obtuvo una mayor abundancia relativa las Familias Staphylococcaceae y Corynebacteriaceae. Por otro lado, los especímenes de la Aldea La Brea presentaron una mayor abundancia relativa de las Familias Enterococcaceae y Moraxellaceae.



## Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

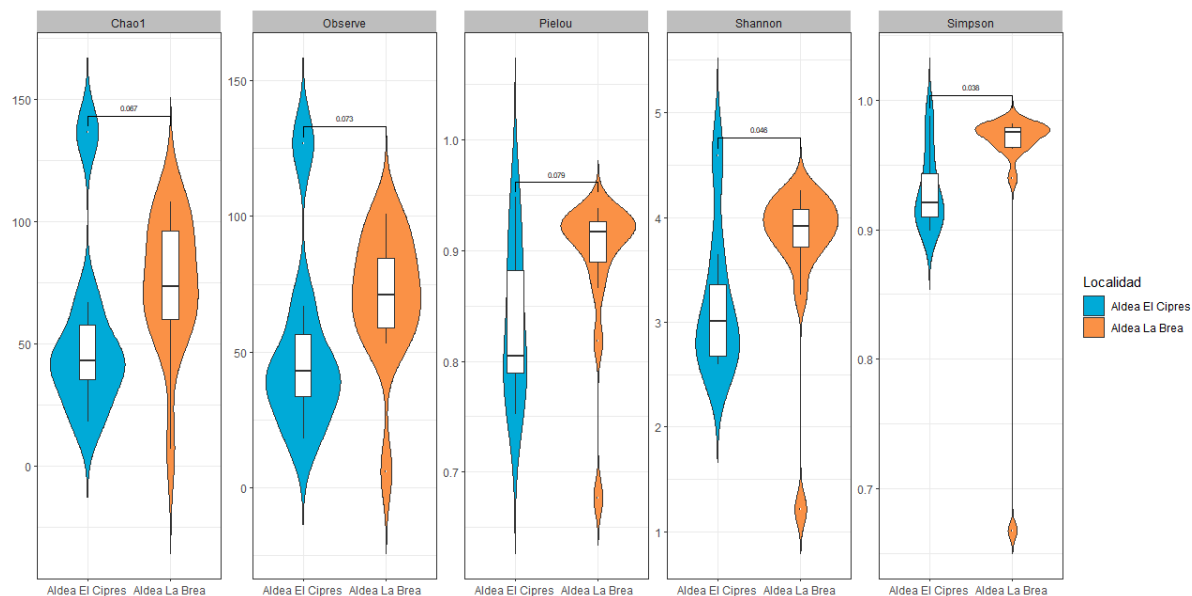


**Figura 10.** Abundancia relativa de los Géneros presentes en *T. dimidiata* provenientes de las localidades Aldea La Brea y Aldea El Ciprés.

Se presentan las abundancias relativas entre ambos grupos a nivel de Género. En la localidad Aldea El Ciprés se obtuvo una mayor abundancia relativa de los Géneros *Staphylococcus* y *Corynebacterium*. Por otro lado, los especímenes de la Aldea La Brea presentaron una mayor abundancia relativa de los Géneros *Enterococcus* y *Acinetobacter*.



## Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

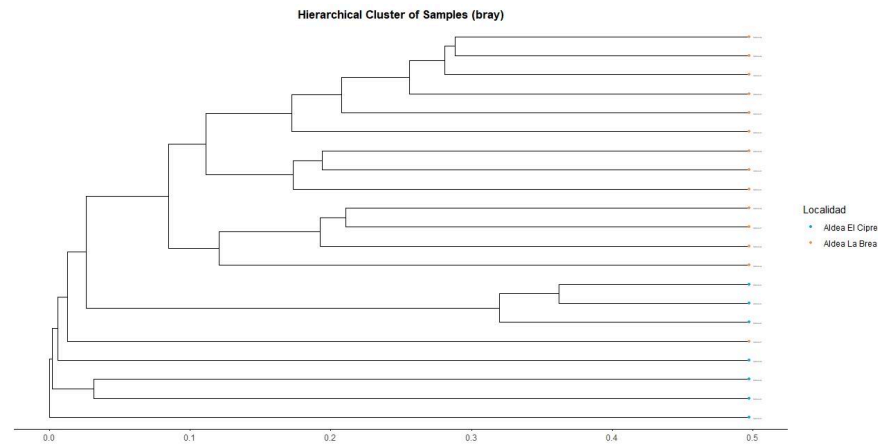


**Figura 11.** Diversidad alfa de la microbiota presente en *T. dimidiata* provenientes de las localidades Aldea La Brea y Aldea El Ciprés.

El análisis de alfa diversidad llevado a cabo mediante Shannon y Simpson indica que existe una diferencia significativa entre ambos grupos comparados, con valores de  $p$  de 0.046 y 0.038, respectivamente. Los demás índices únicamente presentaron una tendencia a la significancia para la diferencia de la microbiota presente en *T. dimidiata* provenientes de las localidades Aldea La Brea y Aldea El Ciprés.

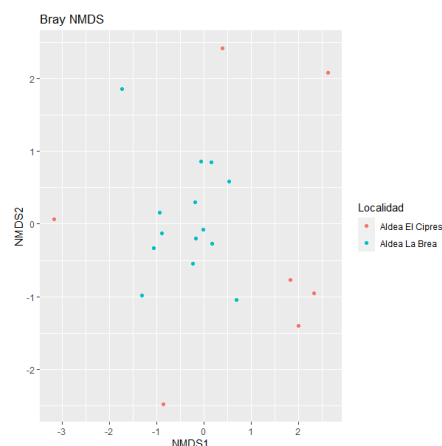


## Informe final de proyecto de investigación. Año 2023



**Figura 12.** Diversidad beta de la microbiota presente en *T. dimidiata* provenientes de las localidades Aldea La Brea y Aldea El Ciprés.

El dendrograma realizado por medio de distancias de Bray-Curtis indica la existencia de dos grupos definidos, cada uno de ellos compuestos por la microbiota presente en *T. dimidiata* provenientes de las localidades Aldea La Brea y Aldea El Ciprés, respectivamente.

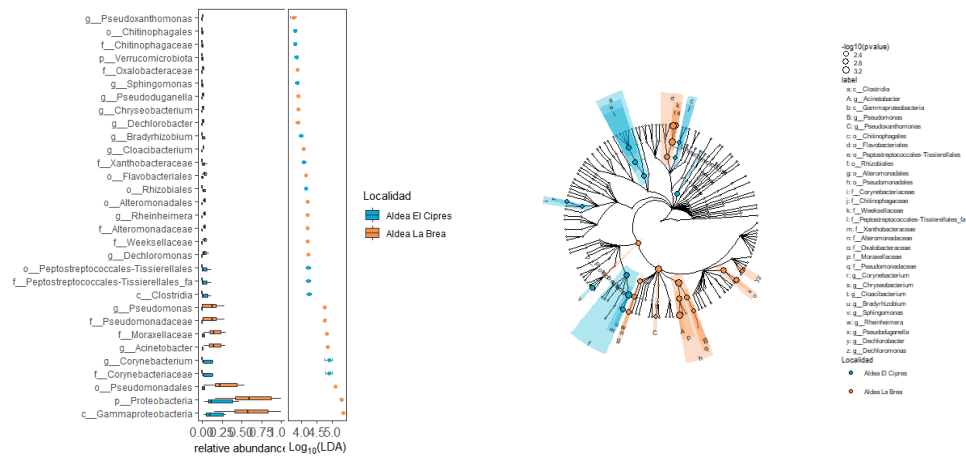


**Figura 13.** Gráfico de NMDS de la microbiota de especímenes de *T. dimidiata* provenientes de las localidades Aldea La Brea y Aldea El Ciprés calculado con distancias de Bray-Curtis.



## Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

El gráfico de NMDS realizado por medio de distancias de Bray-Curtis indica la existencia de dos grupos definidos, cada uno de ellos compuesto por la microbiota presente en *T. dimidiata* provenientes de las localidades Aldea La Brea y Aldea El Ciprés, respectivamente.



**Figura 14.** Biomarcadores de la microbiota presente en *T. dimidiata* provenientes de las localidades Aldea La Brea y Aldea El Ciprés.

Se han identificado biomarcadores de la microbiota presente en *T. dimidiata* específicos para ambas localidades. Para la localidad de Aldea La Brea destacan los géneros *Cloacibacterium*, *Rheinheimerera*, *Pseudoxanthomonas*, *Acitenobacter*, *Pseudomonas* y *Dechloromonas*. Por otra parte, en la Aldea El Ciprés los géneros *Clostridia*, *Corynebacterium*, *Bradyrhizobium* y *Sphingomonas* se presentan como biomarcadores específicos.

### 12.2 Discusión de resultados

La distribución taxonómica de la microbiota presente en *T. dimidiata* se presenta en las figuras 1-3, habiéndose encontrado pocas diferencias entre el grupo de especímenes infectados por *T. cruzi* y el grupo control. A pesar de no haberse encontrado diferencias entre ambos



## Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

grupos a nivel de Filo, los resultados son similares a los reportados por Lopez-Ordoñez y colaboradores (2018), siendo los Filos Firmicutes, Actinobacteria y Proteobacteria los más abundantes en nuestro estudio y en estudio mencionado. Otros estudios han evaluado diferentes especies de triatomíneos. Tal es el caso de las especies *T. pseudomaculata* y *T. brasiliensis*, de las cuales la microbiota intestinal se compone principalmente de bacterias pertenecientes a los filios Proteobacteria y Actinobacteria, resultado similar al presentado en nuestro estudio (Gumiel et al., 2015). De manera interesante, la familia Pseudomonaceae y el género *Pseudomonas* se presentaron como una de las familias y géneros más abundantes en el grupo de *T. dimidiata* infectadas. Resultado que es similar al presentado en el estudio de Polonio y colaboradores (2021) en el que se reportó que en especímenes infectados se encontró una mayor abundancia de bacterias de la familia Pseudomonadaceae. Así mismo, al igual que en nuestro estudio, la familia Staphylococcaceae y el género *Staphylococcus* fueron de los más abundantes en el estudio de Lopez-Ordoñez y colaboradores (2018). No obstante, en dicho estudio también se obtuvo una mayor abundancia de los géneros *Brevibacterium* y *Delftia*, los cuales no se han presentado como los más abundantes en nuestro estudio. La familia Staphylococcaceae ha sido reportada con una mayor abundancia relativa en grupos controles (Polonio et al., 2021), por lo que no queda claro si la abundancia de dicha familia se ve afectada por la infección de *T. cruzi*. Finalmente, un estudio previo realizado en Brasil evaluó las regiones V6–V8 del gen 16s rDNA y obtuvo una baja diversidad en la microbiota intestinal de *T. dimidiata*, habiendo poco menos de veinte especies predominantes, siendo el género *Arsenophonus* el más predominante en *T. dimidiata* (Gumiel et al., 2015). De manera interesante, el género *Arsenophonus* no fue identificado en nuestro estudio, siendo los géneros *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Enterococcus* y *Acinetobacter* los más abundantes en la microbiota intestinal de *T. dimidiata*.

Respecto a otras especies de triatomíneos, en el estudio de Gumiel y colaboradores (2015) se ha reportado que el género *Serratia* fue el más abundante en la microbiota de las especies *T. pseudomaculata* y *T. brasiliensis*, mientras que especies bacterianas como *S. marcescens*,



## Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

*Dietzia sp.*, *Gordonia terrae*, *Corynebacterium stationis* y *Corynebacterium glutamicum* también fueron encontradas (Gumiel et al., 2015). De ellas, es interesante la presencia de *Corynebacterium stationis* y *Corynebacterium glutamicum* pues *Corynebacterium* fue uno de los géneros más abundantes reportados en el grupo control de nuestro estudio. De tal manera, destacan los géneros *Staphylococcus* y *Corynebacterium*. Un estudio previo ha identificado a especies como *S. saprophyticus*, *M. luteus* y *B. megaterium* como potenciales especies para aplicaciones de paratransgénesis destinadas al control del vector (Lopez-Ordenez et al., 2018). A pesar de que el género *Staphylococcus* fue identificado como un taxón importante en nuestro estudio, no fue posible identificarlo a nivel de especie, por lo que se recomienda que en futuros estudios se pueda realizar una asignación taxonómica de las especies del género *Staphylococcus* presentes en la microbiota de *T. dimidiata*.

En nuestro estudio no se encontró una diferencia significativa entre la diversidad de la microbiota presente en *T. dimidiata* infectadas y no infectadas por *T. cruzi* (figuras 4-7). No obstante, dicho resultado no es congruente con lo reportado en estudios previos. Ejemplo de ello son estudios que reportan diferencias significativas de diversidad bacteriana en los especímenes infectados con los no infectadas y también han reportado un aumento significativo en la diversidad bacteriana en los especímenes infectados (Gumiel et al., 2015; Orantes et al., 2018). Así mismo, en otras especies de triatomíneos se han encontrado diferencias en la diversidad beta de la microbiota presente en especímenes infectados y no infectados. Un estudio concluyó que en especímenes de *T. infestans*, positivos a la infección por *T. cruzi*, géneros como *Nesterenkonia*, *Alkalibacterium*, *Peptoniphilus* y *Marinilactibacillus* presentaron un aumento en la abundancia relativa; mientras que géneros como *Bosea*, *Mesorhizobium*, *Dietzia* y *Cupriavidus* presentaron una menor abundancia relativa (Waltmann et al., 2019). Otro estudio evaluó la diversidad de la microbiota de *T. sanguisuga* concluyendo que la composición de la microbiota varía conforme al estado de infección por *T. cruzi* (Dumonteil et al., 2020). Resultados que no son consistentes con los presentados en nuestro estudio.

## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

Por otro lado, estudios previos han evaluado el estadio de *T. dimidiata* encontrando que especies de las familias Mycobacteriaceae, Salinisphaeraceae, Methylobacteriaceae y Nocardiospiceae se encontraron únicamente en ninfas de *T. dimidiata*, mientras que especies de las familias Pseudonocardiaceae, Streptomycetaceae y Sphingomonadaceae fueron más abundantes en ninfas que en adultos (Murillo-Solano et al., 2021). En nuestro estudio no ha sido posible realizar una comparación entre estadios de *T. dimidiata* por el bajo número de especímenes en estados de ninfas (tabla 1). Sería valioso que estudios futuros realizados en Guatemala evalúen si la microbiota varía en función del estadio del vector. Esto último es importante debido a que existen estudios que, al evaluar la microbiota de *T. dimidiata* en diferentes estadios de su ciclo de vida, han podido identificar bacterias asociadas al desarrollo ontogénico. Dichos estudios sugieren que al interferir, por medio de paratransgénesis, en el desarrollo de la microbiota asociada al desarrollo ontogénico del hospedero se podría conseguir una estrategia para el control del vector (Polonio et al., 2021).

El valor de  $p$  de 0.099 que fue obtenido al comparar entre *T. dimidiata* infectadas y no infectadas, tiende a la significancia, por lo que es posible que un esfuerzo de muestreo mayor podría resultar en significancia estadística al momento de diferenciar ambas microbiotas. De tal manera, se recomienda un aumento en el número de muestras para futuros estudios en Guatemala.

Tal como se presenta en la tabla 4, el análisis de perMANOVA indica una diferencia significativa entre la microbiota de los especímenes de *T. dimidiata* a partir de la localidad de origen de los mismos ( $p = 0.003$ ). En la región son pocos los estudios que han evaluado la variación de la microbiota de *T. dimidiata* proveniente de diferentes localidades. El estudio de Orantes y colaboradores (2018) concluyó que la microbiota de *T. dimidiata* se encontraba estructuradas en base a la localidad, identificándose grupos provenientes Jutiapa, Chiquimula

## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

y Santa Ana. Dicho resultado es similar al que se presenta en nuestro estudio a partir del dendograma y el gráfico de NMDS basados en distancias de Bray-Curtis (figuras 12-13) en los que se puede observar una diferencia de la microbiota entre las localidades de Aldea La Brea y Aldea El Ciprés. A partir de nuestro estudio se ha observado dicha diferencia entre la microbiota de especímenes provenientes de diferentes localidades, no obstante es importante mencionar que nuestro estudio cuenta con un número limitado de especímenes y únicamente considera dos localidades. Sería interesante que futuros estudios en el país realicen proyectos de investigación en los que se realicen muestras en un mayor número de localidades con el objetivo de representar de mejor manera la región.

Mediante el análisis diferencial de expresión se ha podido identificar biomarcadores de la microbiota en las localidades estudiadas (figura 14). De ellos, el género *Corynebacterium* es de los más interesantes de analizar pues este es un género que se encontró con mayor abundancia en el grupo control y es reportado como un género de bacterias productoras de antibióticos (Gumiel et al., 2015). Así mismo, el género *Corynebacterium* ha sido utilizado en proyectos de paratransgénesis para el control de la enfermedad de Chagas. En dichos proyectos bacterias del género son utilizadas como simbiontes genéticamente modificados de *Rhodnius prolixus* y *T. infestans*, éstas producen anticuerpos contra *T. cruzi* y de esa manera lo erradican del organismo (Durvasula et al., 2008; Hurwitz, Fieck & Durvasula, 2012; Ratcliffe et al., 2022). De tal manera, el género *Corynebacterium*, junto al género *Staphylococcus*, se presentan como taxones con potencial paratransgénico en Guatemala, esto con la finalidad de controlar la enfermedad de Chagas en el país.

## Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

### 13 Conclusiones

**13.1** La diversidad de la microbiota intestinal de los especímenes de *T. dimidiata* domésticos e infectadas con *T. cruzi* ha sido similar a la de aquellos especímenes no infectados con *T. cruzi*.

**13.2** La microbiota bacteriana intestinal de *T. dimidiata* domésticas infectadas y no infectadas con *T. cruzi* provenientes de Guatemala se compuso principalmente por bacterias de los filos Proteobacteria, Firmicutes y Actinobacteriota. En el grupo de *T. dimidiata* infectadas por *T. cruzi* las familias más abundantes fueron Pseudomonadaceae, Staphylococcaceae, Enterococcaceae y Enterobacteriaceae; y los géneros más abundantes fueron *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Enterococcus*. En el grupo control las familias más abundantes fueron Rhodocyclaceae, Staphylococcaceae y Comamonadaceae; y los géneros abundantes fueron *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Enterococcus* y *Acinetobacter*.

**13.3** No se han podido identificar biomarcadores microbianos de *T. dimidiata* domésticas infectadas y no infectadas con *T. cruzi*. No obstante, el análisis en función de localidad de origen indica que en Aldea El Ciprés taxones como *Corynebacterium*, *Sphingomonas* y *Bradyrhizobium* representan biomarcadores de la localidad. Respecto a Aldea La Brea los taxones identificados como biomarcadores son *Chryseobacterium*, *Rheinheimera*, *Pseudoxanthomonas*, *Pseudomonas* y *Dechloromonas*.

**13.4** En el presente estudio el género *Staphylococcus* presente en la microbiota intestinal de *T. dimidiata* domésticas infectadas con *T. cruzi* ha sido identificado como un taxón con potencial paratransgénico.

**13.5** Se han encontrado diferencias en la diversidad y composición de la microbiota intestinal de los especímenes de *T. dimidiata* domésticos en función de la localidad de origen.

**13.6** Los géneros *Corynebacterium* y *Staphylococcus* presentes en la microbiota intestinal de *T. dimidiata* domésticas infectadas con *T. cruzi* se presentan como taxones con potencial paratransgénico.



## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

### **14 Recomendaciones**

- 14.1** Se recomienda que en futuros estudios se pueda realizar una asignación taxonómica a nivel de especie de la microbiota de *T. dimidiata*.
- 14.2** Se recomienda aumentar el número de muestras para futuros estudios en Guatemala.
- 14.3** Se recomienda realizar otros estudios acerca de la microbiota bacteriana intestinal de *T. dimidiata* domésticas infectadas y no infectadas con *T. cruzi* en los que se evalúen las localidades de origen y el estadio de los especímenes.
- 14.4** Realizar estudios de paratransgénesis utilizando a los géneros *Corynebacterium* y *Staphylococcus* con el objetivo de control de la enfermedad de Chagas en el país.

### **15 Referencias**

- Acevedo, F., Godoy, E., & Schofield, C. J. (2000). Comparison of intervention strategies for control of *Triatoma dimidiata* in Nicaragua. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95, 867-871.
- Adegoke, A., Kumar, D., Bobo, C., Rashid, M. I., Durrani, A. Z., Sajid, M. S., & Karim, S. (2020). Tick-borne pathogens shape the native microbiome within tick vectors. *Microorganisms*, 8(9), 1299. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091299>
- Bern, C. (2015). Chagas' disease. *New England Journal of Medicine*, 373(5), 456-466. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1410150>
- Bern, C., Kjos, S., Yabsley, M. J., & Montgomery, S. P. (2011). *Trypanosoma cruzi* and Chagas' disease in the United States. *Clinical microbiology reviews*, 24(4), 655-681. <https://doi.org/10.1128/CMR.00005-11>
- Beard, C. B., Cordon-Rosales, C., & Durvasula, R. V. (2002). Bacterial symbionts of the triatominae and their potential use in control of Chagas disease transmission. *Annual*



## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

- review of entomology, 47(1), 123-141.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.ento.47.091201.145144>
- Bustamante, D. M., De Urioste-Stone, S. M., Juárez, J. G., & Pennington, P. M. (2014). Ecological, social and biological risk factors for continued *Trypanosoma cruzi* transmission by *Triatoma dimidiata* in Guatemala. *PLoS One*, 9(8), e104599.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104599>
- Calderón, C. I., Dorn, P. L., Melgar, S., Chávez, J. J., Rodas, A., Rosales, R., & Monroy, C. M. (2004). A preliminary assessment of genetic differentiation of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) in Guatemala by random amplification of polymorphic DNA-polymerase chain reaction. *Journal of Medical Entomology*, 41(5), 882-887.  
<https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.5.882>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, 13(7), 581-583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Cansado-Utrilla, C., Zhao, S. Y., McCall, P. J., Coon, K. L., & Hughes, G. L. (2021). The microbiome and mosquito vectorial capacity: rich potential for discovery and translation. *Microbiome*, 9(1), 111. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01073-2>
- Cardoso, M. S., Reis-Cunha, J. L., & Bartholomeu, D. C. (2016). Evasion of the immune response by *Trypanosoma cruzi* during acute infection. *Frontiers in immunology*, 6, 659. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00659>
- Castro-Arroyave, D., Monroy, M. C., & Irurita, M. I. (2020). Integrated vector control of Chagas disease in Guatemala: a case of social innovation in health. *Infectious diseases of poverty*, 9(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s40249-020-00639-w>
- Coura, J. R. (2014). The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions-A comprehensive review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110, 277-282. <https://doi.org/10.1590/0074-0276140362>



## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

- De Souza, W., De Carvalho, T. M. U., & Barrias, E. S. (2010). Review on Trypanosoma cruzi: host cell interaction. International journal of cell biology, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/295394>
- De Oliveira, A. B. B., Alevi, K. C. C., Imperador, C. H. L., Madeira, F. F., & de Azeredo-Oliveira, M. T. V. (2018). Parasite–vector interaction of chagas disease: a mini-review. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 98(3), 653. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0657>
- Dujardin, J. P., Schofield, C. J., Panzera, F., & Académie royale des sciences d'outre-mer (Belgique). (2000). Les vecteurs de la maladie de Chagas: recherches taxonomiques, biologiques et génétiques (Vol. 24). Académie royale des sciences d'outre-mer.
- Dumonteil, E., & Gourbiere, S. (2004). Predicting Triatoma dimidiata abundance and infection rate: a risk map for natural transmission of Chagas disease in the Yucatan peninsula of Mexico. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 70(5), 514-519.
- Dumonteil, E., Pronovost, H., Bierman, E. F., Sanford, A., Majeau, A., Moore, R., & Herrera, C. (2020). Interactions among Triatoma sanguisuga blood feeding sources, gut microbiota and Trypanosoma cruzi diversity in southern Louisiana. Molecular ecology, 29(19), 3747-3761. <https://doi.org/10.1111/mec.15582>
- Durvasula, R. V., Gumbs, A., Panackal, A., Kruglov, O., Aksoy, S., Merrifield, R. B., ... & Beard, C. B. (1997). Prevention of insect-borne disease: an approach using transgenic symbiotic bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences, 94(7), 3274-3278. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.7.3274>
- Durvasula, R. V., Sundaram, R. K., Kirsch, P., Hurwitz, I., Crawford, C. V., Dotson, E., & Beard, C. B. (2008). Genetic transformation of a Corynebacterial symbiont from the Chagas disease vector Triatoma infestans. Experimental parasitology, 119(1), 94-98. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.12.020>



## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

- Fernández, G. C., Juárez, M. P., Monroy, M. C., Menes, M., Bustamante, D. M., & Mijailovsky, S. (2005). Intraspecific variability in *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) populations from Guatemala based on chemical and morphometric analyses. *Journal of medical entomology*, 42(1), 29-35.  
<https://doi.org/10.1093/jmedent/42.1.29>
- Flores-Ferrer, A., Waleckx, E., Rascalou, G., Dumonteil, E., & Gourbière, S. (2019). *Trypanosoma cruzi* transmission dynamics in a synanthropic and domesticated host community. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(12), e0007902.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007902>
- Gaio, A. D. O., Gusmão, D. S., Santos, A. V., Berbert-Molina, M. A., Pimenta, P. F., & Lemos, F. J. (2011). Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)(L.). *Parasites & vectors*, 4(1), 1-10.  
<https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-105>
- Gumiel, M., Da Mota, F. F., Rizzo, V. D. S., Sarquis, O., Castro, D. P. D., Lima, M. M., ... & Azambuja, P. (2015). Characterization of the microbiota in the guts of *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* infected by *Trypanosoma cruzi* in natural conditions using culture independent methods. *Parasites & vectors*, 8(1), 1-17.  
<https://doi.org/10.1186/s13071-015-0836-z>
- Gürtler, R. E., & Yadon, Z. E. (2015). Eco-bio-social research on community-based approaches for Chagas disease vector control in Latin America. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 109(2), 91-98.  
<https://doi.org/10.1093/trstmh/tru203>
- Hashimoto, K., & Schofield, C. J. (2012). Elimination of *Rhodnius prolixus* in central America. *Parasites & vectors*, 5, 1-10. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-45>
- Hashimoto, K., Álvarez, H., Nakagawa, J., Juárez, J., Monroy, C., Córdón-Rosales, C., & Gil, E. (2012). Vector control intervention towards interruption of transmission of Chagas disease by *Rhodnius prolixus*, main vector in Guatemala. *Memorias do*





## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

- Instituto Oswaldo Cruz, 107, 877-887.  
<https://doi.org/10.1590/s0074-02762012000700007>
- Hernández, R., Cevallos, A. M., Nepomuceno-Mejía, T., & López-Villaseñor, I. (2012). Stationary phase in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes as a preadaptive stage for metacyclogenesis. *Parasitology research*, 111, 509-514.  
<https://doi.org/10.1007/s00436-012-2974-y>
- Hillesland, H., Read, A., Subhadra, B., Hurwitz, I., McKelvey, R., Ghosh, K., ... & Durvasula, R. (2008). Identification of aerobic gut bacteria from the kala azar vector, *Phlebotomus argentipes*: a platform for potential paratransgenic manipulation of sand flies. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 79(6), 881-886.  
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2008.79.881>
- Huang, W., Vega-Rodriguez, J., Kizito, C., Cha, S. J., & Jacobs-Lorena, M. (2022). Combining transgenesis with paratransgenesis to fight malaria. *elife*, 11, e77584.  
<https://doi.org/10.1101/2022.03.02.482642>
- Hurwitz, I., Fieck, A., & Durvasula, R. (2012). Antimicrobial peptide delivery strategies: use of recombinant antimicrobial peptides in paratransgenic control systems. *Current Drug Targets*, 13(9), 1173-1180. <https://doi.org/10.2174/138945012802002366>
- Hurwitz, I., Fieck, A., Read, A., Hillesland, H., Klein, N., Kang, A., & Durvasula, R. (2011). Paratransgenic control of vector borne diseases. *International Journal of Biological Sciences*, 7(9), 1334. <https://doi.org/10.7150/ijbs.7.1334>
- Jansen, A. M., Xavier, S. C. D. C., & Roque, A. L. R. (2020). Landmarks of the knowledge and *Trypanosoma cruzi* biology in the wild environment. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00010>
- Lidani, K. C. F., Andrade, F. A., Bavia, L., Damasceno, F. S., Beltrame, M. H., Messias-Reason, I. J., & Sandri, T. L. (2019). Chagas disease: from discovery to a



## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

- worldwide health problem. *Frontiers in public health*, 7, 166.  
<https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00166>
- Lopez-Ordenez, T., Flores-López, C. A., Montejo-Lopez, R., Cruz-Hernandez, A., & Conners, E. E. (2018). Cultivable bacterial diversity in the gut of the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata*: identification of possible bacterial candidates for a paratransgenesis approach. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 5, 174.  
<https://doi.org/10.3389/fevo.2017.00174>
- Malik, L. H., Singh, G. D., & Amsterdam, E. A. (2015). The epidemiology, clinical manifestations, and management of chagas heart disease. *Clinical cardiology*, 38(9), 565-569. <https://doi.org/10.1002/clc.22421>
- Mann, A. E., Mitchell, E. A., Zhang, Y., Curtis-Robles, R., Thapa, S., Hamer, S. A., & Allen, M. S. (2020). Comparison of the bacterial gut microbiome of North American *Triatoma* spp. with and without *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in microbiology*, 11, 364. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00364>
- Manne, J., Nakagawa, J., Yamagata, Y., Goehler, A., Brownstein, J. S., & Castro, M. C. (2012). Triatomine infestation in Guatemala: spatial assessment after two rounds of vector control. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 86(3), 446.  
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0052>
- Martins, A. V., Gomes, A. P., Gomes de Mendonça, E., Lopes Rangel Fietto, J., Santana, L. A., de Almeida Oliveira, M. G., ... & Siqueira-Batista, R. (2012). Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. *Infectio*, 16(1), 45-58.
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PloS one*, 8(4), e61217.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>



## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

- Mills, R. M. (2020). Chagas disease: epidemiology and barriers to treatment. *The American journal of medicine*, 133(11), 1262-1265. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2020.05.022>
- Molina, I., Salvador, F., & Sanchez-Montalva, A. (2016). Update Chagas disease. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34(2), 132-138. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.12.008>
- Möller Molina, D. M. (2016). Dinámica de alimentación de *Triatoma dimidiata*, vector de la enfermedad de Chagas, en una región de Guatemala con infestación persistente (Comapa, Jutiapa) (Doctoral dissertation, Universidad del Valle de Guatemala).
- Monroy, C., Castro, X., Bustamante, D. M., Pineda, S. S., Rodas, A., Moguel, B., ... & Quiñonez, J. (2012). An ecosystem approach for the prevention of Chagas disease in rural Guatemala. *Ecohealth research in practice: innovative applications of an ecosystem approach to health*, 153-162.
- Monroy, C., Rodas, A., Mejía, M., Rosales, R., & Tabaru, Y. (2003). Epidemiology of Chagas disease in Guatemala: infection rate of *Triatoma dimidiata*, *Triatoma nitida* and *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) with *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98, 305-310. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762003000300003>
- Monroy, M. C., Penados, D., Pineda, J., Ruiz, E. L., Agreda, E. O., Alcantara, B., ... & Chuit, R. (2022). A multidisciplinary, collaborative, inter-agency and comprehensive approach for the control of Chagas Disease as a public health problem in Guatemala. *Acta Tropica*, 225, 106157. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106157>
- Montoya-Porras, L. M., Omar, T. C., Alzate, J. F., Moreno-Herrera, C. X., & Cadavid-Restrepo, G. E. (2018). 16S rRNA gene amplicon sequencing reveals dominance of Actinobacteria in *Rhodnius pallescens* compared to *Triatoma maculata* midgut microbiota in natural populations of vector insects from Colombia. *Acta Tropica*, 178, 327-332. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.11.004>

## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

- Murillo-Solano, C., López-Domínguez, J., Gongora, R., Rojas-Guloso, A., Usme-Ciro, J., Perdomo-Balaguera, E., ... & Dumonteil, E. (2021). Diversity and interactions among triatomine bugs, their blood feeding sources, gut microbiota and *Trypanosoma cruzi* in the Sierra Nevada de Santa Marta in Colombia. *Scientific Reports*, 11(1), 12306. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91783-2>
- Quirós-Gómez, Ó., Jaramillo, N., Angulo, V. M., & Parra-Henao, G. (2017). *Triatoma dimidiata* in Colombia: Distribution, ecology and epidemiological importance. *Biomédica*, 37(2), 274-285. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i2.2893>
- Nakagawa, J., Hashimoto, K., Cordon-Rosales, C., Abraham Juarez, J., Trampe, R., & Marroquin Marroquin, L. (2003). The impact of vector control on *Triatoma dimidiata* in the Guatemalan department of Jutiapa. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 97(3), 288-297. <https://doi.org/10.1179/000349803235001895>
- Orantes, L. C., Monroy, C., Dorn, P. L., Stevens, L., Rizzo, D. M., Morrissey, L., ... & Helms Cahan, S. (2018). Uncovering vector, parasite, blood meal and microbiome patterns from mixed-DNA specimens of the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata*. *PLoS neglected tropical diseases*, 12(10), e0006730. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006730>
- Pech-May, A., Mazariegos-Hidalgo, C. J., Izeta-Alberdi, A., López-Cancino, S. A., Tun-Ku, E., De la Cruz-Félix, K., ... & Ramsey, J. M. (2019). Genetic variation and phylogeography of the *Triatoma dimidiata* complex evidence a potential center of origin and recent divergence of haplogroups having differential *Trypanosoma cruzi* and DTU infections. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(1), e0007044. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007044>
- Pennington, P. M., Rivera, E. P., De Urioste-Stone, S. M., Aguilar, T., & Juárez, J. G. (2021). A successful community-based pilot Programme to control insect vectors of Chagas disease in rural Guatemala. In *Area-Wide Integrated Pest Management* (pp. 709-727). CRC Press.



## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

- Pérez-Molina, J. A., & Molina, I. (2018). Chagas disease. *The Lancet*, 391(10115), 82-94. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)31612-4)
- Pidiyar, V. J., Jangid, K., Patole, M. S., & Shouche, Y. S. (2004). Studies on cultured and uncultured microbiota of wild *Culex quinquefasciatus* mosquito midgut based on 16s ribosomal RNA gene analysis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 70(6), 597-603.
- Polonio, R., López-Domínguez, J., Herrera, C., & Dumonteil, E. (2021). Molecular ecology of *Triatoma dimidiata* in southern Belize reveals risk for human infection and the local differentiation of *Trypanosoma cruzi* parasites. *International Journal of Infectious Diseases*, 108, 320-329. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.05.083>
- Ratcliffe, N. A., Furtado Pacheco, J. P., Dyson, P., Castro, H. C., Gonzalez, M. S., Azambuja, P., & Mello, C. B. (2022). Overview of paratransgenesis as a strategy to control pathogen transmission by insect vectors. *Parasites & Vectors*, 15(1), 112. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-05132-3>
- Riehle, M. A., Moreira, C. K., Lampe, D., Lauzon, C., & Jacobs-Lorena, M. (2007). Using bacteria to express and display anti-*Plasmodium* molecules in the mosquito midgut. *International journal for parasitology*, 37(6), 595-603. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.12.002>
- Rossi, M. A., Ramos, S. G., & Bestetti, R. B. (2003). Chagas' heart disease: clinical-pathological correlation. *Front Biosci*, 8, e94-109. <https://doi.org/10.2741/948>
- Rosypal, A. C., Hill, R., Lewis, S., Barr, S. C., Valadas, S., Gennari, S. M., & Lindsay, D. S. (2011). Evaluation of a rapid immunochromatographic dipstick test for detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in dogs experimentally infected with isolates obtained from opossums (*Didelphis virginiana*), armadillos (*Dasypus novemcinctus*), and dogs (*Canis familiaris*) from the United States. *The Journal of parasitology*, 97(1), 140-143. <https://doi.org/10.1645/GE-2559.1>



## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

- Shikanai-Yasuda, M. A., & Carvalho, N. B. (2012). Oral transmission of Chagas disease. *Clinical Infectious Diseases*, 54(6), 845-852. <https://doi.org/10.1093/cid/cir956>
- Steverding, D. (2014). The history of Chagas disease. *Parasites & vectors*, 7(1), 1-8. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-317>
- Song, X., Wang, M., Dong, L., Zhu, H., & Wang, J. (2018). PGRP-LD mediates *A. stephensi* vector competency by regulating homeostasis of microbiota-induced peritrophic matrix synthesis. *PLoS pathogens*, 14(2), e1006899. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006899>
- Tabaru, Y., Monroy, C., Rodas, A., Mejia, M., & Rosales, R. (1999). The geographical distribution of vectors of Chagas' disease and populations at risk of infection in Guatemala. *Medical entomology and zoology*, 50(1), 9-17. [https://doi.org/10.7601/mez.50.9\\_1](https://doi.org/10.7601/mez.50.9_1)
- Torres-Montero, J., López-Monteon, A., Dumonteil, E., & Ramos-Ligonio, A. (2012). House infestation dynamics and feeding sources of *Triatoma dimidiata* in central Veracruz, Mexico. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 86(4), 677. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0746>
- Waleckx, E., Gourbière, S., & Dumonteil, E. (2015). Intrusive versus domiciliated triatomines and the challenge of adapting vector control practices against Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110, 324-338. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140409>
- Waltmann, A., Willcox, A. C., Balasubramanian, S., Borrini Mayori, K., Mendoza Guerrero, S., Salazar Sanchez, R. S., ... & Bowman, N. M. (2019). Hindgut microbiota in laboratory-reared and wild *Triatoma infestans*. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(5), e0007383. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007383>



## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

- WHO Expert Committee on the Control of Chagas Disease, & World Health Organization. (2002). Control of Chagas disease: Second report of the WHO Expert Committee (Vol. 2). World Health Organization
- Wickham, H. (2011). ggplot2. Wiley interdisciplinary reviews: computational statistics, 3(2), 180-185. <https://doi.org/10.1002/wics.147>
- World Health Organization. (2010). First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. In vinculación First WHO report on neglected tropical diseases: Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases (pp. 172-172)
- World Health Organization. (2015). Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. Weekly Epidemiological Record= Relevé épidémiologique hebdomadaire, 90(06), 33-44.70(6), 597–603
- Wijerathna, T., Gunathunga, S., & Gunathilaka, N. (2020). Recent developments and future directions in the paratransgenesis based control of Leishmania transmission. Biological Control, 145, 104260. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104>
- Wilke, A. B. B., & Marrelli, M. T. (2015). Paratransgenesis: a promising new strategy for mosquito vector control. Parasites & vectors, 8(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0959-2>
- Xu, S., Zhan, L., Tang, W., Wang, Q., Dai, Z., Zhou, L., Feng, T., Chen, M., Wu, T., Hu, E., & Yu, G. (2023). MicrobiotaProcess: A comprehensive R package for deep mining microbiome. Innovation (Cambridge (Mass.)), 4(2), 100388. <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2023.100388>
- Yang, L., Weiss, B. L., Williams, A. E., Aksoy, E., de Silva Orfano, A., Son, J. H., ... & Aksoy, S. (2021). Paratransgenic manipulation of a tsetse microRNA alters the physiological homeostasis of the fly's midgut environment. PLoS pathogens, 17(6), e1009475. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009475>

## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

Yilmaz, P., Parfrey, L. W., Yarza, P., Gerken, J., Pruesse, E., Quast, C., Schweer, T., Peplies, J., Ludwig, W., & Glöckner, F. O. (2014). The SILVA and "All-species Living Tree Project (LTP)" taxonomic frameworks. *Nucleic acids research*, 42(Database issue), D643–D648. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209>

Zingales, B. (2018). *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Tropica*, 184, 38-52. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017>

### **16 Apéndice**

### **17 Vinculación**

El presente proyecto de investigación contó de la vinculación con la Dirección de Área de Salud de Jutiapa y con el Centro de Geociencias (CGEO) de la Universidad Nacional Autónoma de México, campus Juriquilla. El CGEO proveyó de asesoría científica en el análisis bioinformático e interpretación de resultados.

### **18 Estrategia de difusión, divulgación y protección intelectual**

En la filiación debe de anotarse la Universidad de San Carlos de Guatemala. Caso contrario no se concederán nuevos financiamientos de ninguna índole.

NOTA: La difusión y divulgación, por cualquier medio, de los resultados de las investigaciones tiene que incluir los créditos a la Digi y unidad avaladora. En la publicación de un libro debe anotarse en la contraportada lo siguiente: “Este libro es producto del proyecto de investigación: Nombre del proyecto, avalado, aprobado y cofinanciado por el Fondo de Investigación de la Dirección General de Investigación, el nombre de la unidad avaladora de la Universidad de San Carlos de Guatemala, fecha, código y número de partida del proyecto de investigación”.



## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

En las publicaciones en medios escritos y revistas científicas debe anotarse lo siguiente: “Esta investigación: Nombre del proyecto, fue cofinanciada por el fondo de investigación de la Dirección General de Investigación Digi/Usac 2022, código y número de partida del proyecto de investigación”. Para los proyectos de investigación que gestionen el registro de un invento o patente, la Digi emitirá las disposiciones que deben aplicarse de conformidad con las leyes y/o políticas de propiedad intelectual que correspondan.

Los resultados obtenidos con el desarrollo del presente proyecto de investigación serán divulgados en diferentes medios. Primero, será presentado un informe final a la Dirección General de Investigación (DIGI). Así mismo, se participará en las conferencias y seminarios de divulgación de resultados organizados por la DIGI. Posteriormente, se escribirá un manuscrito para su publicación en una revista indexada (nacional o internacional), de preferencia una revista especializada en microbioma, entomología o ecología. Además, la investigación será presentada por medio de conferencia o presentación de póster en congresos, simposios, seminarios, entre otras actividades académicas y científicas.




### **19 Aporte de la propuesta de investigación a los Prioridades Nacionales de Desarrollo (PND) identificando su meta correspondiente**

La investigación aporta al cumplimiento de los objetivos de desarrollo sostenible en particular al objetivo de salud enfermedad, especialmente al grupo de zoonosis y enfermedades transmitidas por vectores como lo es la enfermedad de Chagas. Mediante esta investigación se ha caracterizado la microbiota intestinal de *T. dimidiata* infectadas con *T. cruzi* de Guatemala. Adicionalmente, se obtuvieron los perfiles taxonómicos bacterianos, se conoció la diversidad bacteriana de dicha población, se determinaron los biomarcadores bacterianos y las bacterias pertenecientes a su microbiota intestinal con potencial paratransgénico. La información generada permite conocer más acerca de la interacción patógeno huésped y sobre la ecología de la enfermedad de Chagas, dicho conocimiento podría contribuir en la toma de decisiones del control vectorial de *T. dimidiata*. También,

## Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

permite establecer una nueva línea de investigación científica en el país y las bases para la implementación de control de *T. dimidiata* mediante paratransgénesis con el fin de disminuir los casos de la enfermedad y la tasa de mortalidad de Chagas en Guatemala. Por medio de futuros proyectos de paratransgénesis se podrán utilizar microorganismos que poseen una relación con el vector *T. dimidiata*. Esto se logrará mediante un estudio que involucre la identificación del microorganismo, la selección de un gen de interés que pueda interferir con el ciclo de vida del vector, modificación genética del microorganismo en la que se introduce el gen de interés, el establecimiento del microorganismo en el vector y el monitoreo del vector con el objetivo de observar si su ciclo de vida se ve afectado garantizando, de esa manera, el control del mismo.

### 20 Orden de pago final (incluir únicamente al personal con contrato vigente al 31 de diciembre de 2023)

Nombres y apellidos	Categoría (investigador /auxiliar)	Registro de personal	Procede pago de mes (Sí / No)	Firma
Francisco Josué López Hun	Investigador	20220546	Sí	
César Camilo Carías Alvarado	Investigador	20210268	Sí	
Astrid Alejandra Morales Cabrera	Auxiliar de Investigación II	20210778	No	


*Nota: los contratos de investigadores finalizaron el día 30 de noviembre de 2023.*



## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

### **21 Declaración del Coordinador(a) del proyecto de investigación**

El Coordinador de proyecto de investigación con base en el *Reglamento para el desarrollo de los proyectos de investigación financiados por medio del Fondo de Investigación*, artículos 13 y 20, deja constancia que el personal contratado para el proyecto de investigación que coordina ha cumplido a satisfacción con la entrega de informes individuales por lo que es procedente hacer efectivo el pago correspondiente.



<p style="text-align: center;">Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares</p> <p><b>Nombre del coordinador del proyecto de investigación</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>Firma</b></p>
<p>Fecha: 29/02/2024</p>	



## **Informe final de proyecto de investigación. Año 2023**

### **21 Aval del Director(a) del instituto, centro o departamento de investigación o Coordinador de investigación del centro regional universitario**


De conformidad con el artículo 13 y 19 del *Reglamento para el desarrollo de los proyectos de investigación financiados por medio del Fondo de Investigación* otorgo el aval al presente informe mensual de las actividades realizadas en el proyecto (escriba el nombre del proyecto de investigación) en mi calidad de (indique: Director del instituto, centro o departamento de investigación o Coordinador de investigación del centro regional universitario), mismo que ha sido revisado y cumple su ejecución de acuerdo a lo planificado.


<p>Dra. María Eunice Enríquez Cottón Directora Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas</p> <p><b>Vo.Bo. Nombre y cargo de quien da el aval al informe</b></p>	  <p><b>Firma</b></p>
<p>Fecha: 29/02/2024</p>	



## Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

### 22 Visado de la Dirección General de Investigación

<p><b>Vo.Bo.</b> Dra. Hilda Elena Valencia de Abril Coordinadora Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud</p>	  <p><b>Firma</b></p>
<p>Fecha: 29/02/2024</p>	

<p><b>Vo.Bo.</b> Ing. Agr. Julio Rufino Salazar Coordinador General de Programas</p>	  <p><b>Firma</b></p>
<p>Fecha: 29/02/2024</p>	

/Digi2023