



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

DIGI-PUI-004

Informe final de proyecto de investigación

Universidad de San Carlos de Guatemala

Dirección General de Investigación

Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud

Caracterización de la microbiota intestinal del nuevo vector de la enfermedad de Chagas, *Triatoma huehuetenanguensis* infectadas con *Trypanosoma cruzi*

Unidad avaladora: Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas -IIQB-

4.8.63.5.74

Nombre del coordinador: Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares

Guatemala, 28 de febrero de 2024



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

Contraportada

Autoridades de la Dirección General de Investigación

Dra. Alice Burgos Paniagua

Directora General de Investigación

M.A. Sucelly Orozco de Morales

Coordinador(a) del Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud

DIGI/USAC

Autores

Dr. Sergio Melgar Valladares, 14584

Lic. Andrea Perez Morales, 20161154

Secr. María Fernanda Canel, 20240647

Br. Fredy Pereira, 20210468

Colaboradores (si aplica):

Lic. Antonieta Guadalupe Rodas Retana, LENAP USAC

MSc. Francisco Josué López Hun

Dra Barbara Moguel, UNAM



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

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 número: 4.8.63.5.74 en el Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud DIGI/USAC.

Los autores son responsables del contenido, de las condiciones éticas y legales de la investigación desarrollada.



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

Índice general

Resumen	1
Palabras clave	1
Abstract	1
Keywords	2
1. Introducción	2
2. Contexto de la investigación	5
3. Revisión de literatura	5
4. Planteamiento del problema	10
5. Objetivos	11
6. Hipótesis	12
7. Método	12
8. Aspectos éticos y legales	21
9. Resultados y discusión	21
9.1 Resultados	21
9.2 Discusión de resultados	41
10. Propiedad intelectual	45
11. Beneficiarios directos e indirectos	45
12. Estrategia de divulgación y difusión de los resultados.	46
13. Contribución a las Prioridades Nacionales de Desarrollo (PND)	47
14. Contribución al desarrollo de iniciativas de ley	48
15. Vinculación	48
16. Conclusiones	48
17. Recomendaciones	49
18. Referencias	50
19. Apéndice	58
20. Declaración del coordinador (a) del proyecto de investigación	58



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

Resumen

En Guatemala, en los departamentos de Petén y Huehuetenango ha sido descrito un nuevo vector triatomino para la enfermedad de Chagas, esta es *Triatoma huehuetenanguensis*. Actualmente no se tiene una estrategia específica de control para esta especie y aún no ha sido estudiado profundamente. El objetivo de este estudio fue caracterizar la microbiota intestinal de *T. huehuetenanguensis* domésticas infectadas con *T. cruzi* en Guatemala. Se procedió a realizar la secuenciación del gen completo 16s rRNA en muestras de triatominos de *T. huehuetenanguensis* y *T. dimidiata* provenientes del departamento de Huehuetenango, utilizando el software QIIME2 (versión QIIME2-202006). la distribución taxonómica que se calculó mediante los índices de diversidad alfa y beta, en donde se observó una diferencia significativa en los índices Chao1 y OTUs observados, con un valor de $p < 0.05$, lo cual indica que hubo una significancia en la cantidad de especies observadas en los grupos, más no en la diversidad como se demuestra a partir del índice de Shannon. También se identificaron los biomarcadores microbianos y la especie de bacteria con potencial paratransgénico mediante el análisis discriminante lineal, los cuales fueron el género *Enterobacter* y la especie *Akkermansia muciniphila*. Este estudio es de importancia vectorial ya que mediante un enfoque integral de control del vector se hace que se pueda evitar que siga su propagación de áreas selváticas a domésticas.

Palabras clave

1. Chagas	2. Microbiota	3. Vector	4. Enfermedad	5. Parásito
-----------	---------------	-----------	---------------	-------------

Abstract

In Guatemala, in the departments of Petén and Huehuetenango, a new triatomine vector for Chagas disease has been described; this is *Triatoma huehuetenanguensis*. Currently, there is no specific control strategy for this species and it has not yet been studied in depth. The



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

objective of this study was to characterize the intestinal microbiota of domestic *T. huehuetenanguensis* infected with *T. cruzi* in Guatemala. The complete 16s rRNA gene was sequenced in samples of *T. huehuetenanguensis* and *T. dimidiata* triatomines from the department of Huehuetenango, using the QIIME2 software (version QIIME2-202006). the taxonomic distribution that was calculated using the alpha and beta diversity indices, where a significant difference was observed in the Chao1 and OTUs indices observed, with a p value <0.05, which indicates that there was a significance in the number of species observed in the groups, but not in the diversity because there was no significant difference in the Shannon index. The microbial biomarkers and the species of bacteria with paratransgenic potential were also identified through linear discriminant analysis, which were the *Enterobacter* genus and the *Akkermansia muciniphila* species. This study is of vectorial importance since through a comprehensive approach to vector control, it is possible to prevent its further spread from jungle to domestic areas.

Keywords

1. Chagas	2. Microbiota	3. Vector	4. Disease	5. Parasite
-----------	---------------	-----------	------------	-------------

1. Introducción

La enfermedad de Chagas es causada por el parásito protozoo y hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, esta es una enfermedad endémica de Latinoamérica y actualmente, está afectando la salud pública, pese a ser considerada una de las enfermedades más olvidadas (Bonney, 2014), según la CDC de Estados Unidos, hay una gran cantidad de personas que se encuentran infectadas en México, Centroamérica y Sudamérica (CDC, 2021) y el costo aproximado anual para persona con con el estado crónico de la enfermedad es de \$4,059.00 en Latinoamérica (Lee, et. al., 2013). En las últimas décadas, el perfil epidemiológico de esta enfermedad resulta ser dinámico y constante, debido a movimientos migratorios humanos, producto de la urbanización (Perreira, et.al., 2013; Gascon, et. al., 2010; Castillo, 2017). En



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

la actualidad hay preocupación con respecto a la carga económica, ya que se reportó una estimación de los costos globales de la enfermedad ascienden a \$7.19 billones por año.

Triatoma dimidiata forma parte de un complejo genético de especies que incluye por ahora tres linajes que evolucionaron independientemente (Justi et al., 2018). Dentro de este, hay una nueva especie reportada para Guatemala y el sur de México, *Triatoma huehuetenanguensis*, una especie nativa de la región occidente y norte de Guatemala que ha sido encontrada dentro y fuera de los domicilios, intradomiciliar y peridomiciliar respectivamente (Lima-Cordón et al., 2019) y además también se puede encontrar en ambientes selváticos (Flores-Ferrer et al., 2019).

En Guatemala 10 de los 22 departamentos del país han sido clasificados como regiones endémicas para Chagas debido a la prevalencia de la enfermedad, entre estos se encuentran Jutiapa y Huehuetenango (Chávez, 2015). En el Salvador, la región suroeste, (Santa Ana, Sonsonate y Ahuachapán), es considerada como una región hiperendémica o “hotspot” por la alta y constante incidencia de la enfermedad, ya que la incidencia de casos agudos supera los registros presentados en otras regiones de Latinoamérica (Sasagawa, et al., 2014).

Comúnmente, se ha utilizado la aplicación de insecticidas para menguar a los vectores de la enfermedad Chagas, usando una gran cantidad de recursos económicos en ello (Waleckx et al., 2015). Sin embargo, este método representa gran desafío para los vectores nativos, pues suelen ser resistentes a los insecticidas, ya que logran re-infestar nuevamente las viviendas en pocos meses (Reyes et al., 2007). Además del alto costo de los insecticidas, requiere personal humano capacitado para poder aplicarlo y también el tiempo necesario para llevarlo a cabo dentro de los programas que organizan las autoridades de salud pública (Gürtler & Yadon, 2015). Actualmente han surgido nuevas técnicas como la paratransgénesis, esta se basa en usar simbiontes bacterianos que se puedan involucrar interfiriendo en el progreso de la enfermedad dentro del insecto (Wilke & Marrelli, 2015).

Sin embargo, existe un vacío de información de la microbiota presente en *T. huehuetenanguensis*, debido a que este vector ha sido catalogado como una nueva especie



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

(Lima-Cordón et al., 2019), es por ello que el objetivo del estudio fue la caracterización de la microbiota bacteriana intestinal de *Triatoma huehuetenanguensis* domésticas infectadas y no infectadas con *T. cruzi*. Esto se realizó mediante secuenciación del gen completo 16s rRNA de triatominos de las especies *T. huehuetenanguensis* y *T. dimidiata* provenientes del departamento de Huehuetenango, utilizando el software QIIME2 (versión QIIME2-202006). Se identificó la diversidad relativa de las especies que conforman la microbiota en ambas especies, la distribución taxonómica que se calculó mediante los índices de diversidad alfa y beta, en donde se observó una diferencia significativa en los índices Chao1 y OTUs observados, con un valor de $p < 0.05$, lo cual indica que hubo una significancia en la cantidad de especies observadas en los grupos, más no en la diversidad en base al índice de Shannon. También se identificaron los biomarcadores microbianos y la especie de bacteria con potencial paratransgénico mediante el análisis discriminante lineal, los cuales fueron el género *Enterobacter* y la especie *Akkermansia muciniphila*. Este estudio es de importancia vectorial ya que mediante un enfoque integral de control del vector para evitar que siga su propagación de áreas selváticas a domésticas, ya que se están creando nuevas estrategias de control vectorial, en la que las poblaciones de estos triatominos puedan tener menor carga parasitaria por *T. cruzi*, y de esa manera, pueda bajar la transmisión de la enfermedad.

2. Contexto de la investigación

El proyecto se realizó a partir del mes de febrero y terminó en el mes de diciembre de 2024. El muestreo de los especímenes de *T. huehuetenanguensis* se realizó en los municipios ubicados en el departamento de Huehuetenango. El análisis de las muestras se realizó en el Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología (LENAP) perteneciente a la Escuela de Biología, ubicado en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. El LENAP cuenta con un área destinada para el trabajo en biología molecular en la que se cuenta con toda la infraestructura y los equipos que se necesitan para realizar los procedimientos y técnicas de laboratorio descritas en el presente proyecto de investigación.



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

La población que se benefició directamente fue en primer lugar, el sector académico, ya que los resultados de la diversidad relativa bacteriana de la microbiota del *T. huehuetenanguensis* y *T. cruzi*, conforma una primera línea de partida importante para comprender la paratransgénesis del vector, y esto puede ser de ayuda para el sector académico y científico en la comparación de resultados de microbiota intestinal de estas chinches, tanto infectadas como no infectadas. Por otro lado, la población en áreas endémicas del vector, como Huehuetenango, Petén, y sureste de México, también pueden verse beneficiadas, ya que este conocimiento servirá como referencia para futuros ensayos de paratransgénesis que pueden colaborar en las estrategias del control vectorial. La población beneficiada indirectamente fueron las autoridades del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, ya que estos resultados y los potenciales ensayos paratransgénicos que pueden llevarse a cabo, podrían ser de utilidad para manejar nuevas estrategias para el control de vectores, en la que las poblaciones de estas chinches puedan tener menor carga parasitaria por *T. cruzi*.

3. Revisión de literatura

Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas ocasionada por el parásito flagelado *T. cruzi*, esta es una enfermedad endémica de Latinoamérica y actualmente, está afectando la salud pública (Guhl, 2009; OMS, 2020), donde se reportan un aproximado de 8 millones de personas que portan esta enfermedad (CDC, 2021). Además, está clasificada dentro de las trece enfermedades desatendidas en el mundo por la Organización Mundial de la Salud -OMS- (OMS, 2020; Rassi, Rassi & Marin-Neto, 2010). También se presentan factores de riesgos epidemiológicos asociados a condiciones de vivienda precarias, esto se observa principalmente en los lugares que son rurales a lo largo de la región latinoamericana para esta enfermedad (OMS, 2020; Hotez, et. al., 2014).



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

Las dos fases de la enfermedad de Chagas son la aguda y la crónica. La fase aguda tiene una duración de seis a ocho semanas y puede ser asintomática, los síntomas aparecen una o dos semanas posteriores a la infección por el parásito, tales como: fiebre, dolor muscular, taquicardia, esplenomegalia, signo de Romaña, anorexia, vómitos y diarrea (OMS, 2020). La fase crónica se expresa cuando la parasitemia comienza a bajar y entonces, el paciente comienza una latencia clínica, también se le llama forma indeterminada la cual puede durar en la persona infectada, de 10-30 años y afecta principalmente el corazón, esófago y colon (Prata, 2001).

Los pacientes son tratados con las drogas antiparasitarias: benznidazol y Nifurtimox, siendo el benznidazol el que posee el mejor perfil de seguridad y eficacia, por lo tanto, es usado en primera instancia (Rassi, Rassi & Marin-Neto, 2010). Actualmente hay desafíos para el descubrimiento de nuevos fármacos y uno de estos desafíos está relacionado al grupo diverso de cepas de *T. cruzi* y su diversidad genética, pero se cree que en un futuro utilizando inteligencia artificial se pueda llegar al descubrimiento de mejores tratamientos para dicha enfermedad (Villalta & Girish, 2019).

Trypanosoma cruzi

T. cruzi es caracterizado como un parásito protozoario y microorganismo causante de la enfermedad de Chagas (Schofield, 1994). En la región latinoamericana, la principal forma de transmisión de este organismos es por contacto con material fecal u orina infectada proveniente de los triatominos que se alimentan por sangre (OMS, 2020).

El ciclo de vida de *T. cruzi* es complejo, requiere de dos intermediarios para poder desarrollarse: triatominos (vectores), y aves y/o mamíferos (huéspedes) (Rassi, Rassi & Marin-Neto, 2010; Lent & Wygodzinsky 1979).

La mayoría de las infecciones en el humano se producen en las zonas rurales, en donde el parásito es transmitido por el material fecal del triatomino infectado, ya que estos defecan rápidamente luego de haber ingerido sangre del vertebrado (Lent & Wygodzinsky 1979), *T.*



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

cruzi ingresa a través de heridas en los tejidos de los vertebrados, de la mucosa de la boca, y especialmente en humanos por los ojos (Lent & Wygodzinsky 1979; OMS, 2020).

Triatoma huehuetenanguensis

Se han reportado tres líneas de evidencia (morfológica, genética nuclear y genética mitocondrial) que respaldan y describen a *T. huehuetenanguensis*, la nueva especie cercanamente emparentada de *T. dimidiata*. *T. huehuetenanguensis* se caracteriza por una pilosidad amarilla corta en todo el cuerpo, a excepción de los genitales, las conexiones entre cada segmento del labio son muy visibles y de color amarillo claro, al igual que en el vientre (Lima-Cordón et al., 2019). Esta especie ha sido reportada en Guatemala, Belice, México y Honduras, se puede encontrar en el interior de los domicilios y cerca de bosques tropicales, lo que indica que las poblaciones del triatomino podrían estar explotando condiciones de alojamiento. La capacidad vectorial de *T. huehuetenanguensis* indica que es un potencial transmisor de *T. cruzi* en su área de distribución, en especial porque las hembras suelen defecar mientras se alimentan, con mayor frecuencia que los machos y ninfas; y los huevos tienen una tasa de eclosión del 98% (Michel-Parra et al., 2021). En Guatemala, este vector se ha reportado en los departamentos de Huehuetenango y Petén, en altitudes que varían desde los 300 m sobrepasando los 3000 m s.n.m., y se ha recolectado tanto en ambientes domésticos como peridomésticos. Además, más del 90% de especímenes (18/20) que fueron reportados en un estudio en Guatemala, han sido encontrados con una alta infección natural con *T. cruzi* (Lima-Cordón et al., 2019). Estos datos sugieren que *T. huehuetenanguensis* es uno de los vectores que tiene un papel fundamental y potencialmente importante en la enfermedad de Chagas humana, por esto debe evaluarse más a fondo.

Microbiota de Triatominos

Los primeros reportes de bacterias asociadas a triatominos fueron a mediados del siglo XX, describiendo 248 referencias que incluyen parásitos, simbioses y depredadores de insectos



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

triatominos (Ryckman y Blankenship, 1984). Los estudios sobre bacterias intestinales de insectos han proporcionado información importante sobre cómo usar estos microorganismos para controlar los parásitos transmitidos por insectos vectores, una estrategia conocida como paratransgénesis (Lopez-Ordóñez et al., 2018). Debido a esto, es esencial caracterizar estos simbiontes bacterianos en insectos selváticos y domiciliarios, ya que este paso inicial es de suma importancia para el enfoque paratransgénico.

Actualmente existe un vacío de información respecto a la microbiota asociada en la reciente especie descrita, *T. huehuetenanguensis*, por lo que su estudio podría ser de utilidad como un primer paso para un enfoque paratransgénico con este vector. Aun así, se han realizado estudios de microbiota intestinal de otros triatominos cercanamente emparentados y que habitan en regiones en común con *T. huehuetenanguensis*. Tal es el caso de *T. dimidiata* en el sur de México, vector en el cual se han reportado en su mayoría bacterias gram positivas, incluyendo los géneros *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Micrococcus* y *Delftia*. De estos géneros, se han propuesto *Staphylococcus saprophyticus*, *Micrococcus luteus* y *Bacillus megaterium* como potenciales candidatos para estudios paratransgénicos (Lopez-Ordóñez et al., 2018).

Paratransgénesis y la enfermedad de Chagas

La paratransgénesis ha sido una alternativa para el control de vectores y la transmisión de enfermedades, mediante la manipulación genética de los microorganismos nativos de los vectores (Hurwitz et al., 2011). Los simbiontes genéticamente modificados son reintroducidos al insecto para interrumpir su ciclo de vida o inhibir al patógeno que causa la enfermedad a través de la expresión de moléculas efectoras (Ratcliff et al., 2022; Hurwitz et al., 2011). La paratransgénesis tuvo sus inicios con el estudio de triatominos para control de Chagas y ha sido utilizada para el control de otros vectores como *Anopheles*, *Aedes* y *Culex*, transmisores de varias enfermedades de gran importancia a nivel mundial (Ratcliff et al., 2022; Wilke & Marrelli, 2015). Estos estudios se han dado por las asociaciones que se han



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

visto con las diferentes bacterias presentes en los vectores, y cómo estas se relacionan a procesos digestivos, metabólicos y a procesos de la gametogénesis y de desarrollo (Gaio et al., 2011).

En los estudios relacionados a paratransgénesis, se han determinado algunas características necesarias que deben presentar las bacterias potenciales: la bacteria o microorganismo debe ser nativos del vector, deben ser cultivable y susceptible a modificación genética, además debe ser estable, poseer la capacidad de transmitir su molécula efectora y sobrevivir lo necesario para producirla dentro del vector, respecto a su molécula esta debe alterar procesos biológicos del vector (Beard, Córdón-Rosales & Durvasula, 2002).

Los estudios paratrasgénicos en triatominos abordados como una estrategia para el control de la enfermedad de Chagas tuvieron sus inicios con la especie *Rhodnius prolixus* (Ratcliff et al., 2022). Desde entonces, se han llevado a cabo más investigaciones en otras especies de triatominos, siempre con el objetivo de determinar especies bacterianas potenciales para el uso de paratransgénesis, como en *Meccus pallidipenis*, *Panstrongylus megistus*, *T. dimidiata*, *T. infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *T. juazeirensis* y *T. sherlocki*, (Jiménez-Cortés et al., 2020; Díaz et al., 2016).

En Guatemala, se estudió la microbiota proveniente del intestino de *T. dimidiata* en especímenes infectados y no infectados por *T. cruzi*. En este estudio se encontró que la abundancia de familias de bacterias entre especímenes infectados y no infectados fue similar, presentando pocas diferencias entre estos. Las familias más abundantes en la microbiota intestinal de los especímenes evaluados fueron las familias de bacterias Gram positivas Staphylococcaceae y Enterococcaceae y las familias Gram negativa Pseudomonadaceae y Enterobacteriaceae, mientras que los géneros con mayor abundancia fueron *Staphylococcus*, *Enterococcus* y *Pseudomonas* (Melgar et al., 2023).



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

4. Planteamiento del problema

La enfermedad de Chagas es una zoonosis tropical desasistida con la mayor carga de enfermedad de todas las patologías parasitarias en Latinoamérica (OMS, 2004). Según la CDC de Estados Unidos, hay una gran cantidad de personas infectadas en México, Centroamérica y Sudamérica que superan los 7 millones (CDC, 2021) y el costo aproximado anual para una persona con el padecimiento de la enfermedad etapa crónica es de \$4,059.00 en Latinoamérica (Lee, et. al., 2013). En las últimas décadas, el panorama epidemiológico de la enfermedad se ha transformado debido a movimientos migratorios humanos, producto de la urbanización (Perreira, et.al., 2013; Gascon, et. al., 2010; Castillo, 2017). Actualmente existe una preocupación con respecto a la carga económica, ya que se reportó una estimación de los costos globales de la enfermedad ascienden a \$7.19 billones por año.

La transmisión de *T. cruzi* se ha dado a transfusiones sanguíneas, trasplantes de órganos y también ocasionado por la transmisión vertical (Polonio et al., 2021). Sin embargo, la principal vía de transmisión es por medio del contacto con muestras fecales infectadas de especies de triatomíneos, quienes son principales vectores de la enfermedad. No obstante, existen otros vectores como el recién descrito, *T. huehuetenanguensis*, un potencial vector para la enfermedad de Chagas humana que ha sido reportado en el occidente y norte del país con una carga parasitaria elevada de *T. cruzi* (Lima-Cordón et al., 2019). En Guatemala 10 de los 22 departamentos del país han sido clasificados como regiones endémicas para Chagas debido a la prevalencia de la enfermedad, entre estos departamentos se encuentran Jutiapa y Huehuetenango (Chávez, 2015). En el Salvador, la región suroeste, (departamentos de Santa Ana, Sonsonate y Ahuachapán), es considerada como una región hiperendémica por la alta y constante incidencia de la enfermedad, ya que la incidencia de casos agudos supera los registros presentados en otras regiones de Latinoamérica (Sasagawa, et al., 2014).

En Guatemala desde el año 2004 se ha implementado el enfoque EcoSalud, principalmente en los departamentos de Jutiapa y Chiquimula, ya que tienen los niveles más altos de



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

infestación y se consideran puntos críticos de transmisión de *T. cruzi* a los humanos (Peterson, et. al, 2019)

La paratransgénesis ha sido una medida para que los vectores sean controlados y la transmisión de enfermedades, mediante la manipulación genética de los microorganismos nativos de los vectores (Hurwitz et al., 2011), por lo que es necesario realizar el estudio en la nueva especie descrita *T. huehuetenanguensis*. Con respecto a *T. dimidiata*, los estudios realizados hasta ahora en relación con paratransgénesis han mostrado resultados alentadores sugiriendo a las especies *B. megaterium*, *M. luteus* y *S. saprophyticus* como potenciales simbioses que podrían ser usados para el control de este vector (López-Ordóñez et al., 2018). Asimismo, otros estudios han mostrado que las bacterias asociadas al desarrollo ontogénico de *T. dimidiata*, por lo que los autores indican que se podría intervenir mediante paratransgénesis se podría disponer de una estrategia para el control de este vector y por ende controlar la enfermedad de Chagas (Polonio et al., 2021) y el estudio reciente realizado por Melgar, et. al. (2023) donde indica Las familias más abundantes en la microbiota intestinal de los especímenes evaluados fueron las familias de bacterias Gram positivas Staphylococcaceae y Enterococcaceae y las familias Gram negativa Pseudomonadaceae y Enterobacteriaceae, mientras que los géneros con mayor abundancia fueron *Staphylococcus*, *Enterococcus* y *Pseudomonas*. Conocer la microbiota de especímenes *T. huehuetenanguensis* del país revela un vacío de información en esta nueva especie que potencialmente podría contribuir en el contagio de la enfermedad de Chagas humana en el occidente y norte de Guatemala.

5. Objetivos

Objetivos Generales:

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

Objetivos específicos:



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

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

Evaluar la distribución taxonómica bacteriana de *T. huehuetenanguensis* domésticas infectadas y no infectadas con *T. cruzi*.

Identificar biomarcadores microbianos de *T. huehuetenanguensis* domésticas infectadas y no infectadas con *T. cruzi*.

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

6. Hipótesis

El componente de organismos bacterianos que forman parte de la microbiota intestinal de *Triatoma huehuetenanguensis* domésticas infectadas con *Trypanosoma cruzi* tendrá una mayor diversidad a la de aquellos individuos que no se encuentren infectados con el parásito *T. cruzi*.

7. Método

Se colectaron adultos de *T. huehuetenanguensis* en el departamento de Huehuetenango. Los especímenes fueron colectados por personal calificado del programa nacional de enfermedades transmitidas por vectores del Ministerio de Salud Pública de Guatemala, mientras que en Jutiapa los especímenes fueron muestreados por medio de personal del Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología en conjunto con el personal de vectores del ministerio de salud.

Los triatomos capturados fueron colocados en viales plásticos, un espécimen por vial, para evitar contaminación cruzada de parásitos.



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

Las heces de los triatomíneos se obtuvieron presionando su abdomen y se mezclaron, luego, estas fueron diluidas en solución salina al 85% y examinadas con un aumento de 400X en un microscopio óptico marca Nokia.

Luego se realizó la extracción de ADN por medio del kit de Qiagen DNeasy Blood & Tissue.

Se enviaron 149 µl de ADN genómico de cada muestra en cadena fría a la empresa NOVOGENE, quienes proveyeron el servicio de secuenciación. Las muestras fueron analizadas mediante secuenciación de nueva generación del gen completo 16s rRNA. La plataforma que se utilizó fue PacBio REvio (HiFi reads) y se obtuvieron lecturas con un largo de 5K. Los resultados de las secuenciaciones fueron obtenidos en formato FASTQ para el análisis bioinformático.

Recolección de información

Con respecto a la colecta de los especímenes, en todas las localidades se utilizó el método hombre/hora, en el cual durante 30 minutos dos personas realizaron una búsqueda activa dentro y fuera de la casa, con ayuda de linternas y pinzas.

Las muestras se colectaron durante los meses de abril a agosto del 2024. A todos los insectos incluidos en el estudio se les realizó una disección intestinal bajo condiciones asépticas y se les extrajo ADN genómico. La extracción de ADN de las muestras, se realizó mediante el kit de Qiagen DNeasy Blood & Tissue.

Previo a la secuenciación se llevaron a cabo pruebas de amplificación de la región de interés para asegurar la obtención de datos de secuenciación. Se realizó la secuenciación del gen completo 16 rRNA para la obtención de la microbiota intestinal de cada uno de los individuos.

7.1. Tipo de investigación.



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

Investigación básica

7.2. Enfoque y alcance de la investigación.

La investigación tuvo un enfoque cuantitativo y con alcance exploratorio.

7.3. Diseño de la investigación.

Se utilizó un enfoque cuantitativo experimental. En donde se obtuvieron los resultados de 25 especímenes que fueron colectados en el campo, luego se procedió a realizar la extracción de ADN y se secuenció gen completo 16s rRNA de cada muestra.

Se realizaron análisis de secuencias de ADN mediante el programa FASTQC versión 0.11.9, utilizando varios factores de calidad descritos en el numeral 7.7. Luego, dichas secuencias se analizaron perfiles taxonómicos y la presencia de bacterias con potencial paratransgénico, usando el programa estadístico R, obteniendo un listado de filios de especies. Por último, se realizaron pruebas de diversidad alfa y beta para las especies utilizando el software QIIME2 (versión QIIME2-202006). Para estas pruebas se utilizó un valor de significancia de $p = 0.05$.

7.4. Población, muestra y muestreo.

Universo o población: especímenes de *T. dimidiata* de Huehuetenango.

La muestra fue la siguiente: 16 especímenes de *T. huehuetenanguensis* y 9 especímenes de *T. dimidiata* no infectados con *T. cruzi* colectados en el departamento de Huehuetenango.

Muestreo: Con respecto a la colecta de los especímenes, en todas las localidades se utilizó el método hombre/hora, en el cual durante 30 minutos dos personas realizaron una búsqueda activa dentro y fuera de la casa, con ayuda de linternas y pinzas.



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

Las instituciones implicadas fueron las siguientes:

- 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 IIQB

7.5. Técnicas

Se realizó el método hombre/hora, en el cual durante 30 minutos dos personas realizaron una búsqueda activa dentro y fuera de la casa, con ayuda de linternas y pinzas de *T. huehuetenanguensis* adultos y vivos en el departamento de Huehuetenango durante los meses de abril a agosto del 2024. Las colectas fueron llevadas a cabo hasta contar con 12 especímenes muertos de *T. huehuetenanguensis*, se disectaron para la obtención de los intestinos y se realizó la extracción de ADN de cada una de las muestras. También se tomaron en cuenta 9 especímenes de *T. dimidiata* colectados en el departamento de Huehuetenango y 4 especies de *T. huehuetenanguensis* de la colección en alcohol del LENAP, obteniendo un total de 25 individuos.

Identificación Taxonómica de *T. huehuetenanguensis*

Se identificó a la especie *T. huehuetenanguensis* mediante el artículo científico de Lima-Cordón et al., 2019, y la jefa del LENAP



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

Detección de *T. cruzi*

No fue posible hacer la detección de *T. cruzi* en los especímenes de *T. huehuetenanguensis* debido a que la mayoría de los ejemplares que se encontraron estaban muertos y no fue posible su detección por medio de microscopía.

Para los especímenes de *T. dimidiata* que se utilizaron, si se realizó la detección de *T. cruzi*, para esto, se presionó su abdomen y se mezclaron, luego, estas fueron diluidas en solución salina al 85% y examinadas con un aumento de 400X en un microscopio óptico marca Nokia.

Disección de especímenes y extracción de ADN

Primeramente, se maceró cada muestra con un pistilo estéril en un tubo de 1.5ml durante 5 minutos cada una. Para evitar contaminación cruzada, se utilizó un pistilo por cada individuo, luego, Se añadió 180 µl de tampón ATL

Se agregó 20 µl de proteinasa K. Se mezcló con un vórtex e incubó a 56 °C por 2 horas, hasta que los insectos estuvieron completamente lisados. La muestra se agitó durante 15 s. Se agregaron 200 µl de tampón AL a la muestra y se mezcló mediante agitación vorticial. Luego se agregaron 200 µl de etanol (96-100 %) y se mezcló bien mediante agitación vorticial.

Luego se pipeteó la mezcla en la columna de centrifugación DNeasy Mini colocada en un tubo de recolección de 2 ml (incluido). Se centrifugó a ≥ 6000 xg (8000 rpm) durante 1 minuto. Se descartó el flujo y el tubo de recolección.

Se colocó la columna de centrifugación DNeasy Mini en un nuevo tubo de recolección de 2 ml, se agregaron 500 µl de tampón AW1 y se procedió a centrifugar durante 1 minuto a ≥ 6000 xg (8000 rpm). Luego, se descartó el flujo y el tubo de recolección.



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

Se colocó la columna en un nuevo tubo de recolección, se agregaron 500 µl de tampón AW2 y se centrifugó durante 3 minutos a 20 000 xg (14 000 rpm) para secar la membrana. Luego, se descartaron los tubos y por último, se descartó la columna de centrifugación en un tubo de microcentrífuga limpio de 1,5 ml y se pipetearon 200 µl de tampón AE. Luego se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 1 minuto y se procedió a centrifugar durante 1 minuto a ≥ 6000 xg (8000 rpm) para eluir.

La cuantificación de ADN genómico para cada muestra fue realizada mediante Qubit 3.0.

Secuenciación del gen completo 16s rRNA

Se enviaron 149 µl de ADN genómico de cada muestra a una concentración de 12.5 ng/µl en cadena fría a la empresa NOVOGENE, quienes proveyeron el servicio de secuenciación. Las muestras fueron analizadas mediante secuenciación de nueva generación del gen completo 16s rRNA. La plataforma que se utilizó fue PacBio REvio (HiFi reads) y se obtuvieron lecturas con un largo de 5K. Los resultados de las secuenciaciones fueron obtenidos en formato FASTQ para el análisis bioinformático.

7.6. Resumen de las variables o unidades de análisis

Tabla 1. Objetivos, variable, instrumentos y unidad de medida o cualificación utilizada en la investigación.

Objetivo específico	Variable	Instrumentos	Unidad de medida o cualificación
---------------------	----------	--------------	----------------------------------



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

<p>Establecer la biodiversidad involucrada en la microbiota intestinal de <i>T. huehuetenanguensis</i> domésticas infectadas y no infectadas con <i>T. cruzi</i>.</p>	<p>Taxones que se presentan para cada grupo evaluado. Abundancias relativas pertenecientes a cada taxón.</p>	<p>Secuenciación de nueva generación para el gen completo 16s rRNA, empleando la plataforma PacBio.</p> <p>Determinación de perfiles taxonómicos mediante los paquetes Dada2 y el software QIIME2 (versión QIIME2-202006)</p>	<p>Secuenciación del gen completo 16s rRNA. Los ASVs que pueda asignarles una identidad taxonómica serán los taxones. Las abundancias relativas de cada taxón será la proporción de ASVs pertenecientes a cada taxón por muestra.</p>
<p>Evaluar la distribución taxonómica de organismos bacterianos de <i>T. huehuetenanguensis</i> domésticas infectadas y no infectadas con <i>T. cruzi</i>.</p>	<p>Alpha y Beta diversidad de <i>T. huehuetenanguensis</i> infectados y no infectados con <i>T. cruzi</i>.</p>	<p>Determinación de los índices de alpha diversidad: Chao1, Shannon, Shannon Inverso y diversidad observada.</p> <p>Evaluación de la diversidad beta mediante los valores de distanciamiento de Bray-Curtis</p>	<p>Índice de Chao1, Shannon, Shannon Inverso y diversidad observada (diversidad alfa). Valores de distanciamiento de Bray-Curtis (diversidad beta).</p>
<p>Identificar biomarcadores</p>		<p>Determinación de taxones característicos</p>	<p>Valores de abundancia relativa</p>



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

<p>microbianos de <i>T. huehuetenanguensis</i> domésticas infectadas y no infectadas con <i>T. cruzi</i>.</p>	<p>Análisis diferencial de expresión.</p>	<p>(Biomarcadores) para el grupo de <i>T. huehuetenanguensis</i> infectadas con <i>T. cruzi</i> y para el grupo de <i>T. huehuetenanguensis</i> no infectadas con <i>T. cruzi</i>. Análisis diferencial de expresión con el software QIIME2 (versión QIIME2-202006)</p>	<p>y valores de LDA para cada taxón determinado como Biomarcador.</p>
<p>Identificar las especies de bacterias con potencial de paratransgénico presentes en la microbiota intestinal de <i>T. huehuetenanguensis</i> domésticas infectadas con <i>T. cruzi</i>.</p>	<p>Presencia de especies bacterianas con potencial de paratransgénesis en <i>T. huehuetenanguensis</i> infectadas con <i>T. cruzi</i>.</p>	<p>Secuenciación de nueva generación para el gen completo 16s rRNA, empleando la plataforma PacBio. Asignación taxonómica y determinación de perfiles taxonómicos mediante los paquetes DADA2, el software QIIME2 (versión QIIME2-</p>	<p>Amplicones de secuencia de variantes (ASVs) pertenecientes a especies bacterianas con potencial de paratransgénesis y la abundancia relativa de estas en <i>T. huehuetenanguensis</i> infectadas con <i>T. cruzi</i></p>



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

		202006) y la base de datos SILVA 138.	
--	--	---------------------------------------	--

7.7. Procesamiento y análisis de la información.

Análisis de Secuencias

El archivo BAM de PacBio (resultado que entregó la empresa de secuenciación) se dividió según el código de barras y se filtró para obtener datos limpios. Luego, los datos efectivos se utilizaron para realizar el análisis de variantes de secuencia de amplicones (ASV) y la anotación de especies. Además, se construyeron árboles filogenéticos de asignación taxonómica a través del análisis estático posterior explican las diferencias en la construcción de la comunidad entre muestras o entre grupos a través de PCoA, PCA y NMDS La mayor parte del análisis se realizó mediante la plataforma Qiime2 y el paquete DADA2.

Cabe destacar que el método DADA2 para ASV requiere datos de alta calidad y una secuenciación profunda (se recomiendan al menos 1w de lecturas CCS).

De acuerdo con los resultados de las anotaciones de ASV y las tablas de características de cada muestra, se obtuvieron las tablas de abundancia de especies a nivel de reino, filo, clase, orden, familia, género y especie. Estas tablas de abundancia con información de anotaciones son el contenido central del análisis de amplicones. De acuerdo con diferentes propósitos experimentales, se seleccionaron varias especies de interés clave, de la tabla de abundancia de especies de cada nivel de clasificación (generalmente centrándose en el nivel de filo y género), combinadas con la composición de especies y el análisis diferencial de diferentes muestras (grupos), y el análisis de conglomerados para realizar una investigación en profundidad.



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

Se calcularon, el índice de análisis de diversidad alfa (observed_otus, shannon y chao1) mediante el software QIIME2 (versión QIIME2-202006)

En el estudio de diversidad beta, se seleccionaron la distancia UniFrac ponderada, la distancia UniFrac no ponderada, la distancia de Jaccard y la distancia de Bray para medir las diferencias entre las muestras, esto mediante el software QIIME2 (versión QIIME2-202006)

Se utilizó el software LEfSe (versión 1.0) para realizar el análisis LEfSe (umbral LDA score: 4) con el fin de descubrir los biomarcadores.

Perfiles taxonómicos y presencia de bacterias paratransgénicas

Los perfiles taxonómicos utilizados fueron analizados mediante el software QIIME2 (versión QIIME2-202006), el cual es una plataforma de ciencia de datos y bioinformática multiómica de microbiomas confiable, gratuita, de código abierto, extensible y desarrollada y respaldada por la comunidad.

8. Aspectos éticos y legales

No aplica.

9. Resultados y discusión

9.1 Resultados

La siguiente tabla presenta los datos de colecta de las 25 muestras de especímenes de triatomíneos utilizados para el presente estudio. La tabla proporciona la especie, departamento, municipio, localidad y estadio de cada muestra.



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

Tabla 1. Datos de colecta de especímenes de *Triatoma huehuetenanguensis* y *T. dimidiata*.

Número de muestra	Departamento	Municipio	Localidad	Estadio
1	Huehuetenango	La Democracia	Cantón Escondido	Hembra
2	Huehuetenango	Aguacatán	Aldea Exchimal	Macho
3	Huehuetenango	San Antonio Huista	San José Tabron	Hembra
4	Huehuetenango	San Antonio Huista	Aldea El Rancho Viejo	Hembra
5	Huehuetenango	San Antonio Huista	-	Hembra
6	Huehuetenango	La Democracia	Aldea La Montañita	Hembra
7	Huehuetenango	Huehuetenango	Aldea El Orégano	5to estadio
8	Huehuetenango	Huehuetenango	Aldea El Orégano	Hembra



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

9	Huehuetenango	Huehuetenango	Aldea El Orégano	Hembra
10	Huehuetenango	La Democracia	Nueva Viñas	Hembra
11	Huehuetenango	Jacaltenango	Jacaltenango	Hembra
12	Huehuetenango	San Antonio Huista	Caserío Estancia	Hembra
13	Huehuetenango	San Antonio Huista	-	Hembra
14	Huehuetenango	Nentón	Nentón	Hembra
15	Huehuetenango	Santa Ana Huista	Buenos Aires	Hembra
16	Huehuetenango	Santa Ana Huista	Buenos Aires	Hembra
17	Huehuetenango	Huehuetenango	Aldea El Orégano	5to estadio
18	Huehuetenango	Huehuetenango	Aldea El Orégano	Hembra
19	Huehuetenango	Huehuetenango	Aldea El Orégano	Hembra



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

20	Huehuetenango	Huehuetenango	Aldea El Orégano	Hembra
21	Huehuetenango	Huehuetenango	Aldea El Orégano	Hembra
22	Huehuetenango	Huehuetenango	Aldea El Orégano	Hembra
23	Huehuetenango	Nentón	Nentón	Macho
24	Huehuetenango	San Antonio Huista	Rancho Viejo	Macho
25	Huehuetenango	Unión Cantinil	Los Encuentros	Macho

Se observa la concentración en nanogramos sobre microlitros del ADN extraído para cada una de las muestras.

Tabla 2. Volumen y concentración del ADN extraído.

Número de muestra	Volumen (uL)	Concentración (ng/uL)
A15	48	51.15
B1	149	4.1
B2	149	69.4
B3	149	20
B4	149	0.882
B5	149	5.86



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

B6	149	32.6
B7	149	2.44
B8	149	0.856
B9	149	27.6
B10	149	6.48
B11	149	2.6
B12	149	25
B13	149	102
B14	149	74.6
B15	149	84.6
B16	149	9.16
B17	149	2.04
B18	149	11.2
B19	149	0.622
B20	149	2.84
B21	149	42.8
B22	149	1.87
B23	149	2.8
B24	149	14.6

Para los resultados de secuenciación del gen completo 16S rRNA de las 24 muestras, se puede observar el número de secuencias obtenidas a partir del proceso de limpieza, las cuales representan las lecturas útiles para los análisis. También se observa el número de bases



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

nucleotídicas (base) y la longitud promedio (Avg_len) de las lecturas después de la limpieza correspondiente de cada lectura.

Tabla 3. Resultados de la secuenciación del gen completo 16S rRNA de 24 muestras

Sample	Clean_reads	base	Avg_len
A15	25989	38163683	1468
B2	13260	19507343	1471
B3	828	1234854	1491
B4	53382	78849483	1477
B5	53523	78310910	1463
B6	531	793979	1495
B7	9188	13898149	1512
B8	5709	8617419	1509
B9	13753	20096935	1461
B10	66116	97007661	1467
B11	7168	10514480	1466
B12	327	481264	1471
B13	5750	8768087	1524
B14	5832	8684029	1489
B15	501	736574	1470
B16	7465	10983801	1471
B17	1299	1966847	1514
B18	3468	5144124	1483
B19	8511	12817821	1506
B1	53075	78152051	1472

Informe final de Proyecto de Investigación 2024

El mapa de calor tiene representados los filos bacterianos detectados en las muestras de triatominos, con un total de 7 filos, así como los 35 géneros encontrados más importantes que se observan en la parte derecha de la gráfica. Los filos que presentaron una abundancia mayor a la media están graficados en color rojo. El eje horizontal representa el nombre de la muestra y el eje vertical representa la anotación de función.

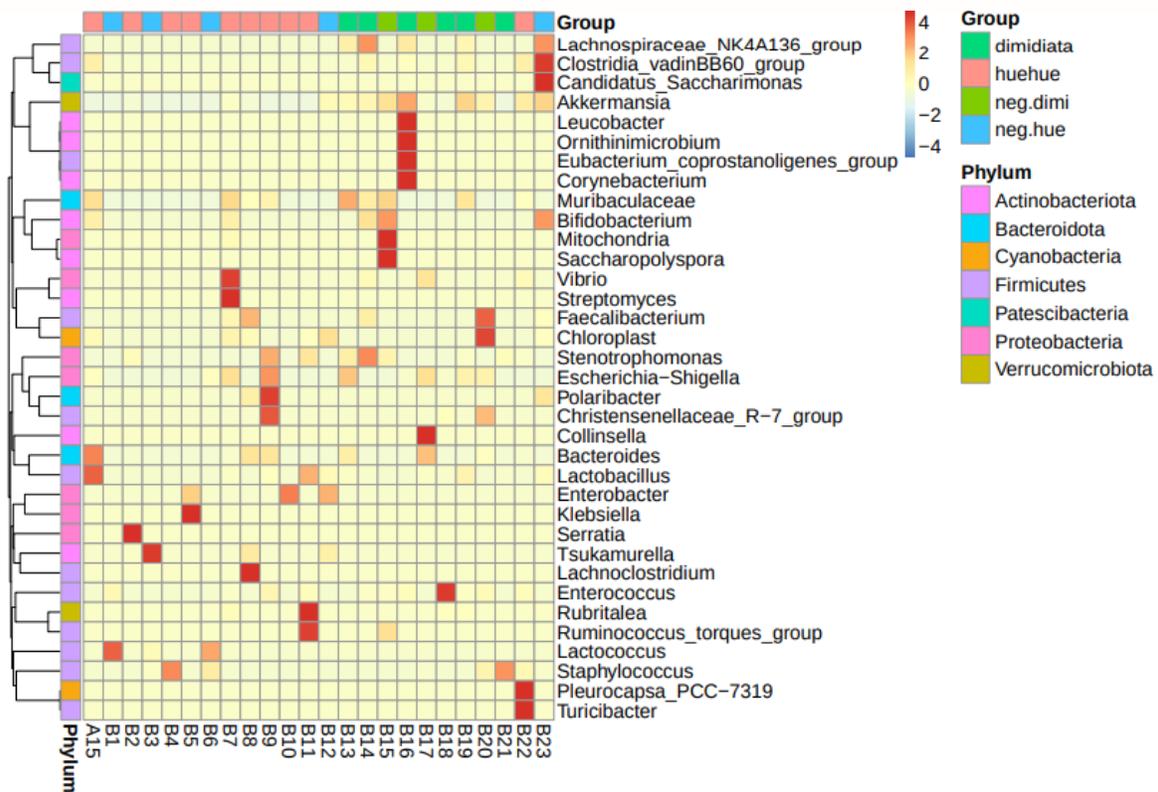


Figura 2. Mapa de calor de los 35 géneros principales encontrados en las muestras.

Mediante el diagrama de Venn se observan el traslape de los grupos bacterianos en los grupos de triatominos (huehue, dimidiata, neg.hue y neg.dimidi) representados por los cuatro modelos (Fig. 2A). El traslape indica que dos grupos bacterianos son compartidos entre los modelos de *Triatoma dimidiata* y *Triatoma huehuetenanguensis*. Donde 11 grupos se comparten entre el modelo huehue y dimidiata (Fig. 2B), mientras que para los modelos neg.dimidiata y neg.huehue (Fig. 2C) comparten dos grupos bacterianos.

Informe final de Proyecto de Investigación 2024

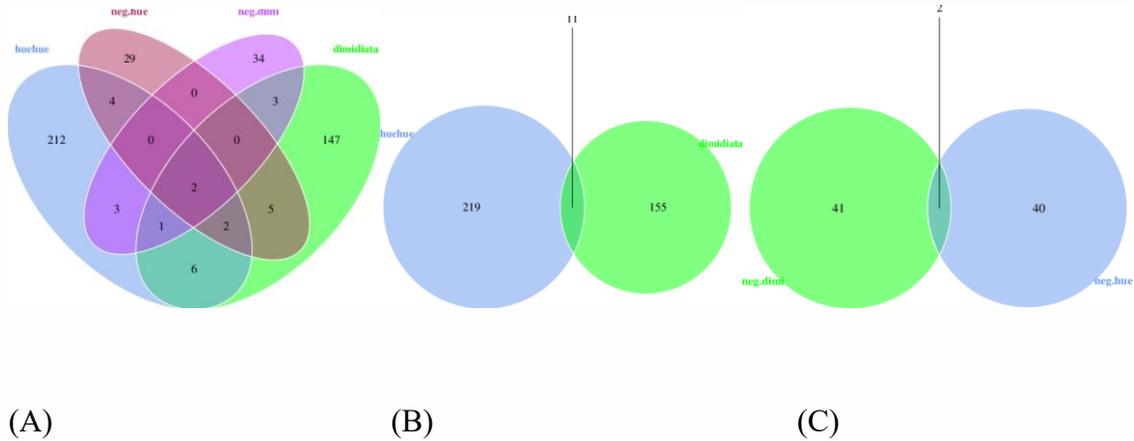


Figura 3. Diagrama de Venn

El gráfico de cajas muestra la distribución de conjuntos de datos en base a las variantes de secuencia del amplicón (ASV) en 24 muestras. Se observa un aumento lineal en el número de ASVs, lo que indica que las últimas muestras presentan una mayor cantidad de secuencias microbianas en comparación a las primeras muestras. Respecto a la diferencia del tamaño de las cajas, se puede observar que la muestra 1, 2 y 3 presentan una baja dispersión de datos y menor cantidad de ASVs, lo que indica una baja cantidad de variantes genéticas. Sin embargo, el número de variantes aumenta considerablemente a partir de la muestra 11, conforme aumenta el rango de ASVs observados. También puede apreciarse que algunas muestras como la 5, 11 y 20 presentan datos con distribución homogénea, lo que indica que la diversidad y abundancia de especies microbianas se encuentran en rangos similares.

Informe final de Proyecto de Investigación 2024

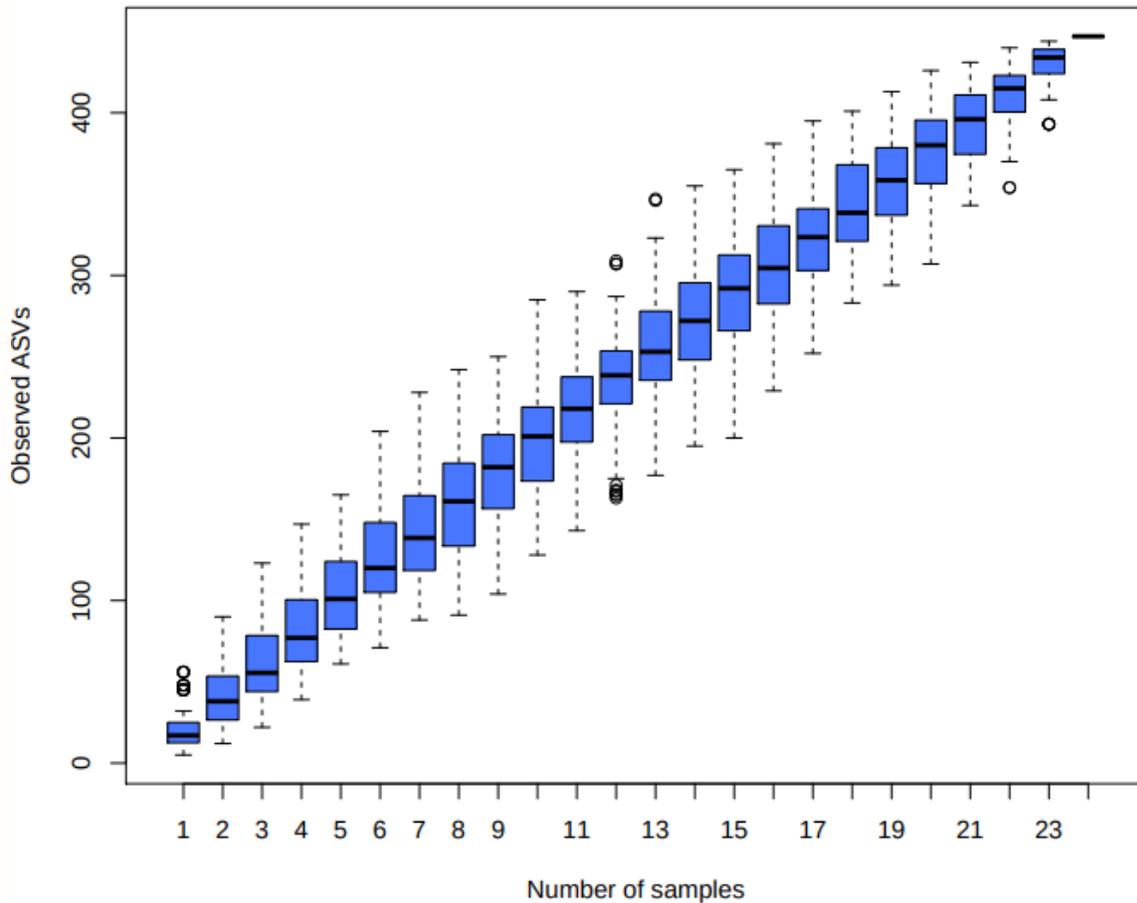


Figura 4. Diagrama de caja de acumulación de especies

Se listan los resultados de la diversidad alfa de la microbiota presente en las muestras analizadas, se muestran los índices: Chao1, OTUs Observados y Shannon. El índice Chao1 estima el número total de especies contenidas en la muestra de la comunidad, siendo la muestra A15 la que tiene mayor número y la B3 de menor número. El índice OTUS observado indica el número de especies observadas en la muestra, donde la muestra A15 obtuvo un alto número de especies y la B3 obtuvo el menor número. El índice de Shannon indica que cuánto mayor sea la diversidad comunitaria, más uniforme será la distribución de las especies y mayor será el índice, siendo la muestra B14 que obtuvo un mayor índice y la muestra B1 un menor número.



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

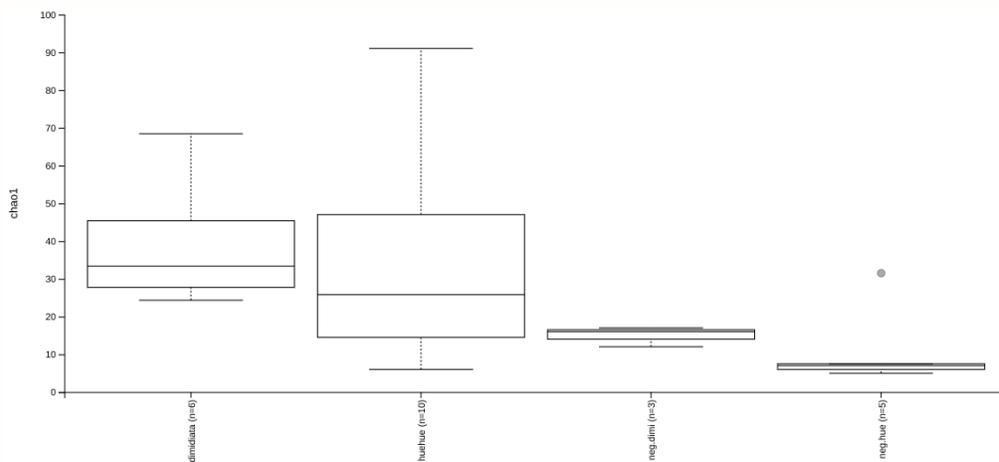
Tabla 4. Diversidad alfa de la microbiota presente en las muestras analizadas.

Número de Muestra	OTUs		
	Índice Chao1	Observados (especies observadas)	Índice Shannon
A15	91062	56	5082
B1	7500	7	1684
B2	12000	10	2210
B3	5000	5	1919
B4	6000	6	2262
B5	9000	9	2692
B6	6000	6	1697
B7	52588	48	5365
B8	25111	25	4273
B9	26500	24	4222
B10	73500	21	3016
B11	22000	17	3039
B12	7000	7	2379

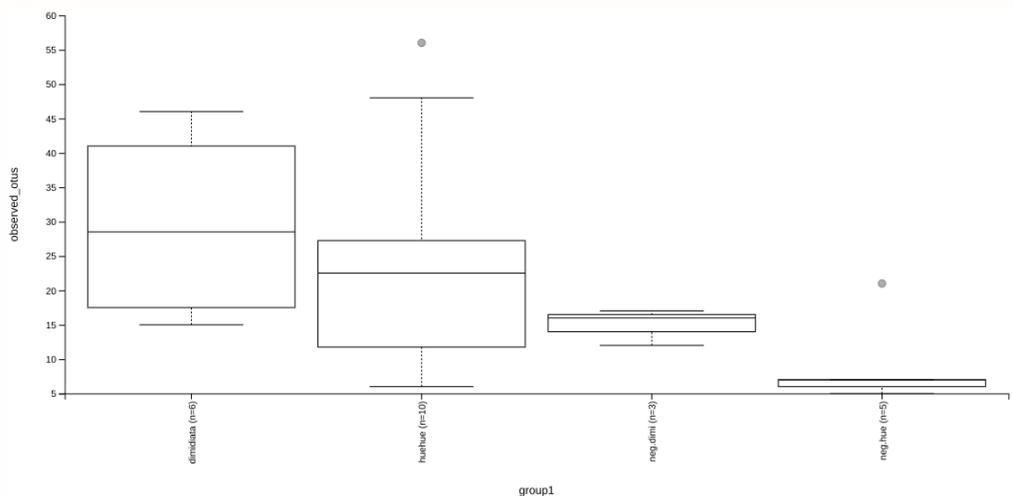
Informe final de Proyecto de Investigación 2024

B13 34500 32 4767

B14 68429 44 5101

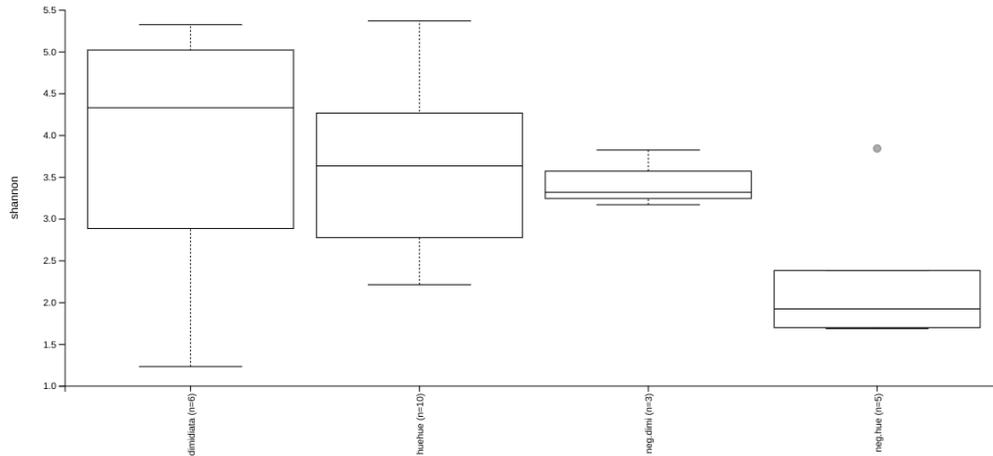


(A)



(B)

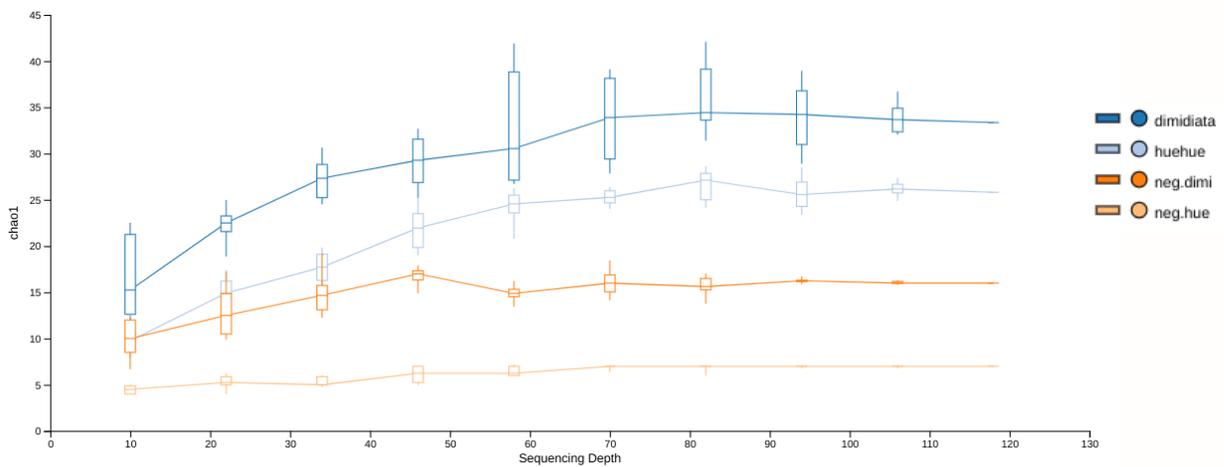
Informe final de Proyecto de Investigación 2024



(C)

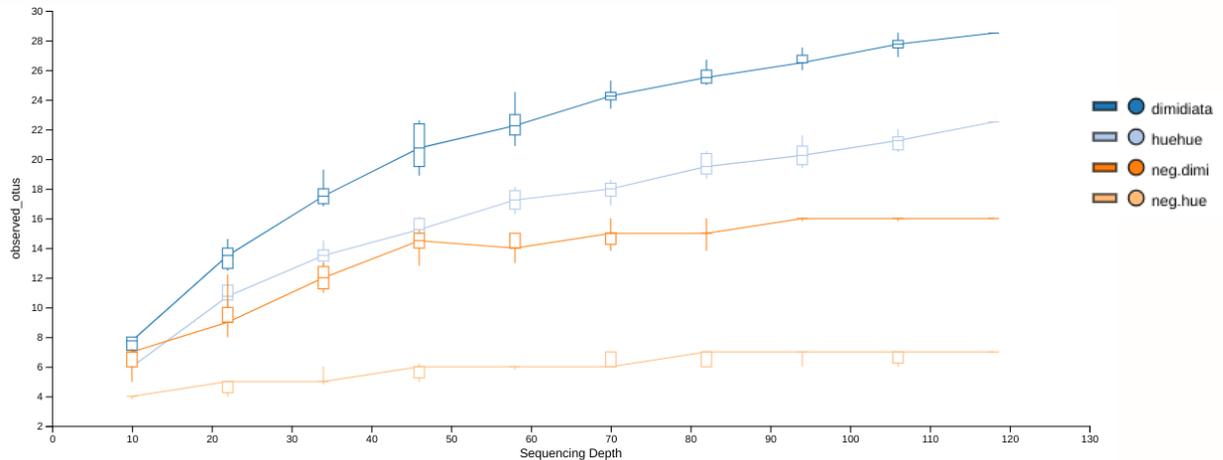
Figura 5. Diagrama de caja del análisis diferencial de los índices de diversidad alfa

Se observan los diagramas de cajas de los índices de diversidad alfa Chao1 (A), OTUs Observados (B) y Shannon (C). Para el índice de Shannon no hay una diferencia significativa entre los grupos, ya que el valor de p fue de 0.16. En contraste, con los índices Chao1 y OTUs Observados si se observó una diferencia significativa debido a que el valor de p fue de 0.03 y 0.04 respectivamente.

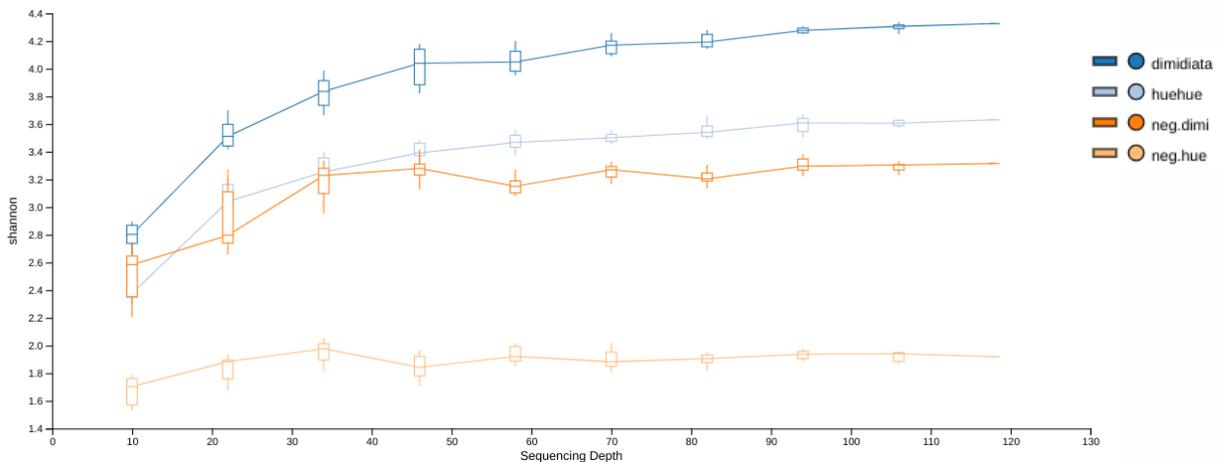


Informe final de Proyecto de Investigación 2024

(A)



(B)



(C)

Figura 6. Curvas de rarefacción de los índices de diversidad alfa

Se observan curvas de rarefacción de los índices de diversidad alfa Chao1 (A), OTUs Observados (B) y Shannon (C). El eje horizontal de cada curva representa la cantidad de los resultados de secuenciación y el eje vertical representa el índice de diversidad alfa

Informe final de Proyecto de Investigación 2024

correspondiente. Las líneas no difieren mucho entre sí, son similares, esto puede indicar que la diversidad presente en los dos conjuntos es similar.

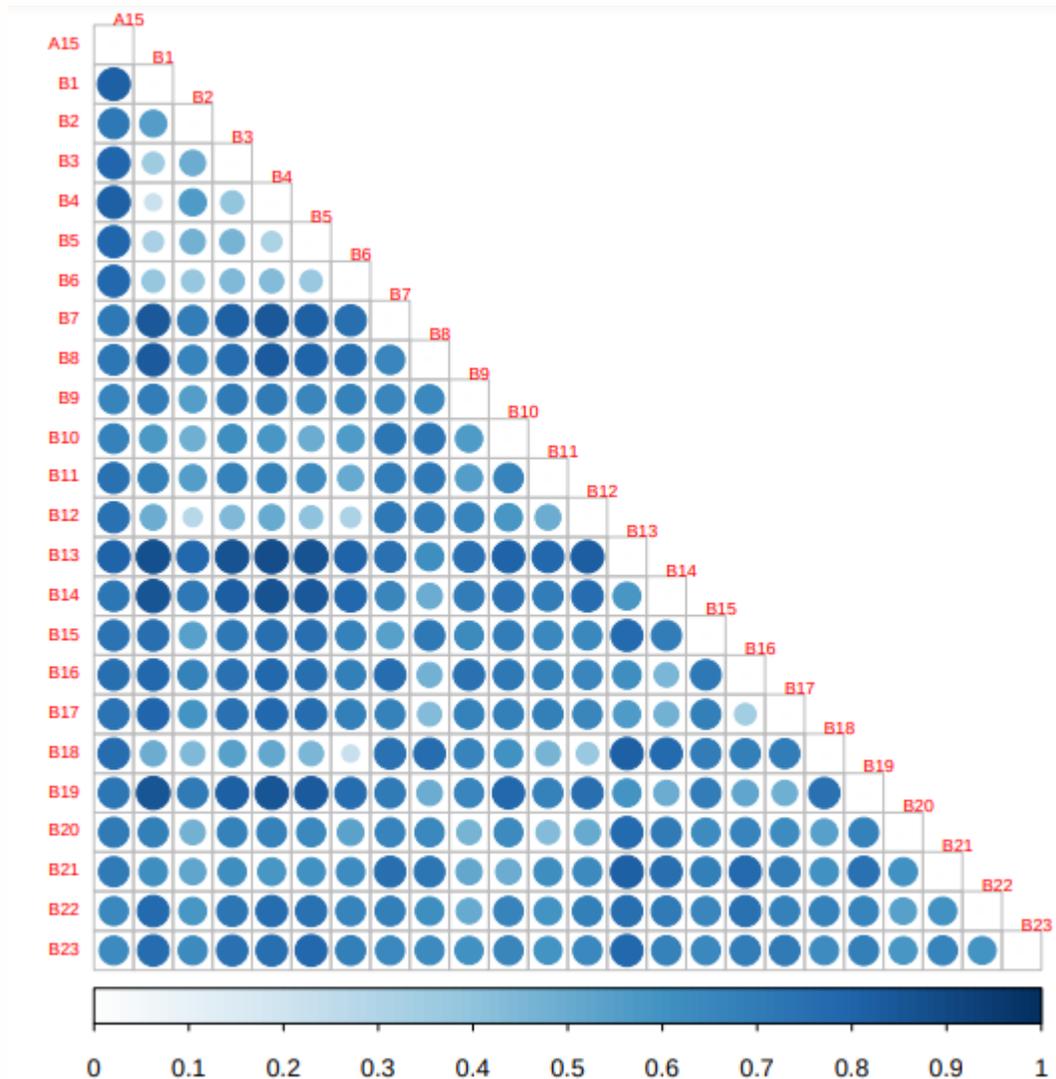
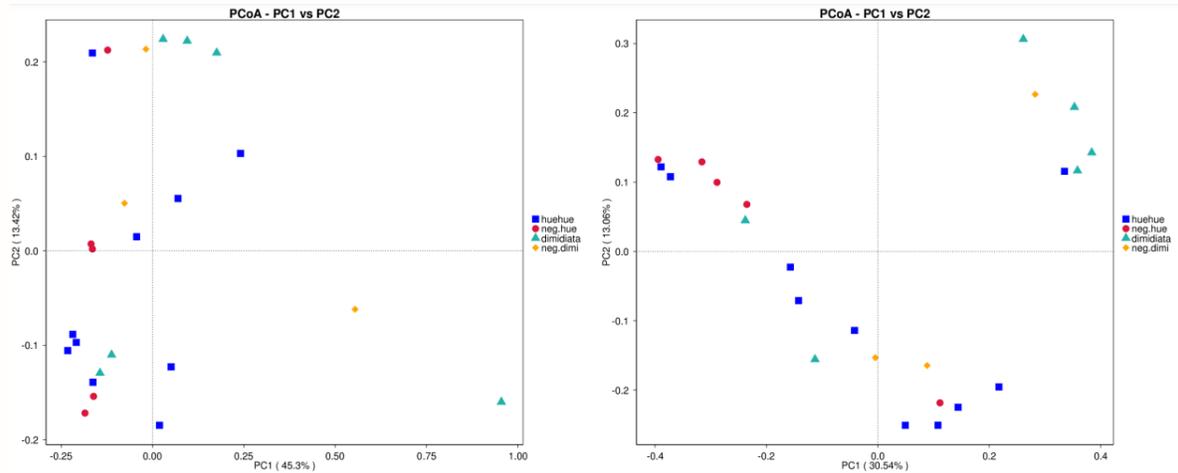


Figura 7. Mapa de calor de diversidad Beta

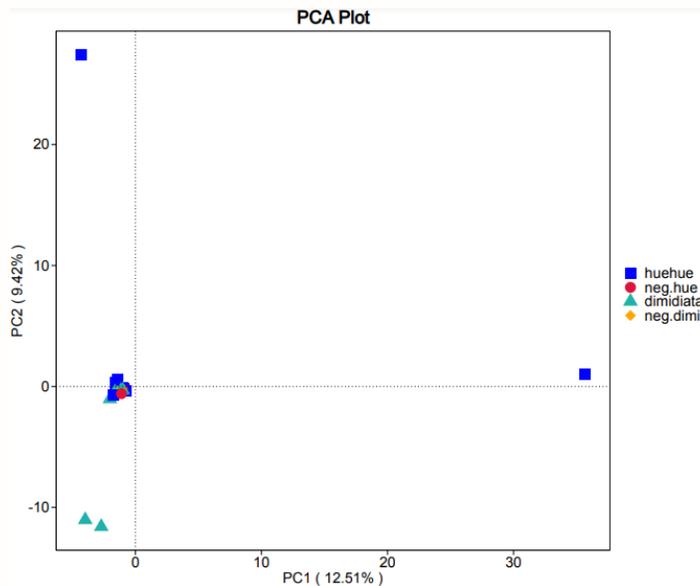
En el mapa de calor se puede apreciar la diversidad Beta en cada muestra analizada, se utilizaron las distancia Unifrac ponderada, no ponderada, la distancia de Jaccard y la distancia de Bray curtis para medir las diferencias entre muestras. En cuanto más grande es el círculo,

Informe final de Proyecto de Investigación 2024

es más oscuro el color azul, y por lo tanto, la diferencia entre las muestras son mayores y lo contrario. Cuanto menor sea el valor, son menores las variaciones en la diversidad de organismos entre las dos muestras.



A



B

Informe final de Proyecto de Investigación 2024

Figura 8. Análisis comparativo de la microbiota presente en *T. dimidiata* y *T. huehuetenanguensis* partir de PCA y PCoA. A=PCoA. B=PCA. El eje horizontal representa un componente principal, la ordenada representa otro componente principal y el porcentaje representa el valor de la contribución del componente principal a las diferencias de muestra; cada punto del gráfico representa una muestra y las muestras del mismo grupo están representadas por el mismo color.

Los gráficos de PCA y PCoA obtenidos demuestran que no existen diferencias en la microbiota presente en los grupos de estudio, ya que las muestras tienden a agruparse y solamente muy pocas están dispersas como se observa en la figura B.

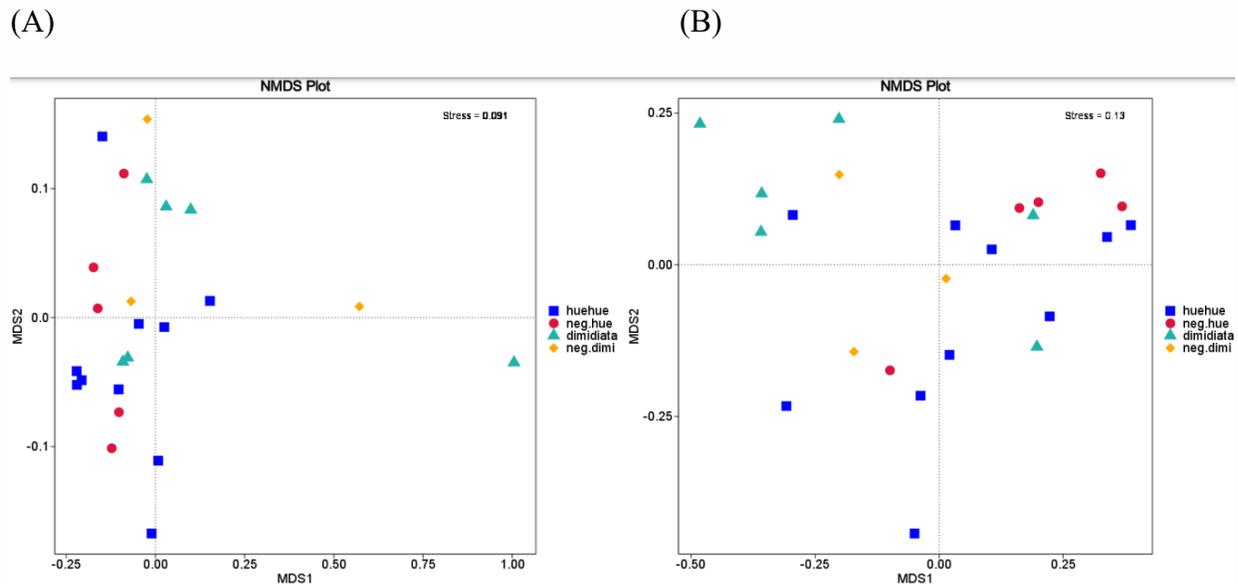


Figura 9. Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS).

En el análisis NMDS se observa que todos los valores de stress son inferiores a 0.2 en cada gráfico, lo cual muestra que el análisis es fiable, al mostrar mejor la estructura no lineal de los datos ecológicos. estas muestras las diferencias intergrupales (A) e intragrupalas (B).

Informe final de Proyecto de Investigación 2024

La prueba no paramétrica Adonis (MANOVA permutacional) indicó que no hay diferencias significativas entre grupos, debido a que se obtuvo un valor de “p” mayor a 0.05.

Tabla 5. perMANOVA (Adonis)

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F.Model	R2	Valor de “p” Pr(>F)
Grupo 1	3	0.637513	0.212504	1.376056	0.171093	0.134
Residuos	20	3.088601	0.154430	NAN	0.828907	NAN
Total	23	3.726114	NAN	NAN	1.000000	NAN

La prueba no paramétrica Anosim, la cual está basada en la distancia Unifrac, mostró que no hay diferencia significativa tanto en la variación entre grupos y dentro de grupos.

Tabla 6. Anosim

		Tamaño de muestra	Permutaciones	R	p-value	q-value
Grupo 1	Grupo 2					
	huehue	16	200	0.035556	0.348259	0.522388
	neg.dimi	9	200	-0.074074	0.606965	0.606965
dimidiata	neg.hue	11	200	0.088	0.189055	0.39801
	neg.dimi	13	200	0.197222	0.199005	0.39801
huehue	neg.hue	15	200	-0.038545	0.562189	0.606965

Informe final de Proyecto de Investigación 2024

neg.dimidiata	neg.hue	8	200	0.2	0.169154	0.39801
---------------	---------	---	-----	-----	----------	---------

El diagrama de análisis discriminante lineal -LDA- los 3 biomarcadores de mayor significancia estadística para el grupo de huehue: el género *Enterobacter*, el reino bacteria y la clase Cyanobacteria. Para el grupo de *T. dimidiata* se encontraron los siguientes biomarcadores: género *Lachnospiraceae*, el reino Archaea, la familia Akkermansiaceae, género *Akkermansia* y especie *Akkermansia muciniphila*.

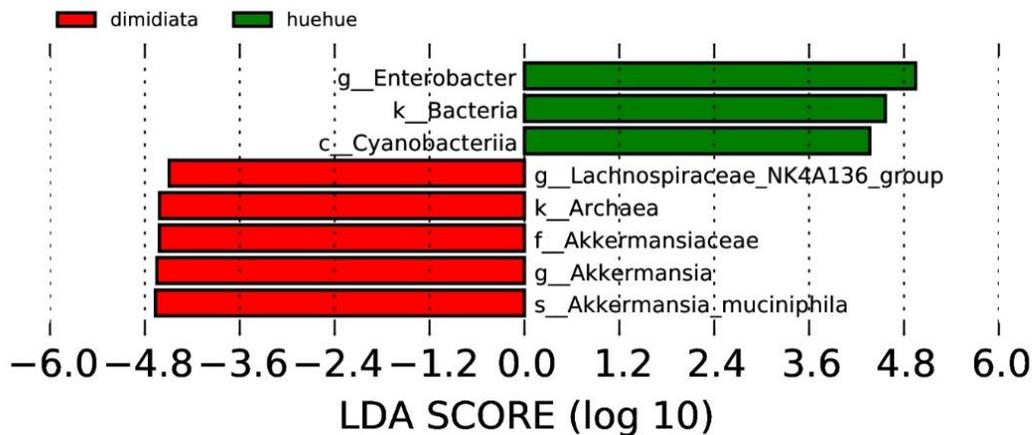


Figura 10. Análisis discriminante lineal (LDA)

En el cladograma del LDA se observan 1. Los cuales son los biomarcadores con mayor significancia entre grupos. Los círculos que irradian desde el lado interno al lado externo reflejan la escala taxonómico que va desde filo hasta el género (especie). Los nodos de color rojos muestra que la microbiota evaluada contribuye en gran medida en el grupo cubierto por el color rojo, al igual que los nodos verdes.

Informe final de Proyecto de Investigación 2024

Cladogram

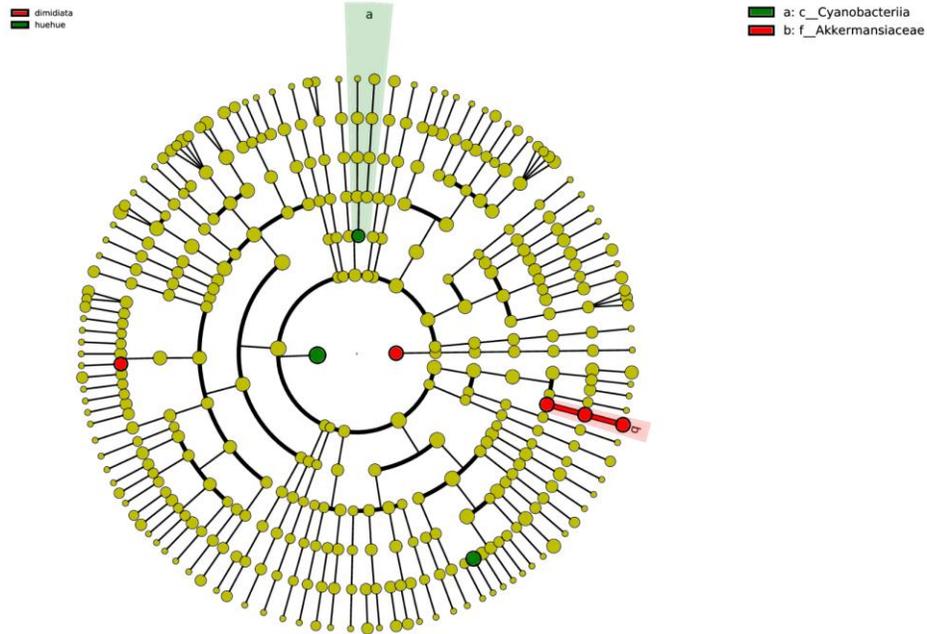


Figura 11. Cladograma del Análisis discriminante lineal (LDA)



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

9.2 Discusión de resultados

La biodiversidad taxonómica encontrada en la microbiota de los especímenes evaluados y pertenecientes a las especies de *T. huehuetenanguensis* y *T. dimidiata* (figura 1 y 2), colectados en el departamento de Huehuetenango (tabla 1), muestran a los filos más representativos: Actinobacteria, Bacteroidota, Firmicutes, Patescibacteria y Proteobacteria, los cuales son resultados reportados por: Melgar, et. al., 2023, Lopez-Ordoñez y col. (2018).

También se han realizado estudios con otros vectores de *T. cruzi*, por ejemplo Kieran et al., (2019) encontraron una alta abundancia de los filos antes mencionados, a excepción de Patescibacteria, en *Rhodnius pallescens*. También se encontraron géneros tales como: Serratia, Corynebacterium, Staphylococcus, los cuales han sido reportados por diferentes autores (Melgar, et. al., 2023; Gumiel, et. al. 2015; Lopez-Ordoñez y col.,2018).

A pesar de los retos presentados en el desarrollo de este estudio, todos los especímenes encontrados de *T. huehuetenanguensis* estaban muertos, por lo que no fue posible detectar mediante microscopía si eran positivos o no a *T. cruzi*. Sin embargo, es importante resaltar que en el estudio realizado por Melgar, et. al (2023), no se encontraron diferencias a nivel de filo en la distribución taxonómica entre el grupo de triatomos infectados y el grupo control. Este resultado también fue obtenido por los investigadores Villacís, et. al. (2024), a través de la comparación de la abundancia intestinal de la microbiota de *R. ecuadoriensis*, otro vector de *T. cruzi*. A pesar de esto, otros estudios reportan diferencias significativas entre la abundancia relativa de especímenes infectados y los que no están infectados con el parásito (Gumiel, et. al. 2015; Orantes, et. al., 2018).

Los diagramas de Venn (figura 3) muestran la cantidad de ASVs compartidos entre grupos, entre los grupos de Huehue y dimidiata se comparten 11, mientras que en los otros dos grupos, solamente 2 ASVs. Esta comparación de dos especies de vectores transmisores de la enfermedad conviviendo en la misma localidad también fue reportada por Gumiel, et. al. 2015, quienes compararon dos especies pertenecientes a la misma localidad de Brasil, cuya



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

principal composición de la microbiota intestinal fueron los filos Proteobacteria y Actinobacteria, resultado que concuerda con el presente estudio.

El diagrama de cajas de acumulación de especies (figura 4) demostró una relación proporcional entre la cantidad de individuos y de especies de bacterias de microbiota que se encontraban, aunque no es un indicador de riqueza de especie, pero puede ser un indicador de que el juicio del tamaño de la muestra es suficiente (Deng et al., 2015).

En la figura 5 demostró una diferencia que resulta ser significativa en el índice de Chao1 y OTUs observados, dentro de los índices evaluados para la obtención de diversidad alfa (tabla 4), con un valor de $p < 0.05$, lo cual indica que hubo una significancia en el número de especies observadas en los grupos, aunque el índice de Shannon obtuvo un valor de $p > 0.05$, por lo que, aunque difiera en el número de especies, no hay diferencia significativa en cuanto a la diversidad de estas. También se puede observar a los grupos neg.hue y neg.dimidiata son los que obtuvieron el menor número de especies observadas y podría ser debido al tamaño de las muestras, pero también influye el que tengan la menor calidad de lecturas limpias de datos en comparación con los grupos huehue y dimidiata (tabla 3).

Las curvas de rarefacción de la figura 6 muestran que de los tres índices de diversidad alfa, el grupo neg.huehue mostró una diferencia a los otros grupos, los cuales tienen líneas de rarefacción similares. Es importante mencionar que las chinches *T. huehuetenanguensis* utilizadas se encontraron muertas en las casas, y al momento de la disección tenían poco contenido estomacal, posiblemente esta variable fue la que llevó a tener diferencias significativas en el índice de Shannon, al tener menor diversidad de especies que conforman la microbiota que los demás grupos. Es posible que haciendo un esfuerzo de muestreo mayor, se puedan coleccionar más triatominos para aumentar las posibilidades de que se encuentren vivos y con más contenido estomacal.

Los resultados para el análisis de componentes principales mostrados en la figura 8, no indica que exista una diferencia entre los grupos, en la figura A se observó un agrupamiento en los grupos neg.hue en la gráfica derecha, los cuales también hubo una diferencia en los índices de diversidad alfa, sin embargo se necesitan un mayor número de especímenes para poder



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

observar de mejor manera esta diferencia, ya que en la figura B no se observan diferencias. La diversidad de las muestras también fue comparada de manera individual como se muestra en el mapa de calor (figura 7), es interesante ver que la mayor diferencia se encuentra entre los triatomos de la especie *T. huehuetenanguensis*, lo cual podría ser que la diversidad es muy variable en esta especie, sin embargo, como se mencionó anteriormente, es necesario realizar un mayor esfuerzo de muestreo.

El gráfico NMDS de la figura 9 no muestra diferencias en la diversidad de las especies intergrupales o intragrupalas, por lo cual se podría decir que la distribución taxonómica de las especies es similar en todos los grupos, como también se observa en la tabla 5 y 6, en los análisis de Adonis y Anosim, no hay diferencia significativa al obtener un valor de $p > 0.05$, lo cual refuerza que no hay diferencias que se consideren significativas entre grupos en cuanto a diversidad de especies en los índices de diversidad beta utilizados para evaluar la distribución taxonómica bacteriana.

En este estudio se determinaron los biomarcadores microbianos de *T. huehuetenanguensis* y de *T. dimidiata* por medio del análisis discriminante lineal de la Figura 10, el biomarcador más específico para *T. huehuetenanguensis* fue el género *Enterobacter*, mientras que para *T. dimidiata* fue la especie *Akkermansia muciniphila*, los cuales se visualizan en el cladograma de la figura 11. En el estudio realizado por Melgar, et. al. 2023, encontraron la familia Enterobacteriaceae dentro del grupo de familias más abundantes en los especímenes infectados por *T. cruzi*, por otro lado, en un estudio realizado por Polonio et al., 2021, también encontraron en especímenes no infectados por *T. cruzi* las familias Bacillaceae, Comamonadaceae, Flavobacteriaceae, Enterobacteriaceae, Moraxellaceae y Staphylococcaceae. Dicho género podría ser un taxón con potencial paratransgénico en Guatemala para la especie *T. huehuetenanguensis*. Para la especie *T. dimidiata*, el biomarcador *Akkermansia muciniphila*, únicamente ha sido encontrado por el momento en ratones infectados con *T. cruzi* en un estudio realizado por Castaneda, et. al., 2023. Este es un resultado interesante, ya que a pesar de ser la misma especie del estudio realizado por



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

Sergio, et. al, 2023, el biomarcador es distinto, esto podría estar influenciado por la distribución geográfica del vector.

La especie *T. huehuetenanguensis* ha sido recientemente reportada en el año 2019 (Lima-Cordón et al., 2019). Previamente, en el departamento de Huehuetenango solamente se reportaba al vector *T. dimidiata* que es el que predomina a nivel nacional y Centroamericano (Dorn et al., 2007), sin embargo, ha comenzado a infestar áreas domésticas y peridomésticas, lo cual puede deberse a la pérdida de cobertura forestal debido a la colonización.

En una investigación realizada en Chiapas, México (Espinoza-González et al., 2022), encontraron algunos especímenes en áreas domésticas y peri domésticas en casas cercanas a las áreas selváticas, sin embargo, los triatominos que se encontraron fueron negativos a *T. cruzi*. Es importante recalcar que este es el primer reporte de *T. huehuetenanguensis* en el área e indican que ha sido un área selvática y recientemente ha sido colonizada por humanos. También se ha realizado el primer reporte de *T. huehuetenanguensis* en Belice (Gunter, et. al., 2024), en donde no solamente se encontró esta especie en un área doméstica, sino que está asociado a un caso agudo para la enfermedad en un paciente.

Es importante mencionar que es necesario hacer esfuerzos de conservación de áreas verdes, porque al ser colonizadas por poblaciones humanas, estos insectos se van a ir trasladando hacia las viviendas de las personas, como es el caso de la especie *T. huehuetenanguensis*, por tal razón, se recomienda una vigilancia permanente de esta especie en áreas donde se ha reportado su presencia, especialmente, en las áreas donde se han encontrado reportes de casos de la enfermedad en humanos. También es importante seguir con los esfuerzos de control de vectores, entre ellos la paratransgénesis, ya que estos estudios pueden ser de utilidad para manejar nuevas estrategias de control vectorial, en la que las poblaciones de estas chinches puedan tener menor carga parasitaria por *T. cruzi*, y por consiguiente, menos eficacia en la transmisión de la enfermedad.



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

10. Propiedad intelectual

No aplica.

11. Beneficiarios directos e indirectos

Tabla 2. Beneficiarios directos e indirectos de la investigación

Resultados, productos o hallazgos	Beneficiarios directos (institución, organización, sector académico o tipo de personas)	Número de beneficiarios directos	Beneficiarios indirectos
Diversidad bacteriana de la microbiota aislada de <i>T. huehuetenanguensis</i> .	Comunidad Académica, Sector de Salud Pública e Investigadores Nacionales e Internacionales	Variable.	Personas que habitan en áreas endémicas del vector, como Petén, Huehuetenango y sureste de México.
Línea de partida importante para comprender la paratransgénesis en <i>T. huehuetenanguensis</i> .	Comunidad Académica, Sector de Salud Pública e Investigadores Nacionales e Internacionales	Variable.	Personas que habitan en áreas endémicas del vector, como Petén, Huehuetenango y sureste de México.

Informe final de Proyecto de Investigación 2024

12. Estrategia de divulgación y difusión de los resultados.

Tabla 3

	Sí	No
Presentación TV	X	
Entrevistas radiales	X	
Podcast		X
Entrevista DIGI	X	
Recursos audiovisuales		X
Congresos científicos nacionales o internacionales		X
Talleres		X
Publicación de libro		X
Publicación de artículo científico		X
Divulgación por redes sociales institucionales	X	
Presentación pública		X
Presentación autoridades USAC	X	
Presentación a beneficiarios directos		X
Entrega de resultados	X	
Docencia en grado	X	
Docencia postgrado		X



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

	Sí	No
Póster científico		X
Trifoliales		X
Conferencias		X
Otro (describa)		X

13. Contribución a las Prioridades Nacionales de Desarrollo (PND)

La contribución del proyecto dentro de las Prioridades Nacionales de Desarrollo, se vinculan específicamente a la sección de “Acceso a servicios de salud”, de modo que la investigación generada en este estudio contribuye al fin de las enfermedades tropicales desatendidas, tal es el caso de la enfermedad de Chagas. Debido a que las PND también incluye a los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), se contribuye al objetivo 3 de ODS, salud y bienestar, ya que al conocer la diversidad bacteriana de *T. huehuetenanguensis*, se pueden determinar los biomarcadores bacterianos a su microbiota intestinal. Esta información, permitirá conocer más sobre la relación patógeno huésped y sobre la epidemiología y ecología de la enfermedad de Chagas, dicho conocimiento podría contribuir en la toma de decisiones del control vectorial de *T. huehuetenanguensis* en el occidente y norte del país donde se ha reportado este nuevo vector.

El acceso a servicios de salud, también implica la cobertura sanitaria universal, particularmente la protección contra los riesgos financieros de salud. Al ser la enfermedad de Chagas un problema de salud pública en Guatemala que genera patologías cardíacas costosas de tratar (como la colocación de marcapasos), las estrategias de prevención y control vectorial juegan un papel importante en la reducción de la transmisión de la enfermedad. Por lo que este estudio contribuye a tener una línea base con potencial paratransgénico conociendo la diversidad bacteriana del vector.



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

14. Contribución al desarrollo de iniciativas de ley

No aplica.

15. Vinculación

El proyecto de investigación contó con la vinculación local de la Dirección de Área de Salud de Huehuetenango, quienes proveyeron la orientación del programa de vectores del área, para referir los reportes de casos de avistamiento de *T. huehuetenanguensis*, y en el transporte de algunas de las muestras. También se hizo la vinculación con el Centro de Geociencias (CGEO) de la Universidad Nacional Autónoma de México, campus Juriquilla, quienes proveyeron asesoría científica en el análisis bioinformático e interpretación de resultados.

16. Conclusiones

La microbiota bacteriana intestinal de *T. huehuetenanguensis* y *T. dimidiata* está compuesta principalmente por los filos Actinobacteria, Bacteroidota, Firmicutes, Patescibacteria y Proteobacteria y los géneros: *Serratia*, *Corynebacterium* y *Staphylococcus*, los cuales han sido reportados en otros estudios, incluyendo el estudio realizado por Melgar, et. al, 2023, que fue realizado con *T. dimidiata* en otra localidad del país.

La diversidad de la microbiota intestinal de los especímenes de *T. huehuetenanguensis* se estableció sin discriminar la infección por *T. cruzi*, dadas las circunstancias de los triatomos colectados.

En cuanto a la distribución taxonómica de especies, los índices Chao1 y OTUS observados fueron presentaron una diferencia significativa, el índice de Shannon mostró que no había diferencia significativa entre grupos, lo cual indica que, aunque difiera en el número de especies, no hay diferencia significativa en cuanto a la diversidad de estas.



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

Los biomarcadores encontrados para la especie *T. huehuetenanguensis* fue el género *Enterobacter*, mientras que para la especie fue la especie *Akkermansia muciniphila*, estos han sido reportados en otros estudios, por lo cual se clasifican como taxones con potencial paratransgénico.

Se identificó una especie con potencial paratransgénico únicamente en *T. dimidiata*, más en *T. huehuetenanguensis* no se pudo encontrar, únicamente se identificó uno a nivel de género.

Debido a los últimos reportes de *T. huehuetenanguensis* en Guatemala, México y Belice, incluyendo en este último, un caso agudo para la enfermedad, es necesario que esta especie que va colonizando poco a poco del área selvática a las áreas domésticas, pueda ser controlada a tiempo antes que se pueda convertir en un vector principal para la enfermedad junto a *T. dimidiata*.

17. Recomendaciones

Se recomienda realizar en futuros estudios, una comparación entre chinches tomadas en campo y chinches crecidas en laboratorio, para comparar cómo difiere la abundancia de la microbiota en ambos casos.

Colectar muestras vivas en el área de Huehuetenango para tener muestras frescas de la microbiota.

Comparar la diversidad de la microbiota entre las dos especies, *T. huehuetenanguensis* y *T. dimidiata* en Huehuetenango y en otras regiones para estudiar la distribución de la diversidad de la microbiota entre especies de vector y entre sitios de colecta.

Se recomienda realizar estudios de paratransgénesis con el género *Enterobacter*, y la especie *Akkermansia muciniphila*, para crear propuestas de control de los vectores de estudio en el país.



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

18. Referencias

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 review of entomology*, 47, 123–141. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.47.091201.145144>

Bonney, K. (2014) Chagas disease in the 21st Century: a public health success or an emerging threat? *Parasite* 21(11), doi: 10.1051/parasite/2014012.

Castaneda S, Munoz M, Hotez PJ, Bottazzi ME, Paniz-Mondolf AE, Jones KM, Ramirez JD (2023) Microbiome alterations driven by *Trypanosoma cruzi* infection in two disjunctive murine models. *Microbiol Spectr* 11(3):e0019923. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00199-23>

Castillo, M. (2017). Chagas disease in non-endemic countries Globalization. *The Lancet Global Health* 5(4): 379-380

Centers for Disease Control and Prevention -CDC- (2021), Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease). Recover from: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/>

Chávez, E. (2015). Análisis de Chagas Guatemala. Ministerio de Salud pública y asistencia social Guatemala. Recuperado de: <http://epidemiologia.mspas.gob.gt/files/Publicaciones%202016/Salas%20Situacionales/An%C3%A1lisis%20de%20Chagas%202015>

Clear, R., Dumonteil, E., Herrera, C. (2025). Decoding Chagas Disease: What Next-Generation Sequencing Has Taught Us. In: Ramírez González, J.D. (eds) *Recent*



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

Advances in Parasitomics. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-70591-5_3

- Deng, C., Daley, T., & Smith, A. (2015). Applications of species accumulation curves in large-scale biological data analysis. *Quantitative Biology*, 3(3), 135-144. <https://doi.org/10.1007/s40484-015-0049-7>
- 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>.
- Díaz, S., Villavicencio, B., Correia, N., Costa, J., & Haag, K. L. (2016). Triatomine bugs, their microbiota and *Trypanosoma cruzi*: asymmetric responses of bacteria to an infected blood meal. *Parasites & vectors*, 9, 1-11. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1926-2>
- Dorn, P. L., Monroy, C., & Curtis, A. (2007). *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811): A review of its diversity across its geographic range and the relationship among populations. *Infection, Genetics and Evolution*, 7(2), 343-352. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2006.10.001>



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

- Durvasula, R. V., Gumbs, A., Panackal, A., Kruglov, O., Aksoy, S., Merrifield, R. B., Richards, F. F., & Beard, C. B. (1997). Prevention of insect-borne disease: an approach using transgenic symbiotic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(7), 3274–3278. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.7.3274>.
- Espinosa-González, C., Dávalos-Becerril, E., Correa-Morales, F., González-Acosta, C., López-Bello, R., Alvarado-Estrada, J. M., Esquinca-Calvo, L., García-Gutiérrez, L., Gómez-Maldonado, C., Cuevas-González, E., Reyes-Figueroa, C. & Moreno-García, M. (2022). New records of *Triatoma huehuetenanguensis* in an urban area of Southwest Mexico. *Journal of Vector Borne Diseases*, 59(1), 86-90. <https://doi.org/10.4103/0972-9062.331410>
- 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>.
- Gascon, J., Bern, C. & Pinazo, M. (2010). Chagas disease in Spain, the United States, and other non-endemic countries. *Acta tropica* 115: 22-27



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

Guhl, F., (2009). Enfermedad de Chagas: Realidad y perspectivas. *Revista Biomedica* 20, 228–234.

Gumiel, M., da Mota, F. F., Rizzo, V., Sarquis, O., de Castro, D. P., Lima, M. M., Garcia, E., Carels, N., & 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, 245. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0836-z>.

Gunter, S.M., Nelson, A., Kneubehl, A.R. et al. (2024) Novel species of *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae) identified in a case of vectorial transmission of Chagas disease in northern Belize. *Sci Rep* 14, 1412. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-50109-0>

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>.

Hotez, P. J., Woc-Colburn, L., & Bottazzi, M. E. (2014). Neglected tropical diseases in Central America and Panama: Review of their prevalence, populations at risk and impact on regional development. *International Journal for Parasitology*, 44(9), 597–603. doi:10.1016/j.ijpara.2014.04.001



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

- 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), 1334–1344. <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>.
- Jiménez-Cortés, J. G., García-Contreras, R., Bucio-Torres, M. I., Cabrera-Bravo, M., López-Jácome, L. E., Franco-Cendejas, R., ... Salazar-Schettino, P. M. (2020). Bacteria cultured from the gut of *Meccus pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae), a triatomine species endemic to Mexico. *Medical and Veterinary Entomology*, 35(3), 478–483. <https://doi.org/10.1111/mve.12496>
- Justi, S., Cahan, S., Stevens, L., Monroy, C., Lima-Cordon, R., Dorn, P.L. (2018). Vectors of diversity: Genome wide diversity across the geographic range of the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata* sensu lato (Hemiptera: Reduviidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 120: 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.12.016>
- Kieran, T., Arnold, K., Thomas, J., Varian, C., Saldaña, A., Calzada, J., Glenn, T. & Gottdenker, N. (2019). Regional biogeography of microbiota composition in the Chagas disease vector *Rhodnius pallescens*. *Parasites & vectors*, 12(504), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3761-8>
- Lee, B., Bacon, K., Bottazzi, M., Hotez, P. (2013). Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *The Lancet Infectious Diseases* 13(4):342-348. [doi:10.1016/S1473-3099\(13\)70002-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70002-1)



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

Lent, H. & Wygodzinsky, P. (1979). Revision of the Triatiminae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 163: 520 pp.

Lima-Cordón, R., Monroy, M., Stevens, L., Rodas, A., Rodas, G.A., Dorn, P.L., Justi, S.A. (2019) Description of *Triatoma huehuetenanguensis* sp. n., a potential Chagas disease vector (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *ZooKeys*, 820: 51-70. <https://doi.org/10.3897/zookeys.820.27258>

Lopez-Ordóñez, T., Flores-López, C. A., Montejó-Lopez, R., Cruz-Hernandez, A., & Connors, 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>.

Melgar, S., López, F., Carías, C., Morales, A. (2023). Caracterización de la microbiota intestinal de *Triatoma dimidiata* infectadas con *Trypanosoma cruzi* en Guatemala. Informe final. [Archivo PDF]. <https://digi.usac.edu.gt/bvirtual/informes/puiis/INF-2023-11.pdf>

Michel-Parra, J., Martínez-Ibarra, J., Montañez-Valdez, O., y Noguera-Torres, B. (2021). Life cycle of *Triatoma huehuetenanguensis* Lima-Cordón, Monroy, Stevens, Rodas, Rodas, Dorn, Justi 2019 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from Mexico. *Journal of Vector Ecology* 46(1), 57-64. <https://doi.org/10.52707/1081-1710-46.1.57>

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2020). Chagas disease (also known as American trypanosomiasis). Recuperado de: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

Orantes, L. C., Monroy, C., Dorn, P. L., Stevens, L., Rizzo, D. M., Morrissey, L., Hanley, J. P., Rodas, A. G., Richards, B., Wallin, K. F., & 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>.

Perreira, M., Donnes, W., Morillo, C., Encina, J. & Ribeiro, A. (2013) Chagas Disease: An Overview of Clinical and Epidemiological Aspects. *Journal of the American College of Cardiology* 62(9): 767-776

Peterson, J., Hashimoto, K., Yoshioka, K. et al. (2019) Chagas Disease in Central America: Recent Findings and Current Challenges in Vector Ecology and Control. *Current Tropical Medicine Reports* 6: 76–91. <https://doi.org/10.1007/s40475-019-00175-0>

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> .

Prata, A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Infectious diseases* 1: 92-100

Rassi, A., Rassi, A & Marin-Neto, J. (2010). Chagas disease. *Lancet* 375: 1388-1402

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>



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

- 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>.
- Ryckman, R. E., y Blankenship, C. M. (1984). The Triatominae and Triatominae-borne Trypanosomes of North and Central America and the West Indies, a bibliography with index. *Bull. Soc. Vector Ecol.* 9, 112–430.
- Sasawaga, et al. (2014) Acute Chagas disease in El Salvador 2000-2012- Need for surveillance and control. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 109(2): 256-258.
- Schofield CJ 1994. Triatominae: Biología y Control. Eurocommunica Publications, W Sussex, 80 pp.
- Steverding, D. (2014). The history of Chagas disease. *Parasites & vectors*, 7(1), 1-8. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-317>.
- Villacís, J. F., López-Rosero, A., Bustillos, J. J., Cadena, M., Yumiseva, C. A., Grijalva, M. J., & Villacís, A. G. (2024). Bacterial microbiota from the gut of *Rhodnius ecuadoriensis*, a vector of Chagas disease in Ecuador's Central Coast and Southern Andes. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1464720. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1464720>
- Villalta, F & Girish, R. (2019) Advances in preclinical approaches to Chagas disease drug discovery, *Expert Opinion on Drug Discovery*, 14:11, 1161-1174, DOI: 10.1080/1

Informe final de Proyecto de Investigación 2024

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>

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.

19. Apéndice

Apéndice 1. Extracción y purificación de ADN de *Triatoma huehuetenanguensis* llevado a cabo en el laboratorio del LENAP, Escuela de Biología, USAC.





Informe final de Proyecto de Investigación 2024

20. 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, dejo constancia que el personal contratado para el proyecto de investigación que coordino ha cumplido a satisfacción con la entrega de informes individuales por lo que es procedente hacer efectivo el pago correspondiente.

<p>PhD. Sergio Alejandro Melgar Valladares Vo.Bo. Coordinador del proyecto de investigación</p>	<p>Firma</p>
<p>Fecha: 28/02/2025</p>	

Aval del director (a) del instituto, centro, unidad 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 otorgó el aval al presente informe final de las actividades realizadas en el proyecto (Caracterización de la microbiota intestinal del nuevo vector de la enfermedad de Chagas, *Triatoma huehuetenanguensis* infectadas con *Trypanosoma cruzi*) en mi calidad de (directora del instituto), mismo que ha sido revisado y cumple su ejecución de acuerdo a lo planificado.

<p>Dra. María Eunice Enríquez Cottón Vo.Bo. Directora de IIQB</p>	<p>Firma</p>
<p>Fecha: 28/02/2025</p>	



Informe final de Proyecto de Investigación 2024

Aprobación de la Dirección General de Investigación

<p>Vo.Bo. M.A. Sucelly Orozco de Morales Coordinadora del programa universitario de investigación interdisciplinaria en salud (PUIIS)</p>	<p>Firma</p>
<p>Fecha: 28/02/2025</p>	
<p>Vo.Bo. Coordinador General de Programas</p>	<p>Firma</p>
<p>Fecha: 28/02/2025</p>	

/Digi2024