

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



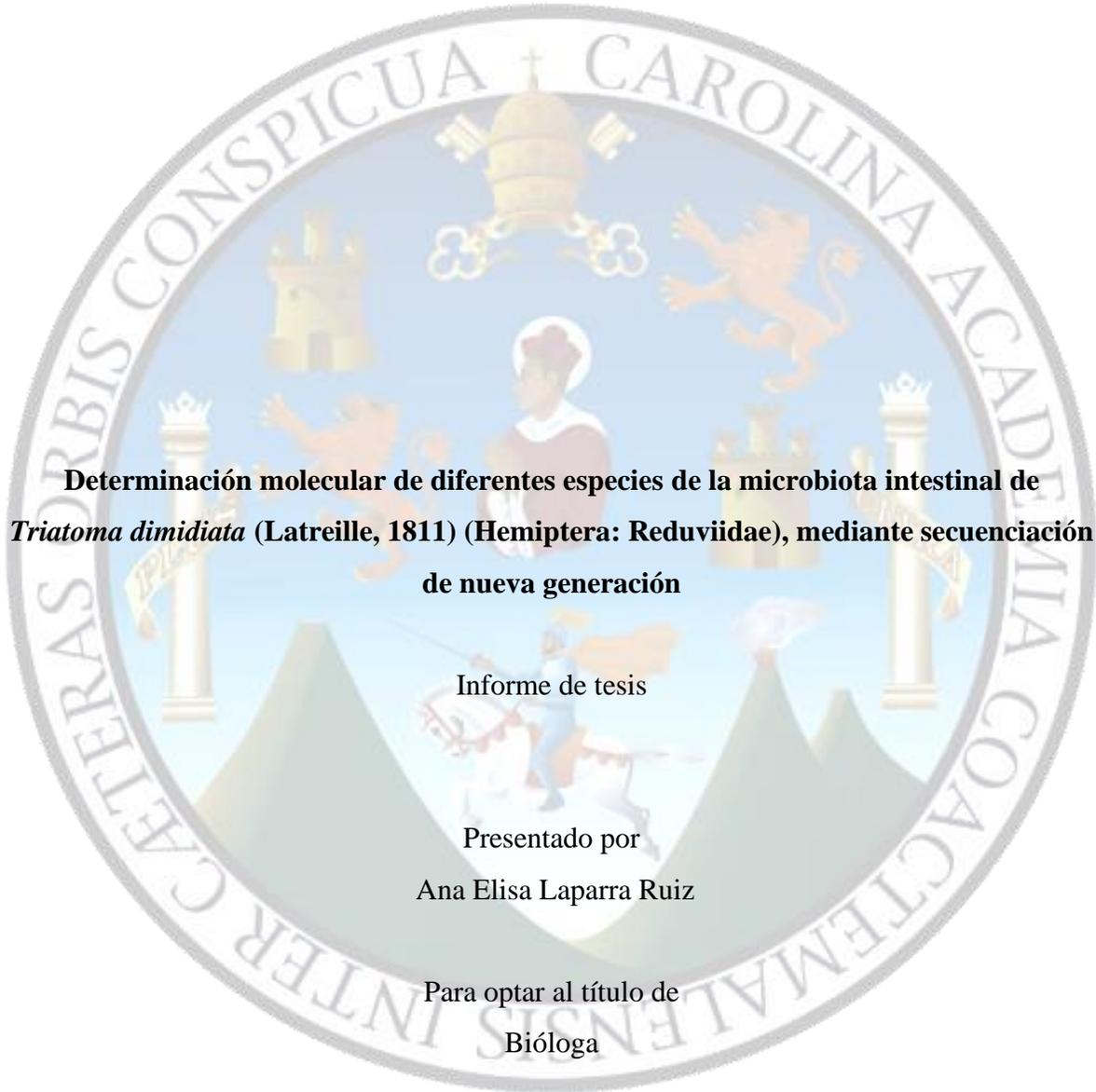
**Determinación molecular de diferentes especies de la microbiota intestinal de  
*Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) (Hemiptera: Reduviidae), mediante secuenciación  
de nueva generación**

Ana Elisa Laparra Ruiz

Bióloga

Guatemala, septiembre de 2019

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



**Determinación molecular de diferentes especies de la microbiota intestinal de  
*Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) (Hemiptera: Reduviidae), mediante secuenciación  
de nueva generación**

Informe de tesis

Presentado por  
Ana Elisa Laparra Ruiz

Para optar al título de  
Bióloga

Guatemala, septiembre de 2019

## JUNTA DIRECTIVA

M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto	Decano
Licda. Miriam Roxana Marroquín Leiva	Secretaria
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal I
Dr. Roberto Enrique Flores Arzú	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Byron Enrique Pérez Díaz	Vocal IV
Br. Pamela Carolina Ortega Jiménez	Vocal V

## **Dedicatoria**

A mis padres: Por creer en mí y apoyarme hasta en mis sueños más locos, por dejarme partir de casa para perseguir los deseos de mi corazón, por ser mi motivación día a día, por su sacrificio, lucha y apoyo durante todo este proceso, por ser el mejor ejemplo de dedicación y superación. Estoy eternamente agradecida por el amor que nunca me ha faltado y la paciencia que han tenido. Finalmente hemos terminado esto juntos

A mi hermana: Porque a pesar de las constantes peleas, siempre fue más fuerte el cariño que nos mantuvo unidas. Aunque tenemos grandes diferencias, aprendimos a encontrar la manera de demostrarnos nuestro amor. Porque la fe que tuviste en mí, fue un motivo para poder decir que lo he logrado.

A mi abuelito Aureliano: Por asombrarnos con los paisajes, árboles, animales y documentales que vimos juntos. Me enseñaste a que no hay edad para dejar de amar la naturaleza y estar agradecida con ella. Te extraño mucho.

A mi USAC: Por llenarme de retos y sueños. Por poder estar en las aulas donde crecí profesionalmente y brindarme catedráticos buenos y no tan buenos, por enseñarme a valorar las oportunidades. Por permitirme enamorarme aun más de la biología.

A LENAP: Por permitirme acercarme más a la realidad guatemalteca, por enseñarme a luchar por la gente que más lo necesita, por dejarme experimentar con los reactivos del laboratorio, por darme buenos amigos y por los conocimientos adquiridos.

A mis amigos de promoción: Vale, Lula, Mynor, Checha, Cristian, Julito, Gerber y Gaitán, por todos los momentos inolvidables durante la carrera, por las alegrías durante las giras de campo, pero también por las preocupaciones durante los exámenes y las celebraciones después de las clases, porque sin duda alguna cada uno me enseñó diferentes maneras de ver la vida. Especialmente a Vale, por ser mi amiga de prácticas, trabajos y laboratorios, por tratar de despertarme cada vez que ya no quería estudiar, por emocionarnos cada vez que veíamos al microscopio. Por su paciencia al trabajar y por prestarnos sus apuntes del cuaderno para estudiar.

A la vida: Por despertarme la curiosidad de estudiarla, porque no hay día que no me deje de asombrar con sus colores, formas, tamaños. No tengo la menor duda que escogí la mejor carrera, que me ha permitido ver todo desde otra perspectiva y sorprenderme por lo que no conocía.

A mi país: Diverso biológica y culturalmente, pero golpeado, herido y fragmentado. Deseo algún día verte diferente.

A amigos y familiares: Por su cariño y preguntarme constantemente ¿y cómo va la tesis? Finalmente la estoy presentando.

## **Agradecimientos**

A la Doctora Carlota Monroy y Licenciada Antonieta Rodas

Por su confianza, cariño, sabiduría y por creer en mi profesionalmente. Mas que mis mentoras, son mis amigas.

A Elizabeth Solórzano, José Pineda y Daniel Penados

Por siempre darme ánimos durante este proceso, por su preocupación y por ayudarme a buscar soluciones cuando no encontraba la manera de seguir adelante.

A Karen, Mey y el equipo de trabajo de LENAP

Por permitirme compartir aventuras durante las giras de campo y el trabajo en el laboratorio.

A mi asesor Sergio Melgar y revisor Enio Cano

Por su guía y dedicación durante la elaboración de este trabajo.

A la Universidad de Loyola y Universidad de Vermont

Por permitirme el uso de los datos de la Secuenciación y brindarme apoyo durante el desarrollo del trabajo.

A la Unidad de Química Computacional

Por permitirme el uso del equipo para el análisis de los datos.

## ÍNDICE

1.	RESUMEN.....	1
2.	INTRODUCCIÓN.....	2
3.	ANTECEDENTES.....	4
2.1	Enfermedad de Chagas.....	4
2.2	<i>Trypanosoma cruzi</i> .....	5
2.2.1	Generalidades.....	5
2.2.2	Ciclo de vida.....	5
2.3	<i>Triatoma dimidiata</i> .....	6
2.3.1	Generalidades.....	6
2.3.2	Morfología.....	6
2.3.3	Ecología.....	7
2.4	Microbiota intestinal.....	8
2.4.1	Componentes de la microbiota intestinal.....	8
2.4.2	Microbiota e insectos vectores.....	8
2.4.3	Microbiota y triatominos.....	8
2.5	Genotipificación por secuenciación.....	9
4.	JUSTIFICACIÓN.....	10
5.	OBJETIVOS.....	12
4.1	General.....	12
4.2	Específicos.....	12
6.	HIPÓTESIS.....	12
7.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
6.1	Universo.....	13
6.2	Materiales.....	13
6.2.1	Colecta.....	13
6.3	Métodos.....	13
6.3.1	Extracción y secuenciación ADN.....	13
6.3.2	Obtención de genomas de referencia.....	14
6.3.3	Análisis bioinformáticos.....	14
6.3.4	Análisis estadísticos.....	16
7.	RESULTADOS.....	16

7.1	Listado de especies.....	16
7.2	Relación <i>T. cruzi</i> .....	18
7.3	Tasa de infección.....	18
8.	DISCUSIÓN.....	20
9.	CONCLUSIONES.....	24
10.	RECOMENDACIONES .....	24
11.	REFERENCIAS .....	25
12.	ANEXOS.....	34

## 1. RESUMEN

La enfermedad de Chagas, es una enfermedad potencialmente mortal que afecta órganos vitales, en especial el corazón y el tracto digestivo. Se estima que alrededor de 7 millones de personas están infectadas en todo el mundo, principalmente en Latinoamérica, donde la enfermedad es endémica. Es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* (Trypanosomatida: Trypanosomatidae) y transmitida por el contacto con heces de las chinches triatominas pertenecientes a la subfamilia Triatominae, que viven en grietas o hendiduras de paredes o techos de casas construidas con material orgánico. La principal estrategia de control de esta enfermedad en Guatemala, es el control del vector, a través de vigilancia entomológica y el mejoramiento de la vivienda. Se ha determinado que el reconocimiento de la composición de especies de la microbiota intestinal podría contribuir al control biológico de estos insectos. Es por ello que el objetivo de este estudio fue determinar la presencia de especies de nemátodos y protozoos que forman parte de la microbiota intestinal de *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) a través de análisis bioinformáticos de secuencias de 60 especímenes de El Carrizal, Agua Blanca, Jutiapa, previamente obtenidas por genotipificación por secuenciación. Utilizando el Software Kraken, se determinaron 9 especies de nemátodos y 3 de protozoos, de los cuales muchos se encuentran asociados a ser patógenos del ser humano y otros mamíferos domésticos y salvajes. Se determinó la presencia de 2 especies que son entomopatógenas de insectos y que podría utilizarse en control biológico. Asimismo se determinó que existe una relación entre *T. cruzi* y las especies de nemátodos *Angiostrongylus costaricensis* (Strongylida: Angiostrongylidae), *Heligmosomoides bakeri* (Strongylida: Trychostrongylidae) y *Haemonchus contortus* (Strongylida: Trychostrongylidae). Estos hallazgos indican la importancia de seguir investigando sobre las especies que componen la microbiota intestinal de *T. dimidiata* y cómo estas pueden influir en la capacidad vectorial de insectos.

## 2. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana, es una enfermedad potencialmente mortal, que a menudo conduce a lesiones muy debilitantes en órganos vitales, especialmente el corazón y tracto intestinal (Schofield, 1994, p.7; Ramsey, Alvear, Ordoñez, Muñoz, García, López y Leyva, 2005, p. 220; Tarleton, 2011, p.34). Se estima que de 6 a 7 millones de personas están infectadas en todo el mundo, principalmente en Latinoamérica, donde la enfermedad es endémica (World Health Organization, 2017; Díaz, Villavicencio, Correia, Costa y Haag, 2016, p. 636).

Es causada por el parásito protozooario *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 y transmitida por el contacto con las heces de chinches triatominas de hábito hematófago, que viven en grietas o hendiduras de paredes o techos de casas construidas con material orgánico, adobe, lodo, entre otros, en zonas rurales de Latinoamérica (Schofield, 1994, p.5; World Health Organization, 2015).

En Guatemala el principal vector de la enfermedad de Chagas es la especie *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) conocido tradicionalmente como chinche picuda. Este insecto se encuentra distribuido en México, Centroamérica y Suramérica (Guhl, 2009, p. 229). En Guatemala se encuentra en 21 departamentos del país a excepción de Totonicapán (Organización Panamericana de la Salud, 2012).

La principal estrategia de control de esta enfermedad en Guatemala se ha centrado en el control del vector, a través de vigilancia entomológica y el mejoramiento de la vivienda (Organización Panamericana de la Salud, 2012). Sin embargo, Engel y Moran (2003, p. 699), Chanbusarakum y Ullman (2008, p. 318), Cirimotich, Ramírez, y Dimopoulos, (2011, p. 307), mencionan que se podría contribuir al control biológico de insectos transmisores de enfermedades a través del reconocimiento de la composición de las especies de la microbiota intestinal y su función en el insecto transmisor.

En este sentido se han realizado algunos estudios con algunos entomopatógenos como hongos y bacterias en los cuales se ha demostrado que algunas especies influyen en la

ausencia de *T. cruzi*. Sin embargo, es importante determinar qué otras especies de simbioses como nemátodos y protozoos, se encuentran dentro del tracto intestinal de *T. dimidiata* para poder evaluar posteriormente el rol que cumplen estos organismos en el vector. Es por ello que con esta investigación se determinará la presencia de especies de nemátodos y protozoos que forman parte de la microbiota intestinal de *T. dimidiata* a través de análisis bioinformáticos de secuencias de especímenes previamente obtenidas por genotipificación por secuenciación.

### 3. ANTECEDENTES

#### 2.1 Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*, es una de las enfermedades parasitarias más graves de Latinoamérica, que presenta un impacto social y económico superior a los efectos combinados de otras enfermedades parasitarias como la malaria, leishmaniasis y esquistosomiasis (Chagas, 1909, pp. 159-161; Dias y Schofield, 1999, p. 103; World Health Organization, 1991). Esta enfermedad puede ser transmitida por varios mecanismos, sin embargo, la transmisión del parásito *T. cruzi* a través de las heces u orina de insectos triatominos, es numéricamente la más importante, que en general está representada por más del 80% de todos los casos de transmisión de *T. cruzi* a humanos (Dias y Schofield, 1999, p. 103). Otras vías de transmisión menos frecuentes son a través de transfusiones sanguíneas, trasplante de órganos, congénitamente, (de madre a hija) o a través de la ingestión de alimentos o líquidos contaminados (WHO, 2017; Benchimol, 2006, pp. 132-133; Stevens, Dorn, Schmidt, Klotz, Lucero y Klotz, 2011, p. 171).

Esta enfermedad potencialmente mortal, a menudo se manifiesta en complicaciones cardíacas o gastrointestinales, causando arritmias, aneurisma apical, insuficiencia cardíaca congestiva, tromboembolismo y muerte súbita en la debilitación cardíaca o enfermedades intestinales (Ramsey *et al.*, 2005, p. 219; Tarleton, 2011, p. 507). Es probable que en la mayoría de casos la infección por *T. cruzi* inicie con un número relativamente pequeño de parásitos (menos de cien), que crece rápidamente por todo el hospedador (Tarleton, 2011, p. 506).

Se calcula que en el mundo hay más de 8 millones personas infectadas por el parásito (WHO, 2017). Esta enfermedad se encuentra sobre todo en zonas endémicas de 21 países de Latinoamérica (WHO, 2017).

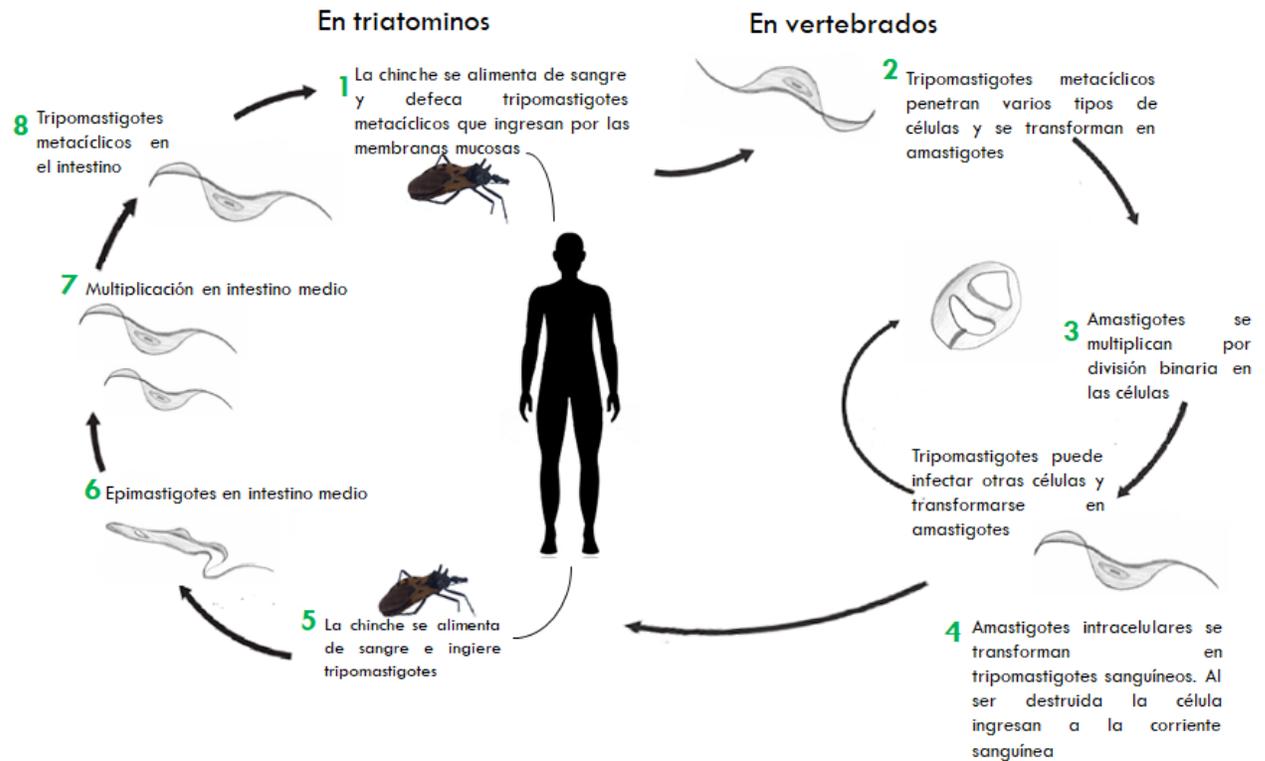
## 2.2 *Trypanosoma cruzi*

### 2.2.1 Generalidades

*Trypanosoma cruzi* es un protozoo parásito perteneciente a la familia Trypanosomatidae y al filo Kinetoplastida (Miles, 2017, p. 1065). Los kinetoplastidos se caracterizan por tener una única mitocondria alargada y el ADN mitocondrial contenido en una estructura denominada cinetoplasto (Brusca y Brusca, 2003, p. 133; Miles, 2017, p. 1065).

### 2.2.2 Ciclo de vida

El ciclo de vida de este parásito se caracteriza por tener transformaciones morfológicas que incluyen el cambio de la ubicación del cinetoplasto en relación con el núcleo y por involucrar huéspedes vertebrados e invertebrados (Brener, 1973, pp. 348-356; Capinera, 2008, p. 821). El huésped vertebrado se infecta cuando las heces de insectos triatominos contaminadas por la fase más infectiva del parásito, denominada tripomastigote metacíclico, ingresan por las membranas mucosas o heridas en la piel (Bonaldo, Souto-Padron, de Souza y Goldenberg, 1988, p. 1349; Brener, 1973, p. 348). El parásito llega hasta las células del huésped en donde se diferencian en amastigotes, que comienzan a dividirse por fisión binaria (Brener, 1973, p. 348; De Souza, 1984, pp. 202-203; Tyler y Engman, 2011, p. 472). Posteriormente se transforman en tripomastigotes no divisores que salen de los tejidos parasitados hacia el torrente sanguíneo, allí circulan por un periodo variable antes de penetrar en las células y reanudar el ciclo (Brener, 1973, p. 348; Tarleton, 2011, p. 506; Miles, 2017, p. 1065). Los tripomastigotes en la sangre son polimórficos, formados por formas esbeltas y anchas y la cantidad relativa de estas formas, varía según la cepa del parásito (Brener, 1969, pp. 350-351). Alternativamente pueden ser ingeridos del torrente sanguíneo por un triatomo que se alimenta de la sangre del vertebrado, en este caso los tripomastigotes se transforman en epimastigotes que se multiplican abundantemente en el intestino medio del triatomo infectado (Brener, 1973, p. 356; Bonaldo, *et al.*, 1988, p. 1349). Finalmente, en el recto una cierta proporción de los epimastigotes se diferencia en tripomastigotes metacíclicos infecciosos, iniciando nuevamente el ciclo (Andrews, Hong, Robbins, y Nussenzweig, 1987, p. 474; Dias, 1934, p. 33).



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Fuente: elaboración propia.

## 2.3 *Triatoma dimidiata*

### 2.3.1 Generalidades

*T. dimidiata* pertenece a los insectos hemípteros de la subfamilia Triatominae, familia Reduviidae, conocidos comúnmente como chinches picudas, caracterizados por ser insectos con hábito hematófago y vectores del parásito *T. cruzi* (Schofield, 1994, p. 24; Carcavallo, Jurberg, Lent, Noireau y Galvao, 2000, pp. 23-24).

### 2.3.2 Morfología

*T. dimidiata* presenta una coloración distintiva en el cuerpo que va de café oscuro a negro en el pronoto y escutelo y en el dorso del abdomen de anaranjado a amarillo pálido con barras laterales de color negro (Lent y Wygodzinsky, 1979, pp. 223-225). El macho puede medir entre 24.5 a 32.0 mm, y la hembra de 24.5 a 35.0 mm; ésta diferencia puede deberse a la disposición de alimento y adaptaciones locales al entorno (Lent y Wygodzinsky, 1979, pp.

223-225; Lent y Jurberg, 1985, pp. 285-286). La cabeza es alargada y cilíndrica, y los hemélitros compuestos de dos a tres celdas en la membrana y cruzados en forma plana sobre el dorso (Adarme, 2010, pp. 24-26).

*T. dimidiata* se distribuye desde México y centroamérica, hasta Venezuela, Colombia y el norte de Ecuador y Perú (Capinera, 2008, p. 821; Dorn, Monroy y Curtis, 2007, p. 343), y a lo largo de esta distribución, presenta variedad fenotípica cromática y morfométrica (Solórzano, 2015, p. 12).

### **2.3.3 Ecología**

*T. dimidiata* puede habitar una gran variedad de zonas de vida y ecosistemas que van desde bosques premontanos muy cálidos húmedos y bosques tropicales húmedos en Costa Rica, hasta bosques secos y cálidos en Guatemala y El Salvador (Zeledón, Ugalde, y Paniagua; 2001, p. 671; Monroy, Bustamante, Rodas, Enriquez y Rosales, 2003, p. 800; Dorn, *et al.*, 2015, p. 345). Puede ocupar diferentes ecotopos que incluyen cuevas, rocas, agujeros de árboles y nidos de vertebrados (Parra-Henao, Angulo, Osorio y Jaramillo, 2016, p. 122).

Así también se ha observado que son atraídas por las luces de viviendas humanas, lo que puede explicar las altas tasa de infestación en viviendas cercanas a ambientes silvestres y que generalmente se relacionan a poblaciones de áreas rurales con limitadas condiciones sociales, económicas y educativas (Lent y Wygodzinsky, 1979, p. 225; Stevens *et al.*, 2011, pp. 179-180; Guhl, 2009, p. 232). Las poblaciones de *T. dimidiata* tienden a ser más numerosas en viviendas en donde sus fuentes alimenticias son mayores, sin embargo, otros factores como el tipo de construcción de las viviendas, tipo de techado, la limpieza y organización de las viviendas, influyen en la presencia de estos insectos (Monroy, *et al.*, 2003, pp. 801-802).

Dependiendo de su asociación con viviendas humanas, las poblaciones de estos triatominos se han clasificado en domiciliar, peridomiciliar y poblaciones selváticas (Zeledón, Solano, Zuñiga y Swartzwelder, 1973, p. 369). La presencia de *T. dimidiata* tanto en ambientes selváticos como en ambientes domésticos, les ha permitido alimentarse de diferentes

reservorios selváticos y del ser humano, y esto se ha manifestado en el transporte activo de *T. cruzi*, en ambientes domésticos (Schofield, 1994, pp. 44-45; Stevens *et al.*, 2011, pp. 185-186).

## **2.4 Microbiota intestinal**

### **2.4.1 Componentes de la microbiota intestinal**

La microbiota intestinal se define como la comunidad de microorganismos que viven en el tracto intestinal de un individuo y se encuentra representada por bacterias, arqueas y eucariotas (Gordon, 2012, p. 1251; Douglas, 2015, p. 21).

### **2.4.2 Microbiota e insectos vectores**

El éxito en la diversificación y evolución de los insectos ha dependido en parte a las múltiples relaciones que tienen con microorganismos beneficiosos (Engel y Moran, 2013, p. 699). En insectos, la microbiota puede representar de 1 al 10% de la biomasa (Douglas, 2015, p. 18). Los microorganismos les han permitido mejorar las dietas pobres en nutrientes, digerir componentes alimenticios tales como recalcitrantes, protegerse de depredadores, parásitos y patógenos, contribuir en la comunicación inter e intraespecífica y afectar en la eficiencia como vectores de enfermedades (Engel y Morán, 2013, p. 699).

Los microorganismos que viven en el intestino de insectos vectores tienen una importancia en la modulación de la competencia del vector, que es la capacidad de adquirir, mantener y transmitir patógenos (Lane, 1994, p. 21; Díaz *et al.*, 2016, p. 636).

### **2.4.3 Microbiota y triatominos**

Uno de los ejemplos del uso de simbiosis de insectos para controlar enfermedades transmitidas por vectores fue logrado por Durvasula *et al.*, (1997, p. 3274), con insectos triatominos transmisores de la enfermedad de Chagas.

Debido a que estos triatominos se alimentan durante todo su ciclo de vida de sangre de vertebrados, albergan una gran cantidad de especies de bacterias simbióticas en el intestino, siendo una de ellas *Rhodococcus rhodnii* Goodfellow & Anderson, 1979, que produce

nutrientes como vitaminas, que permiten al insecto compensar su dieta basada en sangre (Ricci, Valzano, Ulissi, Epis, Capelli, y Favia 2012, p. 380). En los estudios de Beard *et al.*, (2002, p. 128), Durvasula, *et al.*, (1997, p. 3274) y Dotson *et al.*, (2003, p. 103-104), se ha demostrado que *R. rhodnii* puede ser transformada con un plásmido, permitiendo utilizar esta técnica para el control vectorial de los triatominos.

Así también, Díaz *et al.*, (2016, p. 636), determinaron ciertas especies de bacterias que componen la microbiota intestinal de 6 diferentes especies de triatominos vectores de la enfermedad y encontraron que bacterias del género *Arsenophonus* Gherna *et al.* 1991 pueden ser transformadas genéticamente para el control de estos insectos. Sin embargo, no se han realizado estudios que indiquen la presencia de especies de protozoos y nemátodos que compongan la microbiota intestinal de los triatominos y si la presencia de estos está relacionada con la presencia de *T. cruzi*.

## 2.5 Genotipificación por secuenciación

Genotipificación por secuenciación (GBS por sus siglas en inglés *Genotyping by Sequencing*) es un método de análisis genético simple, rápido, altamente específico y reproducible, que puede alcanzar regiones importantes del genoma, que son inaccesibles a los enfoques de captura de secuencias (Elshire, Glaubitz, Sun, Poland, Kawamoto, Buckler y Mitchell, 2011, p.1). Esta técnica permite identificar polimorfismos de un solo nucleótido (SNP por sus siglas en inglés *Single Nucleotide Polymorphism*), es decir variantes nucleotídicas comunes que pueden estar en el genoma (Baird, *et al.*, 2008, p. 1). Se basa en la secuenciación de última generación de alto rendimiento dirigidos por enzimas de restricción (Elshire, *et al.*, 2011, p. 1).

El método de GBS es utilizado en estudios de genética de poblaciones, estructuración genética, diversidad genómica, mapeo de rasgos en diversos organismos y metagenómica (Chung, Choi, Jun y Kim, 2017, p. 425; Elshire, *et al.*, 2011, p. 1).

#### 4. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Chagas es una enfermedad potencialmente mortal que puede ocasionar trastornos cardíacos, alteraciones digestivas, neurológicas o mixtas (Woody, Woody y Christi, 1955, p. 676; WHO, 2017). Ésta es causada por el parásito *T. cruzi* transmitido principalmente por el contacto de la piel abierta con las heces de insectos de la subfamilia Triatominae (Reduviidae) (WHO, 2015).

En humanos es transmitida por 15 especies de los géneros *Triatoma* Laporte, 1832, *Panstrongylus* Berg, 1879 y *Rhodnius* Stal, 1859 que viven en hendiduras de las paredes o techos de las casas construidas en las áreas rurales de Latinoamérica (WHO, 2015); donde las comunidades son de escasos recursos y las viviendas se construyen a partir de material orgánico, adobe, lodo y otro tipo de material fácil de acceder (Castillo y Wolff, 2000, pp. 59-60). En Centroamérica, *Triatoma dimidiata* es el principal vector de la enfermedad de Chagas (OPS, 2012). En Guatemala, se encuentra presente en 21 de los 22 departamentos (Organización Panamericana de la Salud, 2002), en una variedad de ecotopos selváticos, así como también en el domicilio y peridomicilio, dificultando así su control (Zeledón y Rojas, 2006, pp. 381-382; Chanquín, 2009, p. 27).

El surgimiento de chinches como plagas ha despertado interés en el control de estos insectos (Lawrence, 2017, p. 432). En Guatemala, el control de la transmisión vectorial por *T. dimidiata* es la principal estrategia en contra de la enfermedad; para ello existen sistemas de vigilancia entomológica con participación comunitaria en 637 localidades en 10 departamentos (OPS, 2012). Otras estrategias incluyen el mejoramiento de vivienda para evitar infestaciones por el vector (OPS, 2012; Schofield, 1994, p. 55).

También, Chanbusarakum *et al.*, (2008, p. 318), Cirimotich *et al.*, (2011, p. 307), Weiss y Aksoy (2011, pp. 514-516) y Villa y Viña (2016, pp. 6-7) mencionan que se podría contribuir al control biológico de las enfermedades transmitidas por insectos hematófagos, tal como la

enfermedad de Chagas, a través del conocimiento y estudio de la composición de la microbiota intestinal y su interacción con el insecto anfitrión.

Por lo tanto, es importante conocer a detalle acerca de las especies que conforman la microbiota intestinal de *T. dimidiata*, para poder estudiar cómo estas interactúan con el insecto vector. Es por ello que en esta investigación se pretende determinar las especies que forman parte de la microbiota intestinal de *T. dimidiata* y si la presencia de algunas de estas especies se encuentra relacionada con la presencia y/o ausencia del parásito *T. cruzi*.

## 5. OBJETIVOS

### 4.1 General

- Determinar la presencia de diferentes especies de la microbiota intestinal en *Triatoma dimidiata* a través de análisis bioinformáticos de secuencias obtenidas por secuenciación de nueva generación.

### 4.2 Específicos

- Obtener lecturas de secuencias de ADN del abdomen de chinches utilizando secuencias genómicas de especies de la microbiota intestinal de *Triatoma dimidiata*.
- Relacionar la presencia de los simbioses encontrados en *Triatoma dimidiata* con la presencia/ausencia de *Trypanosoma cruzi*.
- Estimar la tasa de infección de distintos simbioses de *Triatoma dimidiata* en las secuencias obtenidas por secuenciación de nueva generación.

## 6. HIPÓTESIS

Las especies de protozoos y nematodos que componen la microbiota intestinal de *T. dimidiata* pueden ser detectadas mediante genotipificación por secuenciación (GBS).

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Universo**

El universo está constituido por especímenes de *T. dimidiata* colectados de la aldea El Carrizal, Agua Blanca, Jutiapa, Guatemala, situada en las coordenadas 14.4667 latitud Norte y -89.5167 longitud Oeste.

La muestra está constituida por 60 especímenes de *T. dimidiata* previamente secuenciados y colectados en viviendas humanas de la aldea El Carrizal, Jutiapa

### **6.2 Materiales**

#### **6.2.1 Colecta**

Para este estudio se utilizó información de secuencias de nucleótidos obtenidas por GBS de especímenes de *T. dimidiata* previamente colectados en la aldea El Carrizal, Agua Blanca, Jutiapa, utilizando el método hombre-hora. Este método consiste en realizar una búsqueda activa de 8:00 a 16:00 horas en viviendas humanas de triatominos con ayuda de pinzas y linterna por parte de un investigador. Estos especímenes fueron obtenidos por muestreos realizados por el personal del Laboratorio de Entomología aplicada y Parasitología (Lenap), de la Universidad de San Carlos de Guatemala y una vez capturados, se preservaron en una mezcla de alcohol-glicerina (Solórzano, 2015, p. 30).

### **6.3 Métodos**

#### **6.3.1 Extracción y secuenciación ADN**

La extracción de ADN del contenido intestinal de los especímenes de *T. dimidiata* colectados, fue realizada a través del kit comercial Quiagen® (DNeasy 96 Blood & Tissue Kit). Para este procedimiento se realizó un corte y posterior maceración de los últimos tres segmentos del abdomen de cada uno de los especímenes para posteriormente realizar un análisis de calidad y concentración del ADN extraído utilizando Nanodrop (Thermo Scientific ®), Qubit® Fluometric Quantitation (Life Technologies) y Electroforesis. Las muestras cuya calidad y concentración de ADN cumplieron los requerimientos del Genome Core Facility de la

Universidad de Cornell, fueron utilizadas para la generación de las Bibliotecas de Representación Reducida de Secuencias (Elshire *et al.*, 2011, p.1).

La secuenciación se llevó a cabo por el método de *Genotyping by Sequencing* (GBS), que consiste en cortar el ADN utilizando enzimas de restricción, que genera cortes en las secuencias 5'-C TGCA↓G-3' 3'-G↑ACGT C-5'. Posteriormente son añadidos adaptadores a los que se les une los cebadores donde iniciará la polimerasa de ADN, para generar una nueva hebra usada en la secuenciación de las regiones adyacentes al sitio de restricción (Davey y Blaxter, 2010, pp. 416-420).

Durante esta secuenciación se obtuvieron lecturas (secuencias nucleotídicas) de 85 pares de bases. Se evaluó la calidad (arriba de 30), contenido de guanina y citocina, y la sobrerrepresentación de secuencias a través de del software FastQc (Andrews, 2010).

### **6.3.2 Obtención de genomas de referencia**

Para poder determinar las diferentes especies de entomopatógenos presentes en la microbiota intestinal de *T. dimidiata*, se realizó un listado con especies de protozoos y nemátodos que se han encontrado anteriormente en *T. dimidiata*. A partir de este listado, se buscó el genoma de referencia y se descargó en formato Fasta las secuencias de los genomas de estos organismos (Anexo 1) en la página web del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés *National Center for Biotechnology Information*).

### **6.3.3 Análisis bioinformáticos**

Se realizó un análisis *in silico*, utilizando el software Kraken (Wood y Salzberg, 2014), un clasificador de secuencias que asigna etiquetas taxonómicas a lecturas de ADN, examinando *k*-mers dentro de una lectura y consultando una base de datos con esos *k*-mers (Wood y Salzberg, 2004). Para ello se instaló el software en una computadora, con sistema operativo Linux Mint. Posteriormente, con el script para construcción de base de datos de Kraken, se creó la misma con genomas de referencia de 20 especies de entomopatógenos. Esta base de datos contenía: 1) las asignaciones de *k*-mer de cada taxón; 2) ubicaciones de desplazamiento

minimizadas; 3) la estructura de árbol de taxonomía más rangos y los nombres taxonómicos. Para evitar falsos positivos causados por emparejamiento con secuencias de baja complejidad, se ocultaron estas regiones del genoma usando la herramienta dustmasker del paquete blast+ de NCBI (Camacho, Coulouris, Avagyan, Ma, Papadopoulos, Bealer y Madden, 2008).

Al finalizar la base de datos se procedió a clasificar las secuencias de cada uno de los 60 especímenes. Se obtuvo un archivo de salida para cada secuencia el cual contenía: 1) un código de letra "C/U", indicando si la secuencia era clasificada (C) o no clasificada (U); 2) el ID de la secuencia, obtenida del formato FASTA/FASTAQ; 3) la identificación de taxonomía que Kraken usó para etiquetar o no la secuencia; 4) la longitud de las secuencias en pares de bases; 5) Una lista delimitada por espacios que indica la asignación de LCA de cada k-mer en la secuencia. Así también se obtuvo un archivo output de reporte que contiene: 1) el porcentaje de lecturas cubiertas por el clado enraizado en el taxón; 2) el número de lecturas cubiertas por el clado enraizado en el taxón; 3) Número de lecturas asignadas directamente al taxón; 4) un código de clasificación de letras que indica no clasificado (U), Dominio (D), Reino (K), Filo (P), Clase (C), Orden (O), Familia (F), Género (G) y Especie (S); 5) el ID de taxonomía de NCBI; 6) el nombre científico taxonómico.

Para la clasificación taxonómica se tomó un valor de 95.43 de precisión que se refiere a la proporción de clasificaciones correctas, del total de intento de clasificación y un valor de 77.32 de sensibilidad, que indica la proporción de secuencias asignadas al género correcto (Wood y Salzberg, 2014). Asimismo para clasificar como presente o no una especie, se utilizó el genoma de referencia de la especie *Trypanosoma brucei* Plimmer & Bradford 1899 y con base a las lecturas que se clasificaban para esta especie se estableció que, por debajo de las 10 lecturas clasificadas para una especie, esta no podía ser tomada en cuenta como presente.

Se hizo un script para seleccionar las secuencias clasificadas y no clasificadas, y para obtener el ID de las especies clasificadas con base en 51-meros de coincidencia. Se obtuvo un archivo para cada uno de los 60 especímenes y se tabularon los datos.

### 6.3.4 Análisis estadísticos

Se utilizó el índice de referencia del genoma de *T. cruzi* anteriormente creado para determinar en qué especímenes estaba presente el parásito. Se realizó una matriz con datos binomiales en Microsoft Excel en donde se colocó el código del espécimen de *T. dimidiata* que fue evaluado y las diferentes especies de entomopatógenos encontrados, incluyendo a *T. cruzi*. Si algún protozoo o nemátodo fue determinado en la microbiota de *T. dimidiata*, se colocó un valor de 1, de lo contrario, se colocó un valor de 0. Posteriormente se realizó un análisis de regresión logística, mediante un modelo lineal generalizado, utilizando el programa estadístico R (R Core Team, 2015), para determinar si la presencia de *T. cruzi* se correlaciona con la presencia de otros entomopatógenos. Para ello se escogieron los modelos que presentaron los valores de Criterio de Información de Akaike (AIC) más bajos; este índice evalúa tanto el ajuste del modelo a los datos como la complejidad del modelo, cuando más pequeño es el AIC, mejor es el ajuste (Cayuela, 2010).

Por último, se determinó en cuántos especímenes de *T. dimidiata*, evaluados se encontraron cada uno de los diferentes entomopatógenos y se estimó la tasa de infección de cada estos (De Fuentes-Vicente, Vidal-López, Gutiérrez-Jiménez, Schlie-Guzmán, 2016, p. 113).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Listado de especies

De los 60 especímenes analizados de *T. dimidiata*, se obtuvo un total de 455 millones de lecturas; de estas, la mayoría 367 millones (80%) no fueron clasificadas y 88 millones se clasificaron en diferentes grupos taxonómicos de nematodos y protozoos. Después de una clasificación con base en 51k-mers se obtuvo un total de 1,121,123 lecturas que corresponden a 12 (54%) especies de las 22 analizadas: 3 especies de protozoos y 9 especies de nemátodos (Tabla 1). Se asignaron 1,204,824 lecturas a nemátodos y 2709 a protozoos. La especie con mayor número de lecturas corresponde al nemátodo *Strongyloides papillosus* (Weld, 1856)

(Rhabditida: Strongylidae) y la que obtuvo menor número de lecturas fue el protozoo *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 (Trypanosomatida: Trypanosomatidae).

**Tabla 1.** Número de lecturas y tasa de infección de las especies de entomopatógenos encontradas en la microbiota intestinal de especímenes de *T. dimidiata*

<b>Especie</b>	<b>Filo</b>	<b>Total de lecturas asignadas</b>	<b>% en total de lecturas</b>
<i>Strongyloides papillosus</i> (Weld, 1856).	Nematoda	729758	0.0016
<i>Haemonchus placei</i> (Place, 1893).	Nematoda	347711	0.0008
<i>Steinernema monticolum</i> StocK, Choo & Kaya, 1997.	Nematoda	16389	3.6E-5
<i>Strongyloides stercoralis</i> (Bavay, 1876) Stiles et Hassall, 1902	Nematoda	11085	2.43E-5
<i>Parastrongyloides trichosuri</i> Mackerras, 1959.	Nematoda	9637	2.12E-5
<i>Angiostrongylus costaricensis</i> Morera & Céspedes, 1971.	Nematoda	4146	9.1E-6
<i>Trypanosoma cruzi</i> Chagas, 1909.	Euglenozoa	1418	3.11E-6
<i>Heligmosomoides bakeri</i> Durette-Desset, Kinsella & Forester, 1972	Nematoda	630	1.38E-6
<i>Haemonchus contortus</i> (Rudolphi, 1803)	Nematoda	332	7.29E-7
<i>Crithidia acanthocephali</i> Hanson & McGhee, 1961	Euglenozoa	66	1.45E-7
<i>Strongyloides ratti</i> Sandground, 1925	Nematoda	47	1.03E-7
<i>Trypanosoma rangeli</i> Tejera, 1920	Euglenozoa	13	2.85E-8

Fuente: Datos experimentales obtenidos a través del Software Kraken.

### 7.2 Relación de la presencia de los organismos con *T. cruzi*

Al realizar un análisis de regresión logística se determinó que los valores de AIC se encuentran dentro del rango de 32-70. Sin embargo, solo para los valores entre *T. cruzi*- *A. costaricensis*, *T. cruzi*- *Heligmosomoides bakeri* y *T. cruzi*- *Haemonchus contortus* se obtuvo un valor de p estadísticamente significativo, lo que indica que la presencia de *T. cruzi* está relacionada con las especies *A. costaricensis*, *Haemonchus contortus* y *Heligmosomoides bakeri*.

**Tabla 2.** Valores de AIC y de significancia obtenidos al realizar un análisis de regresión logística entre *T. cruzi* y diferentes especies de nematodos y protozoos.

Especie	AIC	Valor de P
<i>Strongyloides papillosus</i>	70.899	0.992
<i>Haemoncus placei</i>	70.307	0.992
<i>Angiostrongylus costaricensis</i>	32.14	<0.05
<i>Steinernema monticolum</i>	67.153	0.991
<i>Parastrongyloides trichosuri</i>	69.665	0.182
<i>Strongyloides stercoralis</i>	69.797	0.254
<i>Heligmosomoides bakeri</i>	48.394	<0.05
<i>Strongyloides ratti</i>	62.67	0.993
<i>Haemonchus contortus</i>	60.18	<0.05
<i>Trypanosoma rangeli</i>	68.65	0.990
<i>Crithidia acanthocephali</i>	68.45	0.992

Fuente: datos experimentales utilizando el software R project.

### 7.3 Tasa de infección

De los 60 ejemplares de *T. dimidiata*, se determinó que *S. papillosus* es la especie con la mayor tasa de infección (98%) seguido de otras especies de nemátodos que presentan tasas de infección bastante altas. En cuanto a *T. cruzi*, para la localidad de estudio El Carrizal,

Jutiapa, se obtuvo una tasa de infección del 25%. La especie con menor tasa de infección corresponde a *T. rangeli* (2%).

**Tabla 3.** Tasa de infección de los diferentes parásitos presentes en la microbiota intestinal de *T. dimidiata*

<b>Especie</b>	<b>Tasa de infección</b>
<i>Strongyloides papillosus</i>	98%
<i>Haemonchus placei</i>	97%
<i>Steinernema monticolum</i>	88%
<i>Strongyloides stercoralis</i>	83%
<i>Parastrongyloides trichosuri</i>	45%
<i>Angiostrongylus costaricensis</i>	25%
<i>Trypanosoma cruzi</i>	25%
<i>Heligmosomoides bakeri</i>	25%
<i>Haemonchus contortus</i>	16%
<i>Crithidia acanthocephali</i>	8%
<i>Strongyloides ratti</i>	5%
<i>Trypanosoma rangeli</i>	2%

Fuente: datos experimentales.

## 8. DISCUSIÓN

El microbioma de *T. dimidiata* es muy dinámico, y puede presentar diferencias en su composición de especies debido a la fuente de la que se están alimentando, lo que a su vez tiene influencia importante en la interacción parásito-vector (Dumontiel, *et al.*, 2018, p.7; Vallejo, Suárez, Olaya, Gutierrez y Carranza, 2015, p. 112).

La presencia de especies del género *Strongyloides* (Grassi, 1879) en triatominos evaluados puede deberse a que estos adquirieron larvas filariformes L3 que están en el sistema circulatorio del ser humano, animales domésticos (infectados por *Strongyloides stercoralis*), animales de granja (infectados por *Strongyloides papillosus*), roedores (infectados por *Strongyloides ratti*) y otros reservorios del helminto, cuando los triatominos se hayan alimentado estos (Orantes, *et al.*, 2018, p. 28; Ravi, Ramachandran, Thompson, Andersen y Neva, 2002, p. 76; Jaleta, *et al.*, 2017, p.1; Abadie, 1963, p. 243; Viney y Lok, 2011, p. 2).

Se ha demostrado que las infecciones ocasionadas por helmintos, que son altamente prevalentes en países tropicales y subtropicales y que están relacionadas con áreas endémicas de la enfermedad de Chagas, pueden modular el sistema inmune del ser humano, modificando la respuesta a otras infecciones (Salvador, Sulleiro, Sánchez-Montalvá, Martínez-Gallo, Carrillo y Molina, 2016, p. 1). Estudios realizados indicaron que pacientes con cierta infección causada por algún parásito intestinal (más específicamente por una infección por *Strongyloides stercoralis*), tienen mayor probabilidad de adquirir la enfermedad de Chagas, que aquellos no infectados (Salvador, *et al.*, 2016, pp. 1-2; Puerta-Alcalde, *et al.*, 2018, pp. 1-2). Esto demuestra la importancia de realizar estudios de prevalencia de parásitos en la zona de estudio, ya que la presencia de estos podría ser un factor importante en la transmisión de la enfermedad de Chagas.

Otros nemátodos determinados en este estudio están representados por especies de los géneros *Angiostrongylus* Kamensky, 1905, *Haemonchus* Cobb, 1898 y *Heligmosomoides*, Hall, 1916 siendo estos parásitos del ser humano, ganado y roedores, que en su ciclo de vida no presentan estadios en el sistema circulatorio (Morera y Céspedes, 1970; González-

Garduño, 2015, p.1). Orantes (2018), explica que la presencia de estos parásitos puede deberse a que *T. dimidiata* podría estarlos transportando de manera pasiva cuando se mueven desde las grietas o suelo de las viviendas hasta abrasiones o heridas en el huésped. *A. costaricensis*, *Heligmosomoides bakeri* y *Haemonchus contortus*, presentaron una relación con la presencia del parásito *T. cruzi*, por lo que comprender los efectos (positivos o negativos) de estos microorganismos en *T. dimidiata*, ayudará a entender mecanismos de competencia de recursos, modulación de la inmunidad, entre otros aspectos que influyen en la capacidad vectorial de los insectos (Rodríguez-Ruano *et al.*, 2018, p. 2).

Por otro lado, especies de la familia Steinernematidae (Rhabditida) son endoparásitos obligados y letales de insectos que tienen una relación simbiótica con bacterias del género *Xenorhabdus* Thomas & Poinar, 1979 (Shapiro-Ilan, Han y Dolinski, 2012, p. 206). En el estudio realizado por Orantes *et al.*, (2018), se encontró presencia de bacterias del género *Xenorhabdus* en un triatominos evaluado, por lo que se puede correlacionar con la presencia de estos nemátodos parásitos que infectan y matan a insectos (Koneru, Salinas, Flores y Hong, 2016, p. 2). La determinación de la especie *Stenenerma monticolum* puede ser un inicio para investigar y establecer estrategias de control en insectos triatominos.

En cuanto a los protozoos encontrados, *C. acanthocephali*, es un parásito presente en algunos insectos. En un estudio realizado con *Triatoma infestans* (Klug, 1834) y *Rhodnius prolixus*, Stål, 1859 que fueron infectados con *C. acanthocephali* y otros parásitos del género *Blastocrithidia* Laird, 1959 y *Crithidia* Leger, 1902, se encontró que estos protozoos sobrevivían y en la mayoría de casos se reproducían en los insectos hasta 2 meses después de la infección (Hanson, Mcghee y Deboe, 1968, p. 346). En otros estudios, se ha encontrado estadios de coanomastigotes del género *Crithidia* en el lumen del tracto digestivo de insectos de los órdenes Diptera, Hemiptera, Trichoptera e Hymenoptera (Lawrence, 2012, p. 333). Otro género reportado en triatominos hematófagos es *Blatocrithidia*, sin embargo, no se pudo incluir en este estudio ya que el genoma de referencia no está disponible.

Desde el año 1920 se reportó la presencia de *T. rangeli* en la microbiota intestinal de *R. prolixus*; este era confundido con *T. cruzi*, hasta que 30 años después, comparándolo morfológicamente, se aceptó que era diferente (Alessandro, 1974, p. 139). En 1974, se registró la presencia de *T. rangeli* y “otros tripanosomas parecidos” en el contenido intestinal de triatominos de las especies *T. dimidiata* y *Triatoma nitida* Usinger, 1939, colectados en Guatemala (Alessandro, 1974, pp. 139-140). En 1959 se reportó una tasa de infección de *T. rangeli* del 14% en *T. dimidiata* mientras que en 2003 se reportó una tasa más baja, esto puede variar debido a que los epimastigotes encontrados en las glándulas rectales eran considerados como *T. cruzi*, subestimando la presencia de *T. rangeli*, por lo que es bueno considerar otras técnicas de identificación que permitan aclarar estas discrepancias, ya que morfológicamente, no es fácil diferenciar entre estos parásitos (Vallejo, Marinkelle, Guhl y de Sánchez, 1988). Utilizando otras técnicas, como PCR, se ha podido distinguir y evidenciar la presencia de *T. rangeli* y *T. cruzi* en triatominos de la especie *R. prolixus*, infectados por ambos parásitos (Dorn *et al.*, 1999, p. 741).

La diferencia de encontrar mayormente *T. cruzi* se puede deber a que este se desarrolla en el tracto digestivo mientras que *T. rangeli* se encuentra en la hemolinfa y glándulas salivares (Grisard, Steindel, Guarneri, Eger-Mangrich, Campbell y Romanha, 1999).

Asimismo, es importante establecer un diagnóstico adecuado cuando se evalúan triatominos ya que a diferencia de *T. cruzi*, *T. rangeli* es un parásito no infeccioso y no patógeno para el ser humano y estos dos pueden coexistir en los mismos vertebrados y vectores, lo que dificulta un diagnóstico acertado (Vallejo *et al.*, 1988). Es por ello que el uso de herramientas moleculares para ayudar a entender la dinámica de la transmisión vectorial de ambos parásitos es sustancial (Vallejo, *et al.*, 2015).

La tasa de infección de *T. cruzi* también puede variar según la localidad en donde hayan sido colectadas, desde un 18% en el Salvador hasta un 44% en otras áreas (Monroy, Rodas, Mejía, Rosales y Tabaru, 2003, pp. 307-309). En este estudio se determinó una tasa de infección (tabla 3) del 25% para *T. cruzi*. Para otros nemátodos se determinaron tasas de infección bastante altas (arriba del 80%) por lo que es importante la realización de otros estudios para

establecer la importancia de estos organismos, que están presentes en la microbiota intestinal, ya que podrían tener un rol importante en la modulación de la competencia vectorial, es decir en la capacidad de adquirir, mantener y transmitir patógenos (Díaz, Villacencio, Correia, Costa y Haag, 2016, p. 1).

Se debe considerar que los resultados obtenidos en este estudio pueden estar sujetos a errores y dar interpretaciones confusas a pesar que se utilizó una alta sensibilidad y precisión en la clasificación de especies con el software Kraken. Tanto las secuencias de referencia como las secuencias obtenidas por GBS pueden estar contaminadas por ADN de otros organismos, que pudieron ser introducido durante la colecta y preparación de las muestras o en la preparación de las bibliotecas (Merchant, Wood y Salzberg, 2014, p. 1).

Asimismo se pudo obtener secuencias del contenido intestinal de *T. dimidiata*, que estaban sobrerrepresentadas (Anexo 2), lo que se podría afectar en la asignación de lecturas de las especies (tabla 1). Otro factor que determina esto, es la abundancia de las especies presentes en la microbiota de los triatomíneos, por lo que es importante realizar en futuros estudios una estimación de abundancia de las especies clasificadas, ya que permitirá asignar correctamente lecturas entre especies muy emparentadas, reduciendo así falsos positivos (Nasko, Koren, Phillippy y Treangen, 2018, p. 7; Lu, Breitweiser, Thielen y Salzberg, 2017, pp. 3-4). Esto también podría ser importante y tener influencia en los valores de la tasa de infección de los microorganismos encontrados, ya que pudo haber lecturas asignadas a especies muy emparentadas con otras, dado que los métodos basados en k-mers no están basados en filogenética, sino en la composición de las secuencias, y son susceptibles a la mala asignación de clados, donde la taxonomía está en conflicto parcial con la filogenia (Nasko, *et al.*, p. 7).

## 9. CONCLUSIONES

- El uso de secuencias obtenidas por secuenciación de nueva generación, en conjunto con softwares y herramientas bioinformáticas permitió identificar y clasificar secuencias de ADN del contenido intestinal de *T. dimidiata*.
- Se determinó la presencia de 9 especies de nemátodos y 3 especies de protozoos presentes en la microbiota intestinal de *T. dimidiata*, los cuales pueden tener un rol importante en la capacidad de adquirir, mantener y transmitir patógenos.
- La presencia de nemátodos patógenos de humanos y otros animales en la microbiota intestinal de *T. dimidiata* manifiestan la importancia de realizar estudios de prevalencia de parásitos en la zona de estudio, ya que la presencia de helmintos puede un factor importante en la transmisión de la enfermedad de Chagas.
- Se encontró una relación entre el parásito *T. cruzi* y las especies *A. costaricensis*, *He. bakeri* y *Ha. contortus*, lo que indica la importancia de estudiar estos organismos para determinar cómo influyen en la presencia de *T. cruzi*
- La importancia de la determinación de entomopatógenos de las especies *Str. monticolum* y *C. acanthocephali*, se manifiesta en que especies infectan y matan a insectos por lo que podría ser utilizadas para establecer estrategias de control en insectos triatominos.

## 10. RECOMENDACIONES

- Utilizar otros softwares como PhymmBI o Megablast para poder comparar si se determinan o no las mismas especies encontradas usando el software Kraken.
- Incluir organismos de otras localidades para establecer si existen diferencias en el contenido de la microbiota de *T. dimidiata*.
- Realizar estudios de parásitos intestinales para determinar la prevalencia de estos en regiones afectadas por la enfermedad de Chagas.

## 11. REFERENCIAS

- Abadie, S.H. (1963). The life cycle of *Strongyloides ratti*. *The American Society of Parasitologists*, 49(2), 241-248.
- Adarme, L. (2010). Variabilidad morfológica entre poblaciones de *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811), procedentes de cuatro departamentos de Colombia. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- Alessandro, A.D. (1974). *Trypanosoma rangeli*. *Acta Médica del Valle*, 5, 139-142.
- Andrews, N. W., Hong, K. S., Robbins, E. S., y Nussenzweig, V. (1987). Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*, 64, 474-484.
- Andrews, S. (2010). FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Baird, N. A., Etter, P. D., Atwood, T. S., Currey, M. C., Shiver, A. L., Lewis, Z.A., ... Johnson, E. A. (2008). Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *Plos One*, 3(10), 1-7.
- Beard, C. B., Cordon-Rosales, C., y 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.
- Benchimol, P. R. (2006). The oral transmission of Chagas' disease: An acute form of infection responsible for regional outbreaks. *International Journal of Cardiology* 112(1), 132-133.
- Bonaldo, M. C., Souto-Padron, T., de Souza, W., Goldenberg, S. (1988). Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. *The Journal of Cell Biology*. 106, 1349-58.
- Brener, Z. (1969). The behavior of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood-stream of normal and immune mice. *Annal of Tropical Medicine Parasitology*, 63, 215-220.
- Brener, Z. (1973). Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual Review of Microbiology*. 27, 347-382.

- Brusca, R. C. y Brusca, G. J. (2003). *Invertebrates*. Oxford, England: Oxford University Press.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., y Madden, T.L. (2008). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10(1), 1-9.
- Capinera, J. L. (2008). Chagas disease or American trypanosomiasis. En J. L. Capinera (Eds.), *Encyclopedia of entomology* (pp. 1-4346). Florida, United States of America: University of Florida.
- Carcavallo, R. U., Jurberg, J., Lent, H., Noireau, F., y Galvao, C. (2000). Phylogeny of the Triatominae. (Hemiptera: Reduviidae): proposals for taxonomic arrangements. *Entomología y Vectores*, 7(1), 1-99.
- Castillo, D., y Wolff, M. (2000). Aspectos del comportamiento de los triatominos (Hemiptera: Reduviidae), vectores de la enfermedad de Chagas. *Biomedica*, 20(1), 59-64.
- Cayuela, L. (2010). Modelos lineales generalizados. Granada, España: Universidad de Granada.
- Chagas, C. (1909). Nova tripanozomiazé humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade morbida do homem. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 1(2), 159-218.
- Chanbusarakum, L., y Ullman, D. (2008). Characterization of bacterial symbionts in *Frankliniella occidentalis* (Pergande), western flower thrips. *Journal of Invertebrate Pathology*, 99(3), 318-325.
- Chanquín, S.B. (2009). Evaluación de diferentes cepas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. y *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, como potenciales agentes para el control de *Triatoma dimidiata* Latreille (Reduviidae: Triatominae). (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Chung, Y. S., Choi, S. C., Jun, T. H., y Kim, C. (2017). Genotyping-by-Sequencing: a promising tool for plant genetics research and breeding. *Horticulture, Environment and Biotechnology*. 58(5), 425-431.

- Cirimotich, C.M., Ramírez, J.L., y Dimopoulos, G. (2011). Native microbiota shape insect vector competence for human pathogens. *Cell Host Microbe*, 10(4), 307-310.
- Davey, J., y Blaxter, M. (2010). RADSeq: next-generation population genetics. *Briefings in functional genomics*, 10(2), 416-423.
- De Fuentes-Vicente, J. A., Vidal-López, D. G., Gutiérrez-Jiménez, J., y Schlie-Guzmán, M.A. (2016). Tasa de infección y tiempo de defecación de los estadios ninfales de *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) después de la infección experimental con *Trypanosoma cruzi*. *Revista Biomédica*, 27, 111-117.
- De Souza, W. (1984). Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *International Review Cytology*, 86, 197-283.
- Dias, E. (1934). Estudios sobre *Schizotrypanum cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 28, 1-110.
- Dias, J. C. P., y Shofield, C. J. (1999). The evolution of Chagas disease (American Trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1(94), 103-121.
- Díaz, S., Villavicencio, B., Correia, N., Costa, J., y Haag, K. L. (2016). Triatomine bugs, their microbiota and *Trypanosoma cruzi*: asymmetric responses of bacteria to an infected blood meal. *Parasites & Vectors*, 9, (1) 636-647.
- Dorn, P. L., Engelke, D., Rodas, A., Rosales, R., Melgar, S., Brahney, B., ... y Monroy, C. (1999). Utility of the polymerase chain reaction in detection of *Trypanosoma cruzi* in Guatemalan Chagas' disease vectors. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 60(5), 740-745.
- Dorn, P. L., Monroy, C., y 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, 343-352.
- Dotson, E. M., Plikaytis, B., Shinnick, T. M., Durvasula, R. V., Beard, C. B. (2003). Transformation of *Rhodococcus rhodnii*, a symbiont of the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*, with integrative elements of the L1 mycobacteriophage. *Infection, Genetics and Evolution*, 3(2), 103-109.

- Douglas, A. E. (2015). Multiorganismal insects: Diversity and function of resident microorganisms. *Annual Review of Entomology*, 60, 17-34.
- Dumontiel, E., Ramírez-Sierra, M.J., Pérez-Carrillo, S.P., Teh-Poot, C., Herrera, C., Gourbiere, S., y Walackx, E. (2018). Detail ecological associations of triatomines revealed by metabarcoding and next-generation sequencing: Implications for triatomine behavior and *Trypanosoma cruzi* transmission cycles. *Scientific reports*, 8(1), 1-13.
- Durvasula, R. V., Gumbs, A., Panackal, A., Kruglov, O., Aksoy, S., Merrifield, R. B., Richards, F.F., y Beard, C.B. (1997). Prevention of insect-borne disease: an approach using transgenics symbiotic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(7), 3274-3278.
- Elshire, R. J., Glaubitz, J. C., Sun, Q., Poland, J. A., Kawamoto, K., Buckler, E. S., y Mitchell, S. E. (2011). A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE*, 6(5), 1–10.
- Engel, P., y Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 37, 699-735.
- González-Garduño, R., Navarro-Martínez, F., Arias-Julián, J., Gutiérrez-Cruz, S., Vera, M. Z., y Vera, C. Z. (2013). Descripción morfológica de *Haemonchus contortus* y *Mecistocirrus digitatus* de ovinos y bovinos en Tabasco, México. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 28(2), 76-85.
- Gordon, J. I. (2012). Honor thy gut symbionts redux. *Science*, 336(8), 1251-1253.
- Grisard, E.C., Steindel, M., Guarneri, A.A., Eger-Mangrich, I., Campbell, D.A., Romanha, A.J. (1999). Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated in Central and South America: an overview. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 94: 203-209.
- Guhl, F. (2009). Enfermedad de Chagas: realidad y perspectivas. *Revista Biomédica*. 20 (3), 228-234.
- Hanson, W.L., Barclay, R., Deboe, J.H. (1968). Experimental infection of *Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus* with Trypanosomatidae of the Genes *Crithidia* and *Blastocrithidia*. *The Journal of protozoology*, 15(2), 346-349.

- Jaleta, T. G., Zhou, S., Bemm, F. M., Schär, F., Khieu, V., Muth, S., ... y Streit, A. (2017). Different but overlapping populations of *Strongyloides stercoralis* in dogs and humans-Dogs as a possible source for zoonotic strongyloidiasis. *PLoS neglected tropical diseases*, *11*(8), 1-21.
- Koneru, S. L., Salinas, H., Flores, G. E., y Hong, R. L. (2016). The bacterial community of entomophilic nematodes and host beetles. *Molecular ecology*, *25*(10), 2312-2324.
- Lane, R. S. (1994). Competence of ticks as vectors of microbial agents with an emphasis on *Borrelia burgdorferi*. En Sonenshine, D. E. y Mather, T.N. (eds.), *Ecological Dynamics of Tick-borne Zoonoses*. (pp. 1–464). Oxford: Oxford University Press.
- Lawrence, A. (2012). *Manual of techniques in invertebrate pathology*. Great Britain: Elsevier.
- Lawrence, A. L. (2017). *Microbial controls of insect and mite pests: from theory to practice*. United Kingdom: Elsevier.
- Lent, H., y Jurberg, J. (1985). Sobre a variação intra-específica em *Triatoma dimidiata* (Latreille) e *T. infestans* (Klug) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *80*(3), 285-299.
- Lent, H., y Wygodzinsky, P. (1979). Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas disease. *Bull. American Museum of Natural History*, *163*, 123-520.
- Lu, J., Breitweiser, F.P., Thielen, P., y Salzberg, S. (2017). Bracken: estimating species abundance in metagenomics data. *PeerJ Computer Science*, *3*, 104-121.
- Merchant, S., Wood, D.E., y Salzberg, S.L. (2014). Unexpected cross-species contamination in genome sequencing projects. *PeerJ*, *20*(2), 1-7.
- Miles, M. A. (2017). Chagas disease (American Trypanosomiasis). En J. Cohen, G. W Powderly y S. M. Opal (Eds.), *Infectious diseases* (pp. 1- 1769). Netherlands: Elsevier.
- Monroy, C., Rodas, A., Mejía, M., Rosales, R., y 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 (3), 305-310.
- Monroy, M. C., Bustamante, D. M., Rodas, A. G., Enriquez, M. E., Rosales, R. G. (2003). Habitats, dispersion and invasion of sylvatic *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in Peten, Guatemala. *Journal of Medical Entomology*, 40, 800–806.
- Morera, P., y Céspedesu, R. (2002). *Angiostrongylus costaricensis* n. sp.(Nematoda: Metastrongyloidea), a new lungworm occurring in man in Costa Rica. *Revista de biología tropical*, 50(2), 783-796.
- Nasko, D. J., Koren, S., Phillippy, A. M., & Treangen, T. J. (2018). RefSeq database growth influences the accuracy of k-mer-based lowest common ancestor species identification. *Genome biology*, 19(1), 1-9.
- Orantes, L.C., Monroy, C., Dorn, P., Stevens, L., Rizzo, D.M, Morrissey, L., ... y Cahan, S.H. (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), 1-28.
- Organización Panamericana de la Salud. (2002). Taller para el establecimiento de pautas técnicas en el control de *Triatoma dimidiata*: Iniciativa de Centroamérica y Belice para la interrupción de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas por *Rhodnius prolixus*, disminución de la infestación intradomiciliaria por *Triatoma dimidiata* y la eliminación de la transmisión transfusional de *Trypanosoma cruzi*. San Salvador, El Salvador: Memorias.
- Organización Panamericana de la Salud. (2012). XIV Reunión de la Comisión Intergubernamental de la Iniciativa de los Países de Centroamérica (IPCA) para la Interrupción de la Transmisión Vectorial, Transfusional y Atención Médica de la Enfermedad de Chagas. Belice: autor.
- Parra-Henao, G., Angulo, V. M., Osorio, L., y Jaramillo, N. (2016). Geographic distribution and ecology of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) in Colombia. *Journal of Medical Entomology*. 53(1), 122-129.

- Puerta-Alcalde, P., Gomez-Junyent, J., Requena-Mendez, A., Pinazo, M. J., Álvarez-Martínez, M. J., Rodríguez, N., ... y Muñoz, J. (2018). High prevalence of *S. stercoralis* infection among patients with Chagas disease: A retrospective case-control study. *PLoS neglected tropical diseases*, *12*(1), 1-11.
- R Core Team (2015). R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Ramsey, J. M., Alvear, A. L., Ordoñez, R., Muñoz, G., García, A., López, R., y Leyva, R. (2005). Risk factors associated with house infestation by the Chagas disease vector *Triatoma pallidipennis* in Cuernavaca metropolitan area, México. *Medical and Veterinary Entomology*, *19*(2), 219-228.
- Ravi, V., Ramachandran, S., Thompson, R. W., Andersen, J. F., y Neva, F. A. (2002). Characterization of a recombinant immunodiagnostic antigen (NIE) from *Strongyloides stercoralis* L3-stage larvae. *Molecular and biochemical parasitology*, *125*(1-2), 73-81.
- Ricci, I., Valzano, M., Ulissi, U., Epis, S., Capelli, A., y Favia, G. (2012). Symbiotic control of mosquito borne disease. *Pathogens Global Health*, *106*(7), 380-385.
- Rodriguez-Ruano, S. M., Škočová, V., Rego, R. O. M., Schmidt, J. O., Roachell, W., Hypša, V., y Novakova, E. (2018). Microbiomes of North American Triatominae: The grounds for Chagas disease epidemiology. *Frontiers in Microbiology*, *9*, (1167), 1-11.
- Salvador, F., Sulleiro, E., Sánchez-Montalvá, A., Martínez-Gallo, M., Carrillo, E., y Molina, I. (2016). Impact of helminth infection on the clinical and microbiological presentation of Chagas diseases in chronically infected patients. *PLoS neglected tropical diseases*, *10*(4), 1-8.
- Schofield, C. J. (1994). *Triatominae: Biología y control*. United Kingdom: Eurocommunica Publications.
- Shapiro-Ilan, D.I., Han, R., y Dolinski, C. (2012). Entomopathogenic nematode production and application technology. *Journal of Nematology*, *44*(2), 206-217.

- Solórzano, E. (2015). Estructuración genética del parásito *Trypanosoma cruzi* en su hospedero *Triatoma dimidiata* en zonas geográficas con tasas de infección contrastantes (Tesis de maestría). Universidad Austral de Chile, Chile.
- Stevens, L., Dorn, P.L., Schmidt, J.O., Klotz, J.H., Lucero, D., y Klotz, S.A. (2011). Kissing bugs. The vectors of chagas. En Rollinson, D. y Hay, S.I. (eds.), *Advances in Parasitology*. (pp. 1-192). Barcelona, España: Elsevier.
- Strand, M. A. (1977). *Pathogens of Cimicidae (bedbugs)*. Sydney, Australia: World Health Organization.
- Tarleton, R. L. (2011). Chagas disease impact and opportunities: Beyond the historical dogma. En R. E. Choffnes y D. A. Relman (Eds.), *The causes and impacts of neglected tropical and zoonotic diseases: opportunities for integrated intervention strategies* (pp. 1-578). Washington: The National Academies Press.
- Tyler, K. M., y Engman, D. M. (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*, 31, 472-481.
- Vallejo, G.A., Marinkelle, C.J., Guhl, F., y de Sánchez, N. (1988). Comportamiento de la infección y diferenciación morfológica entre *Trypanosoma cruzi* y *T. rangeli* en el intestino del vector *Rhodnius prolixus*. *Revista Brasileira de Biología*, 48 (3): 577-587.
- Vallejo, G.A., Suárez, Y., Olaya, J.L., Gutiérrez, S.A., y Carranza, J.C. (2015). *Trypanosoma rangeli*: Un protozoo infectivo y no patógeno para el humano que contribuye al entendimiento de la transmisión vectorial y la infección por *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 39(150), 111-122.
- Villa, T.G., y Vinas, M. (2016). *New weapons to control bacterial growth*. Switzerland: Springer International Publishing.
- Viney, M. E., y Lok, J. B. (2007). *Strongyloides* spp. *WormBook: the online review of C. elegans Biology*, 1-15.
- Weiss, B., y Aksoy, S. (2011). Microbiome influences on insect host vector competence. *Trends in Parasitology*, 27(11), 514-522.

- Woody, N.C., Woody, M.D., y Christi, C. (1955). American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Journal of the American Medical Association*, 159(7), 676-677.
- World Health Organization. (1991). *Control of Chagas Disease: report of a World Health Organization expert committee*. Suiza, Geneva: Autor.
- World Health Organization. (2015). Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Weekly Epidemiological Record*, 90(6), 33-44.
- World Health Organization. (2017). *Chagas disease (American trypanosomiasis)*. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>
- Zeledón, R., Solano, G., Zúñiga, A., Swartzwelder, J. C. (1973). Biology and ethology of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811): habitat and blood sources. *Journal of Medical Entomology*, 10, 363–370.
- Zeledón, R., Ugalde, J. A., y Paniagua, L. A. (2001). Entomological and ecological aspects of six sylvatic species of Triatomines (Hemiptera, Reduviidae) from the Collection of the National Biodiversity Institute of Costa Rica, Central America. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96, 757–764.
- Zeledón, R., y Rojas, J. (2006). Environmental management for the control of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811), (Hemiptera: Reduviidae) in Costa Rica: a pilot project. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(4), 379-386.

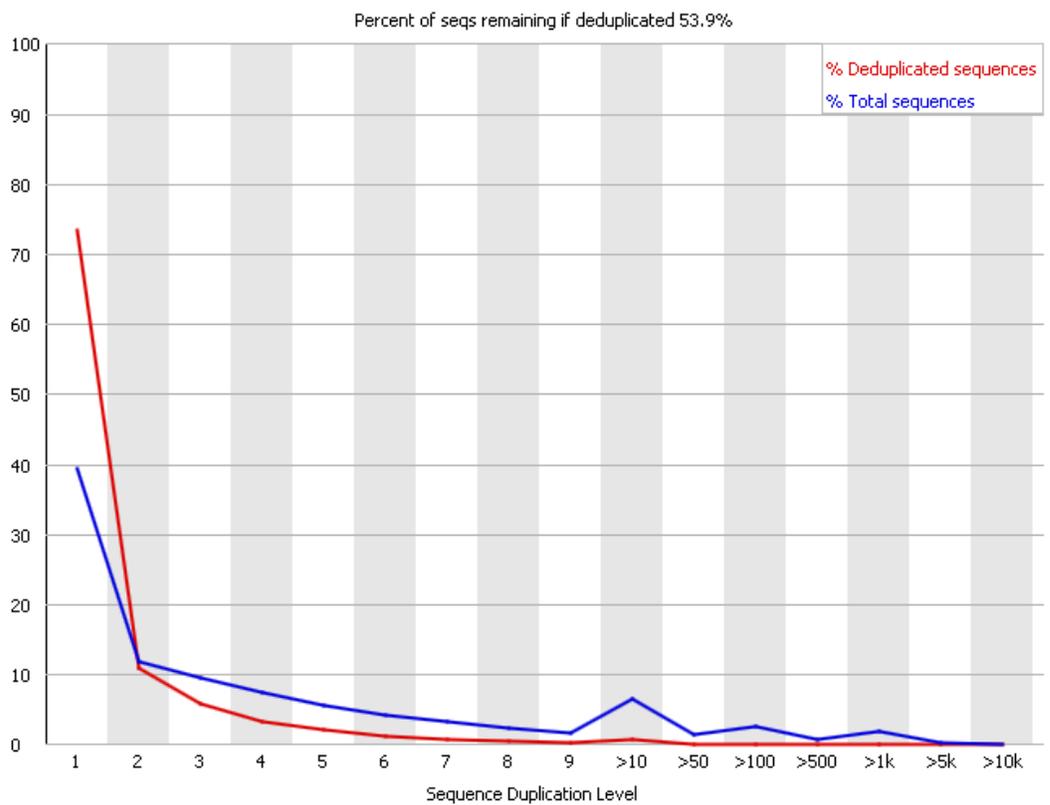
## 12. ANEXOS

**Tabla No. 4.** Listado de especies evaluadas en la microbiota intestinal de *T. dimidiata* y ID del genoma de referencia de GenBank.

<b>Especie</b>	<b>ID de GenBank</b>
<i>Angiostrongylus cantonensis</i>	GCA_001884285.1
<i>Angiostrongylus costaricensis</i>	GCA_900624975.1
<i>Crithidia acanthocephali</i>	GCA_000482105.1
<i>Crithidia mellificae</i>	GCA_002216565.1
<i>Gregarina niphandrodes</i>	GCA_000223845.4
<i>Haemonchus contortus</i>	GCA_000469685.2
<i>Haemonchus placei</i>	GCA_900617895.1
<i>Heligmosomoides bakeri</i>	GCA_900096555.1
<i>Parastrongyloides trichosuri</i>	GCA_000941615.1
<i>Steinenerma carpocapsae</i>	GCA_000757645.3
<i>Steinenerma feltiae</i>	GCA_000757705.1
<i>Steinenerma glaseri</i>	GCA_000757755.1
<i>Steinenerma monticolum</i>	GCA_000505645.1
<i>Steinenerma scapterisci</i>	GCA_000757745.1
<i>Strongyloides papillosus</i>	GCA_005656395.1
<i>Strongyloides ratti</i>	GCA_001040885.1
<i>Strongyloides stercoralis</i>	GCA_000947215.1
<i>Trypanosoma cruzi</i>	GCA_000209065.1
<i>Trypanosoma rangeli</i>	GCA_003719475.1
<i>Trypanosoma brucei</i>	GCA_000210295.1

Fuente: ID obtenido de la base de datos de GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

**Anexo 1.** Tabla de ID especies evaluadas en la microbiota intestinal de *T. dimidiata*.



**Anexo 2.** Porcentaje de secuencias duplicadas en la obtención de las mismas mediante GBS.

Fuente: datos obtenidos mediante software FastQC.

Ana Elisa Laparra Ruiz

Tesista

Sergio Alejandro Melgar Valladares, PhD.

Asesor

Enio Boanerges Cano Dávila, PhD.

Revisor

Sergio Alejandro Melgar Valladares, PhD.

Director

M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto

Decano