



UADY

CIENCIAS DE LA SALUD

POSGRADO INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS DE LA SALUD

Descripción de los ciclos de transmisión de *Trypanosoma cruzi*
mediante la identificación de las interacciones
hospedero/vector/parásito/ecotopos en localidades rurales de
Yucatán.

Tesis presentada por:

Lic. Anette Hernández Andrade

En opción al grado:

Maestra en Investigación en Salud

Director de Tesis

Dr. Etienne Jean Guy Waleckx

Mérida, Yucatán, Julio 2020



UADY

CIENCIAS DE LA SALUD

POSGRADO INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS DE LA SALUD

Descripción de los ciclos de transmisión de *Trypanosoma cruzi*
mediante la identificación de las interacciones
hospedero/vector/parásito/ecotopos en localidades rurales de
Yucatán.

Tesis presentada por:

Lic. Anette Hernández Andrade

En opción al grado:

Maestra en Investigación en Salud

Director de Tesis

Dr. Etienne Jean Guy Waleckx

Mérida, Yucatán, Julio 2020

Agradecimientos

Le presento mis agradecimientos totales a las personas que al día de hoy están en mi vida y hacen cosas maravillosas en ella, primordialmente a mis padres; Tere Andrade Gómez y Oscar Hernández Sosa; y a mi hermana Marianne Hernández Andrade.

Le tengo especial agradecimiento a mi asesor Dr. Etienne Waleckx, en el encontré a un amigo y mentor extraordinario. Gracias.

De igual manera me dirijo al Dr. Miguel Rosado, a la QFB María Ramírez (Chuly), al Dr. Eric Dumonteil y a la Dra. Audrey Arnal; siempre dispuestos a escuchar. Gracias por sus consejos, por el apoyo y sus enseñanzas.

A mis colegas Carolina Arias, Víctor Dzul, Joel Mo-Millan, Tere Balam, Christian Teh y Pedro Martínez; por su constante apoyo y recomendaciones. Gracias amigos.

Al H. Sínodo conformado por la Dra. Karla Rossanet Dzul Rosado., Dr. Julián Everardo García, Dra. Ana Paulina Haro Álvarez, Dr. Julio Cesar Torres Romero y Dr. Carlos Napoleón Ibarra Cerdeña; por fortalecer el presente documento con sus observaciones y comentario. Muchas gracias.

A la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY); Al Posgrado Institucional en Ciencias de la Salud de la UADY; Al Campus de la Facultad de Medicina y al Laboratorio de Parasitología del Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi UADY, Gracias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por otorgarme los apoyos económicos de los programas; “Becas CONACYT nacionales para inversión en el conocimiento” y “Becas de movilidad para becarias y becarios CONACYT nacionales/ becas mixtas”, para la realización de mi tesis de maestría y mi estancia en la Universidad de Tulane LA, EUA. Gracias.

Al proyecto “Secuenciación de Nueva Generación para la Identificación de las Fuentes Alimenticias y Otras Asociaciones Ecológicas de Triatoma Dimidiata, Vector de la enfermedad de Chagas en Yucatán”, apoyado por CONACYT C.B. 2015-01-258752.

Finalmente, un especial agradecimiento a toda la gente de Sudzal, Teya y Chumbec que siempre están dispuestos a contribuir con nuestras investigaciones y hacen de nuestra labor una grata experiencia.

Lugar de realización

El desarrollo práctico de esta tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Parasitología del Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi, de la Universidad Autónoma de Yucatán.

ÍNDICE

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | RESUMEN..... | 1 |
| 2 | INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| 3 | ANTECEDENTES..... | 4 |
| 3.1 | Generalidades sobre la enfermedad de Chagas..... | 4 |
| 3.1.1 | Epidemiología..... | 4 |
| 3.1.2 | Fisiopatología..... | 5 |
| 3.1.3 | Estrategias de control..... | 5 |
| 3.2 | <i>Trypanosoma cruzi</i> , agente causal de la enfermedad de Chagas..... | 6 |
| 3.2.1 | Ciclo de vida..... | 6 |
| 3.2.2 | Diversidad genética..... | 7 |
| 3.2.3 | Implicaciones de la diversidad genética de <i>T. cruzi</i> | 7 |
| 3.2.4 | Caracterización de la diversidad de DTUs en México y Yucatán..... | 9 |
| 3.2.5 | Reservorios de <i>T. cruzi</i> | 10 |
| 3.3 | Los triatominos, vectores de <i>T. cruzi</i> | 10 |
| 3.3.1 | Generalidades..... | 10 |
| 3.3.2 | <i>Triatoma dimidiata</i> | 11 |
| 3.3.3 | Hábitos alimenticios de <i>T. dimidiata</i> | 12 |
| 3.4 | Complejidad de los ciclos de transmisión de <i>T. cruzi</i> | 13 |
| 4 | OBJETIVOS..... | 15 |
| 4.1 | Objetivo general..... | 15 |
| 4.2 | Objetivos específicos..... | 15 |
| 5 | MATERIALES Y MÉTODOS..... | 16 |
| 5.1 | Flujograma del diseño experimental..... | 16 |
| 5.1.1 | Material biológico..... | 16 |
| 5.1.2 | Purificación del ADN total contenido en los tubos digestivos de <i>T. dimidiata</i> | 17 |
| 5.1.3 | Diagnóstico de infección con <i>T. cruzi</i> y determinación del estatus alimenticio de <i>T. dimidiata</i> | 18 |
| 5.1.4 | Poblaciones de estudio..... | 19 |
| 5.1.5 | Amplificación por PCR de los marcadores moleculares de interés..... | 20 |
| 5.1.6 | Purificación de los productos de PCR..... | 22 |
| 5.2 | Secuenciación masiva..... | 22 |
| 5.3 | Análisis de las secuencias..... | 22 |
| 5.3.1 | Secuencias de <i>T. cruzi</i> | 22 |

| | | |
|-------|---|----|
| 5.3.2 | Secuencias de <i>T. dimidiata</i> | 23 |
| 5.3.3 | Secuencias de vertebrados (fuentes alimenticias de <i>T. dimidiata</i>)..... | 23 |
| 5.4 | Análisis de Resultados | 24 |
| 5.4.1 | Red de interacciones..... | 24 |
| 5.4.2 | Análisis estadísticos | 24 |
| 6 | RESULTADOS..... | 25 |
| 6.1 | Diagnóstico de infección con <i>T. cruzi</i> y determinación del estatus alimenticio de <i>T. dimidiata</i> | 25 |
| 6.2 | Las DTUs de <i>T. cruzi</i> en las poblaciones de estudio de <i>T. dimidiata</i> | 29 |
| 6.3 | Grupos genéticos de <i>T. dimidiata</i> en las poblaciones de estudio..... | 31 |
| 6.4 | Fuentes alimenticias de las poblaciones de estudio de <i>T. dimidiata</i> | 34 |
| 6.5 | Estructura tentativa de los ciclos de transmisión de <i>T. cruzi</i> en nuestra zona de estudio. 41 | |
| 7 | DISCUSIÓN | 43 |
| 7.1 | Prevalencia de la infección de <i>T. dimidiata</i> con <i>T. cruzi</i> | 43 |
| 7.2 | Estatus alimenticio de <i>T. dimidiata</i> | 44 |
| 7.3 | Las DTUs de <i>T. cruzi</i> , grupos genéticos de <i>T. dimidiata</i> , y sus fuentes alimenticias en las poblaciones de estudio..... | 44 |
| 8 | CONCLUSIONES..... | 49 |
| 9 | REFERENCIAS..... | 50 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura 1 | Complejidad de los ciclos de transmisión de <i>T. cruzi</i> | 14 |
| Figura 2 | Metabarcoding basado en secuenciación de nueva generación..... | 15 |
| Figura 3 | Flujograma del diseño experimental..... | 16 |
| Figura 4 | Mapa de las localidades de colecta de <i>T. dimidiata</i> | 17 |
| Figura 5 | Prevalencia de la infección de <i>T. dimidiata</i> con <i>T. cruzi</i> en las localidades de estudio | 25 |
| Figura 6 | Prevalencia de la infección de <i>T. dimidiata</i> con <i>T. cruzi</i> en los ecotopos de estudio ... | 26 |
| Figura 7 | Prevalencia de la infección con <i>T. cruzi</i> en estadios y sexos de <i>T. dimidiata</i> | 26 |
| Figura 8 | Proporción de insectos alimentados por localidad de colecta. | 27 |
| Figura 9 | Proporción de insectos alimentados por ecotopos de colecta..... | 28 |
| Figura 10 | Proporción de insectos alimentados por estadio y sexo de <i>T. dimidiata</i> | 28 |
| Figura 11 | Distribución de las DTUs de <i>T. cruzi</i> identificadas en los insectos infectados, por ecotopos de colecta | 30 |
| Figura 12 | Distribución de las DTUs de <i>T. cruzi</i> identificadas en machos y hembras infectadas | 31 |

| | |
|---|----|
| Figura 13 Abundancia de los diferentes grupos genéticos de <i>T. dimidiata</i> por ecotopo de colecta..... | 33 |
| Figura 14 Prevalencia de infección de los grupos genéticos de <i>T. dimidiata</i> con <i>T. cruzi</i> | 33 |
| Figura 15 Red de interacciones entre las fuentes alimenticias de <i>T. dimidiata</i> | 39 |
| Figura 16 Representación gráfica de la estructuración espacial de los ciclos de transmisión de <i>T. cruzi</i> | 42 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|--|----|
| Cuadro 1. DTUs de <i>T. cruzi</i> reportadas en México y la península de Yucatán..... | 10 |
| Cuadro 2 Poblaciones de estudio..... | 20 |
| Cuadro 3 Marcadores moleculares de interés..... | 21 |
| Cuadro 4 Número de insectos por grupo genético de <i>T. dimidiata</i> , ecotopo de colecta, estatus de infección con <i>T. cruzi</i> , y DTU identificada. | 34 |
| Cuadro 5 Frecuencias de cada una de las fuentes alimenticias de los insectos infectados y no infectados. | 37 |

1 RESUMEN.

La enfermedad de Chagas es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, el cual es transmitido al humano y otros mamíferos principalmente por chinches hematófagas llamadas triatominos. El conocimiento preciso de los ciclos de transmisión de *T. cruzi* y su dinámica en los diferentes contextos eco-epidemiológicos, constituye una condición esencial para la implementación de estrategias de control sustentables. Recientemente, la metagenómica dirigida (metabarcoding) ha demostrado ser un abordaje altamente atractivo para contribuir a la descripción de los ciclos de transmisión gracias a la identificación simultánea, a partir del contenido intestinal de los triatominos; de la diversidad genética del parásito, la diversidad genética del vector y sus fuentes alimenticias.

En el presente trabajo se utilizó un este novedoso abordaje. A partir de especímenes de *Triatoma dimidiata* (el principal vector en la región) en tres localidades rurales de Yucatán, en ecotopos domésticos, peridomésticos y selváticos. Realizamos las identificaciones mencionadas anteriormente, e identificamos las asociaciones entre la diversidad genética de *T. cruzi*, la diversidad genética de *T. dimidiata*, sus fuentes alimenticias y los ecotopos de colecta para describir los patrones de alimentación e infección de *T. dimidiata* en los ciclos de transmisión de *T. cruzi*.

Las asociaciones entre el vector y sus fuentes alimenticias nos permitirán identificar a los potenciales reservorios de *T. cruzi*. Sin embargo, para confirmar el carácter de reservorio de *T. cruzi* de las fuentes alimenticias de *T. dimidiata*, es necesario caracterizar las interacciones parásito-reservorio a partir de sangre u órganos de las especies de fuentes alimenticias de *T. dimidiata* identificadas en este estudio.

La prevalencia de la infección de *T. dimidiata* con *T. cruzi* fue de 8.7% (54/618) (IC=0.067, 0.112). Los insectos colectados en los ecotopos peridomésticos no estuvieron infectados a diferencia de los insectos colectados en ecotopos domésticos y selváticos. Además, la infección fue significativamente mayor en los insectos colectados en los ecotopos domésticos que en los insectos colectados en los ecotopos selváticos.

La principal DTU identificada fue TcI, seguida por TcIV y TcII, se detectó infección con más de una DTU en el 28.3% (15/53) (IC=0.17,9, 0.415) de los insectos. La DTU TcI fue la más abundante en los ecotopos domésticos y la DTU TcIV fue la más abundante en los ecotopos selváticos, la diferencia fue estadísticamente significativa. Se detectaron insectos de los grupos genéticos ITS-2 grupo 2, ITS-2 grupo 3, e híbridos de estos en simpatria. Los insectos del grupo 2 estuvieron asociados a los ecotopos peridomésticos, donde, no hubo insectos infectados con *T. cruzi* y unas de las principales fuentes alimenticias identificadas fueron animales refractarios a la infección con *T. cruzi* (pavo y gallo).

En total, se identificaron 30 fuentes alimenticias. El 74% (89/121) (IC=0.650, 0.805) de los insectos que se alimentaron con más de una fuente (hasta 6 especies en un mismo insecto). El humano y el perro fueron las principales fuentes alimenticias del vector en los tres ecotopos de colecta. Además, las fuentes alimenticias secundarias de *T. dimidiata* variaron según los ecotopos de colecta. Todos estos resultados permitieron revelar una estructuración espacial de los ciclos de transmisión de *T. cruzi* que se distribuye entre los ecotopos domésticos, peridomésticos y selváticos con una conexión entre ecotopos dirigida por las fuentes alimenticias, principalmente por el humano y el perro.

Nuestros hallazgos representan un gran paso hacia adelante en la comprensión de los ciclos de transmisión de *T. cruzi*. Además, estos hallazgos pueden contribuir al desarrollo de estrategias efectivas y sustentables del control de la transmisión vectorial de *T. cruzi*.

2 INTRODUCCIÓN.

La enfermedad de Chagas, también conocida como tripanosomiasis americana, fue descubierta en 1909 por el médico brasileño Carlos Justiniano Chagas ¹. Esta enfermedad es causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, el cual es transmitido al humano y otros mamíferos principalmente a través de las heces contaminadas de chinches hematófagas de la subfamilia Triatominae ¹.

La enfermedad de Chagas es clasificada por la OMS dentro del grupo de las enfermedades tropicales desatendidas. Afecta mayormente a las poblaciones vulnerables y permanece como uno de los mayores problemas de salud pública, principalmente en América Latina, ocasionando hasta 10,000 muertes por año ¹. La enfermedad representa un cargo económico global de más de 7000 millones de USD por año, y es un obstáculo importante para el desarrollo económico y social de los países afectados. Por lo tanto, su eliminación es una prioridad mundial².

En este contexto, en el 2010, a los cien años del descubrimiento de la enfermedad de Chagas, la 63 Asamblea Mundial de la Salud (WHA63.20, por sus siglas en inglés) se declaró que, para el control y la eliminación de la enfermedad de Chagas, “Todas las rutas de transmisión (a saber, vectorial, oral, materno-fetal, transfusiones y trasplantes de órganos) tienen que ser abordadas, y en particular, la transmisión vectorial doméstica en América Latina; esto con en el entendido de que la eliminación significa la interrupción estable de la transmisión de la infección” ³.

Para el desarrollo de estrategias de control de la transmisión vectorial, el conocimiento preciso de los ciclos locales de transmisión de *T. cruzi* es una condición esencial ^{4,5}. Sin embargo, lograr este conocimiento es complicado debido a la extrema diversidad genética del parásito, de especies o subespecies de triatominos involucradas, así como de reservorios involucrados ⁴⁻⁶.

En el presente trabajo se utilizó un abordaje novedoso basado en secuenciación de nueva generación para identificar simultáneamente la diversidad del parásito, del vector, y de sus fuentes alimenticias ⁵. La identificación simultánea de todos estos componentes y de sus interacciones contribuyó a inferir los ciclos de transmisión de *T. cruzi* y su dinámica; crear las posibles redes de transmisión del patógeno y ubicar organismos claves en la

transmisión. El conocimiento aquí generado es clave para poder ubicar situaciones de riesgo y desarrollar estrategias de control de la transmisión eficaces y sustentables ^{5,7,8}.

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Parasitología del Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi, en el marco de diferentes proyectos que tienen como parte de sus objetivos la descripción y comprensión de los ciclos locales de transmisión de *T. cruzi* y de su dinámica.

3 ANTECEDENTES.

3.1 Generalidades sobre la enfermedad de Chagas.

La enfermedad de Chagas es causada por el parásito protozoario *T. cruzi*, transmitido principalmente a través de las heces contaminadas de chinches hematófagas llamadas triatomíneos. La infección también se puede adquirir mediante transfusiones sanguíneas, transmisión congénita (de una madre infectada a su hijo), trasplante de órganos, y por vía oral al consumir alimentos o bebidas contaminadas con el parásito ^{1,3}.

3.1.1 Epidemiología.

La enfermedad de Chagas es endémica en 21 países de América Latina y el Sur de Estados Unidos. Sin embargo, debido a las migraciones humanas, en las últimas décadas se han reportado casos fuera de América, en Europa por ejemplo, donde no existe el insecto vector, pero existe transmisión del parásito por transfusiones sanguíneas, transmisión congénita y trasplantes de órganos ¹.

Se estima que en todo el mundo hay 8 millones de personas infectadas y en México 1.1 millones⁹. Sin embargo, las estimaciones más recientes sugieren una seroprevalencia nacional de 3,38%, lo que significa que alrededor de 4 millones de personas podrían ser portadoras del parásito en el país ^{1,10}. Para el estado de Yucatán, se estima que existen de 13,800 a 62,000 personas infectadas ^{10,11}. Con el fin de reducir la incidencia de la enfermedad de Chagas en México, se elaboró el Programa de Acción Específica para la Vigilancia, Prevención y Control de la enfermedad de Chagas 2013-2018 que se encuentra alineado a los objetivos y estrategias regionales planteadas por la OMS/OPS ^{2,12}. Las estrategias a seguir para lograr los objetivos están basadas en el control de la

transmisión vectorial domiciliaria y la eliminación de la transmisión por transfusión sanguínea y congénita ^{2,12}.

3.1.2 Fisiopatología.

La enfermedad de Chagas tiene 2 fases clínicas diferenciadas llamadas fase aguda y fase crónica. La fase aguda dura unos 2 meses después de contraerse la infección. Durante esta fase, los parásitos circulan por el torrente sanguíneo. En la mayoría de los casos no hay síntomas o estos son leves y no específicos ¹.

La fase crónica se divide en 2 etapas. La primera, conocida como etapa asintomática, se caracteriza por la presencia de los parásitos principalmente en el músculo cardíaco y/o músculo del tracto digestivo y la ausencia de síntomas de la infección. Esta puede durar de 20 a 40 años ¹. Después de este tiempo, se estima que del 30% al 40% de los pacientes pasan a una etapa sintomática caracterizada por la presencia de trastornos cardíacos y/o alteraciones digestivas (típicamente, agrandamiento del esófago o del colon). La cardiomiopatía chagásica crónica es la manifestación clínica más frecuente y grave. Algunos signos clínicos de cardiomiopatía chagásica incluyen anomalías en la función eléctrica del corazón y cardiomiopatía dilatada progresiva, que pueden provocar una insuficiencia cardíaca y la muerte.

3.1.3 Estrategias de control.

Para evitar el aumento en la prevalencia de la enfermedad de Chagas es esencial la implementación de estrategias enfocadas en la interrupción de la transmisión de *T. cruzi*. El tamizaje universal en los bancos de sangre y el control de vectores son las principales estrategias en América Latina ¹. El control de vectores se sigue basando principalmente en el rociado masivo de insecticidas. Sin embargo, debido a la falta de sustentabilidad del rociado de insecticidas, se han comenzado a implementar estrategias alternativas basadas en abordajes más integrales, como el abordaje de ecosalud, mediante las cuales se busca limitar el contacto entre las personas y los vectores en los diferentes contextos socio-eco-epidemiológicos ¹³⁻¹⁸.

El diseño exitoso de este tipo de estrategias para el control sustentable de la transmisión vectorial de *T. cruzi* requiere, entre otros, un conocimiento exhaustivo de la ecología de los vectores en los diferentes contextos socio-eco-epidemiológicos, así como de los ciclos

de transmisión locales del patógeno y su dinámica ⁴⁻⁶. Sin embargo, lograr este conocimiento es un desafío, debido a la diversidad de organismos involucrados en los ciclos de transmisión ⁴⁻⁶.

3.2 *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas

3.2.1 Ciclo de vida.

A lo largo de su ciclo de vida, *T. cruzi* presenta 3 estadios: amastigote, epimastigote, y su forma infectiva: tripomastigote ¹⁹.

Las formas infectivas del parásito *T. cruzi* (tripomastigotes) circulan en el torrente sanguíneo de los reservorios mamíferos. El vector triatomino se infecta al alimentarse de la sangre que contiene parásitos circulantes ²⁰.

Los tripomastigotes ingeridos se transforman en epimastigotes en la parte anterior del intestino del vector. En la parte posterior del intestino los epimastigotes se multiplican por fisión binaria. Finalmente, los epimastigotes llegan al recto del vector y se diferencian en tripomastigotes (su forma infecciosa). Posteriormente, el vector, al alimentarse, puede defecar cerca del sitio de succión de la sangre. Los parásitos contenidos en las heces entran al organismo del mamífero, esto sucede por la reacción del mamífero de rascarse y dispersar las heces hacia la herida de succión o membranas mucosas ^{20,21}.

Dentro del mamífero, los tripomastigotes invaden las células cerca del sitio de inoculación, donde se diferencian en amastigotes intracelulares. Los amastigotes se multiplican por fisión binaria y se diferencian en tripomastigotes, luego se liberan en el torrente sanguíneo ^{20,21}.

Los tripomastigotes del torrente sanguíneo no se replican. La replicación se reanuda solo cuando los parásitos entran en otra célula o son ingeridos por otro vector ^{20,21}. Los tripomastigotes infectan las células de una variedad de tejidos (principalmente cardiacos y digestivos) y se transforman en amastigotes intracelulares en los nuevos sitios de infección teniendo como consecuencia las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas ^{20,21}.

3.2.2 Diversidad genética.

Trypanosoma cruzi se caracteriza por tener una amplia diversidad genética intraespecífica ^{4,22,23}.

La genética de poblaciones de *T. cruzi* sugiere que la clonalidad es el modo de propagación más importante de las poblaciones naturales del parásito. Sin embargo, también existen eventos de recombinación que generan diversidad genética del parásito ^{22,24–26}.

Esta diversidad genética se divide tradicionalmente en 7 unidades de tipificación discretas (DTUs) nombradas TcI a TcVI y Tcbat ^{27,28}. Las relaciones evolutivas entre las DTUs no se han aclarado del todo. Sin embargo, se sugiere que TcV y TcVI tienen un origen híbrido con TcII y TcIII como padres putativos ^{28,29}. De acuerdo con algunos autores, TcIII y TcIV pudieran también haberse originado por hibridación entre TcI y TcII ^{28,30} pero otros autores dicen que no es el caso ³¹. Las DTUs TcI y TcII permanecen como dos líneas puras que se desarrollaron a partir de un ancestro común que data de 1-3 millones de años ^{31,32}.

La clasificación de los grupos genéticos del parásito en las 7 unidades de tipificación discreta (DTUs) ha sido usada como referencia en estudios epidemiológicos. Sin embargo, no hay consenso para identificar las diferentes DTUs ya que existen reportes sobre las caracterizaciones moleculares de las 7 DTUs basados en varias técnicas moleculares, pero hasta la fecha no se ha logrado establecer un protocolo estándar que sea aceptado internacionalmente para la tipificación de las DTUs ^{24,33–41}.

3.2.3 Implicaciones de la diversidad genética de *T. cruzi*

Se ha propuesto que esta diversidad genética del parásito (DTUs) está asociada con distintos ciclos de transmisión y hospederos específicos (vectores y reservorios), distribución geográfica, así como con la diversidad de manifestaciones clínicas y patrones de progresión de la enfermedad en pacientes y reservorios mamíferos ^{28,42–47}.

Por ejemplo, después de una infección aguda, sintomáticos o no, los pacientes pueden vencer la infección o evolucionar a la fase crónica asintomática desde la cual pueden cambiar a la fase crónica sintomática, pudiendo presentar trastornos cardíacos clínicamente diferentes, formas digestivas o cardio-digestivas ⁴⁸. Esta diversidad de

presentaciones clínicas de la enfermedad está, al menos en parte, vinculada a la diversidad genética del parásito ^{44,49}.

Así mismo, se ha demostrado que el tropismo tisular y respuesta a tratamientos en los modelos animales varían según la diversidad genética del parásito infectante ⁴⁹. Sin embargo, el vínculo causal entre tropismo tisular y daño no es claro, ya que la autoinmunidad provocada por los parásitos puede dañar órganos incluso en ausencia de una gran carga parasitaria ^{50,51}. El balance entre estas respuestas podría depender parcialmente de los determinantes genéticos del parásito, pero también de la genética del hospedero (vectores y reservorios) ^{52,53}.

También, se ha documentado que dependiendo de la región geográfica de procedencia de los pacientes chagásicos se distinguen características clínicas específicas y las DTUs parecen diferir en términos de patogenicidad y respuestas al tratamiento ^{41,54,55}. Tanto TcI como TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI están asociadas con lesiones cardíacas en infecciones humanas, pero parece que solo TcII, TcIV, TcV están asociadas con lesiones del tracto digestivo ⁴¹.

En general, la DTU TcI se considera menos patógena con parasitemias inferiores ⁵⁶. Además, las infecciones con TcI son características por presentar casos clínicos crónicos asintomáticos en comparación con los casos de Chagas causados por TcII, TcV y TcVI principalmente en Argentina, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay ⁵⁷.

En cuanto a la distribución geográfica diferencial de las DTUs, está claro que TcI es la DTU predominante desde el sur de Norte América hasta el Norte de Argentina y Chile, asociada tanto a ciclos de transmisión selváticos como domésticos. Además, es caracterizada como la principal DTU responsable de la enfermedad de Chagas en países endémicos de esta tripanosomiasis ^{15,22,58}.

Por contraste, TcII, TcIV, TcV y TcVI se distribuyen principalmente en el Cono Sur y generalmente son caracterizadas en los ciclos de transmisión selváticos en áreas con ecosistemas de bosque tropical ^{22,59,60}.

Esta caracterización de la distribución no necesariamente implica exactitud de la distribución de las DTUs ya que la información disponible para las áreas que incluyen países como Guatemala o México se sugiere incompleta ^{15,22,23,33}.

En conjunto, estos datos evidencian brechas importantes en el conocimiento actual de la implicación de la diversidad genética de *T. cruzi*, y una falta de conocimiento en cuanto a la distribución geográfica de esta diversidad, principalmente en Centro y Norteamérica.

3.2.4 Caracterización de la diversidad de DTUs en México y Yucatán

Para México se ha reportado TcI como la DTU predominante seguida de TcIV ^{15,22,43,61,62}. Sin embargo, estudios recientes documentan la presencia de DTUs adicionales en triatomíneos y reservorios vertebrados (Cuadro 1) ^{23,63–65}. Considerando que hasta hace unos años únicamente se reportaba TcI en México, es interesante que se haya documentado la presencia de DTUs adicionales no-TcI. Esto no necesariamente significa un cambio en la distribución de las DTUs y pudiera ser únicamente un resultado de la multiplicación de los estudios y/o la mejora de los métodos de genotipificación de *T. cruzi*.

Por ejemplo, estudios recientes basados en secuenciación de nueva generación con alta sensibilidad detectaron infección con más de una DTU en vectores triatomíneos, reservorios vertebrados, y humanos ^{47,66,67}.

De igual manera, en el Sureste de México se ha detectado mayor diversidad de DTUs, teniendo reportes de hasta cuatro DTUs (TcI, TcII, TcV y TcVI) en *T. dimidiata* ^{23,67} y en el caso de pacientes chagásicos también en el Sureste de México (Yucatán), se detectaron haplotipos que cubren las DTUs TcI, TcII, TcV y TcVI, con 3.9 ± 0.7 haplotipos por paciente, y el 47% de los pacientes albergaba infecciones con múltiples DTUs. La mayoría de los haplotipos de parásitos de los pacientes fueron idénticos o similares a los de *T. dimidiata* de la misma región, lo que confirma su circulación local ⁴⁷.

La identificación de las DTUs en los reservorios vertebrados (incluido el humano) y sus vectores triatomíneos es una de las claves para entender la dinámica de los ciclos de transmisión de *T. cruzi*, la eco-epidemiología, la diversidad de manifestaciones clínicas, y los patrones de progresión de la infección por *T. cruzi*. ^{45–47,68,69}.

Cuadro 1. DTUs de *T. cruzi* reportadas en México y la península de Yucatán. Se indica si se detectaron múltiples DTUs, se indican los reservorios o vectores donde las DTUs se identificaron, y ecotopos de muestreo.

| DTUs identificadas | Detección de multi- infección | Ecotopos de colecta | Reservorios o vectores donde se identificaron | Áreas de muestreo | Referencias |
|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|---|----------------------|-------------|
| TcI, TcII, TcIII, y TcIV | Sí | domésticos | <i>Meccus pallidipennis</i> <i>Triatoma longipennis</i> <i>Triatoma barberi</i> | Michoacán | 61 |
| TcI, TcII, TcIII, TcIV y TcV | No | domésticos /peridomésticos | <i>T. dimidiata</i> | Veracruz | 43 |
| TcI, TcII y TcVI | Sí | selváticos y domésticos | Animales mamíferos <i>T. dimidiata</i> | Península de Yucatán | 62 |
| TcI | No | domésticos / peridomésticos | <i>T. dimidiata</i> | Península de Yucatán | 70 |
| TcI | No | domésticos / peridomésticos | <i>Didelphis virginiana</i> | Yucatán | 71 |
| TcI, TcII, TcIII, TcIV y TcVI | No | domésticos | <i>T. dimidiata</i> | Yucatán | 72 |
| TcI y TcIV | No | domésticos | Roedores, <i>T. dimidiata</i> | Península de Yucatán | 15 |
| TcI, TcII, TcV y TcVI | Sí | domésticos y selváticos | <i>T. dimidiata</i> | Yucatán | 23 |
| TcI, TcII, TcV y TcVI | Sí | | Humanos | Yucatán | 47 |

3.2.5 Reservorios de *T. cruzi*

Trypanosoma cruzi es capaz de infectar una amplia gama de mamíferos ^{1,73} que cubren diversos órdenes, incluyendo Marsupialia, Rodentia, Lagomorpha, Chiroptera, Carnivora y Primata ^{74,75}. En total, se han reportado más de 180 especies de mamíferos infectados con *T. cruzi* ⁷⁶. La infección puede tener resultados variables en los diferentes órdenes taxonómicos, posiblemente por las características particulares en la adquisición de la infección y/o la dinámica dentro del reservorio que pueden influir en la diversidad de DTUs circulantes, virulencia, etc ⁶⁶.

3.3 Los triatominos, vectores de *T. cruzi*.

3.3.1 Generalidades

Los triatominos son insectos que desarrollan una metamorfosis incompleta. El ciclo de vida comprende el huevo, cinco estadios ninfales y el imago o individuo adulto ⁷⁷.

Los triatominos son insectos hematófagos obligatorios, es decir, se alimentan de sangre de vertebrados y se caracterizan por poseer aparato bucal tipo succionador ⁷⁷. Pertenecen a la subfamilia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), y se dividen en cinco tribus (Alberproseniini, Bolboderini, Cavernicolini, Rodniini y Triatomini) y 14 géneros distribuidos en América, África, Asia y Australia ^{78,79}. Se reconocen más de 140 especies, de las cuales más de la mitad mostraron ser naturalmente o experimentalmente infectadas con *T. cruzi*, y se cree que todas son posiblemente infectables y vectores potenciales ⁸⁰.

Los triatominos se alimentan de la sangre de una gran variedad de vertebrados incluyendo animales selváticos, domésticos, sinantrópicos (animales que conviven con el humano, pero no son domésticos ⁸¹) y humanos ⁷⁶. Estos pueden ser mamíferos, potencialmente susceptibles a la infección por *T. cruzi*, o bien reservorios incompetentes, es decir refractarios a la infección por *T. cruzi*, como aves, reptiles y anfibios ^{4,82,83}.

Las especies de vectores triatominos se han clasificado tradicionalmente de acuerdo al grado de adaptación a los ecotopos domésticos/peridomésticos (viviendas humanas y sus alrededores) o selváticos (selvas conservadas o perturbadas; áreas con vegetación conservada o vegetación secundaria, respectivamente) ⁸⁴. Sin embargo, varias especies selváticas son capaces de invadir las casas con diferentes grados de éxito, lo que hace de esta clasificación una herramienta poco operacional para fines de control vectorial ⁸⁵.

México alberga una de las poblaciones de triatominos más diversas, con 39 especies documentadas en el país, de las cuales al menos 21 han sido encontradas infectadas por *T. cruzi*. Para el estado de Yucatán el principal vector de *T. cruzi* es *T. dimidiata* ¹¹.

3.3.2 *Triatoma dimidiata*

Triatoma dimidiata es uno de los vectores más importantes de la enfermedad de Chagas. Se encuentra ampliamente distribuido por México, Centro América, Colombia, Venezuela, Ecuador y Perú ⁶⁶.

Triatoma dimidiata exhibe una diversidad genética sustancial, así como una extensa diversidad en morfología, hábitat y comportamiento ^{86,87}. Estudios moleculares basados

en el espacio del transcrito interno 2 (ITS-2) sugieren subdivisión de la especie *T. dimidiata* en cuatro linajes monofiléticos (1A, 1B, 2 y 3), los cuales se cree pueden tener diferencias en la capacidad vectorial e importancia epidemiológica ⁸⁸.

Recientemente, se realizó un estudio basado en el genotipaje de todo el genoma que propone la reunión de los grupos 1A, 1B y 2 (1-2), conservar el grupo 3 anteriormente definido, y propone un nuevo linaje monofilético llamado “cave” ⁸⁷. En otros estudios recientes se propone al grupo 3 como una especie nueva llamada *T. huehuetenanguensis* ^{89,90}.

En Yucatán, los grupos genéticos presentes son el 2, 3 e híbridos de estos ^{88,91}. En esta región, *T. dimidiata* tiene un comportamiento principalmente intrusivo, es decir, desarrolla su ciclo de vida principalmente en ecotopos selváticos, pero también vuela hacia las casas en búsqueda de alimento, sin poder establecer colonias sustentables dentro de las casas ⁸⁵. Por lo tanto, se sugiere que existe una movilización entre los ecotopos domésticos, peridomésticos y selváticos ^{22,75,91–93}. Los niveles de infestación por *T. dimidiata* en ecotopos domésticos en Yucatán varían según la temporada con una mayor infestación durante la estación cálida y seca de marzo a junio ^{94,95}.

La prevalencia de la infección de *T. dimidiata* con *T. cruzi*, es de alrededor el 30%, con una tasa de infección mayor en el grupo genético conocido como híbrido ^{8,19,91}.

3.3.3 Hábitos alimenticios de *T. dimidiata*

Triatoma dimidiata se reconoce como una especie de hábitos alimenticios generalistas, pues se ha reportado que se alimenta de una gran variedad de animales vertebrados incluyendo mamíferos, aves y anfibios ^{23,96–98}.

En México se han reportado fuentes alimenticias de *T. dimidiata* tanto selváticos (murciélago, rata y ratón selváticos) como domésticas (perro y ganado, además de burro, gato, ratón y rata doméstica) y fuentes alimenticias sinantrópicas (principalmente zarigüeya) ^{99,100}.

Para el estado de Yucatán las fuentes alimenticias reportadas de *T. dimidiata* incluyen animales domésticos como el perro y aves de corral; sinantrópicos como la zarigüeya y selváticos como el armadillo; además del humano ^{97,98}. Sin embargo, en estudios

recientes realizados a partir de poblaciones naturales de *T. dimidiata* colectadas en ecotopos selváticos y domésticos, se encontró que las principales fuentes alimenticias eran humano, perro y vaca, indiferentemente de los ecotopos de colecta de los triatomíneos, y no se encontró zangüeya^{8,23}.

Tener la información precisa de las fuentes alimenticias de *T. dimidiata* en los ecotopos domésticos, peridomésticos y selváticos es esencial para el desarrollo de estrategias de control de la transmisión de *T. cruzi* ya que orienta hacia los animales que tienen los papeles más importantes en la transmisión del parásito hacia el humano^{5,68,69}.

3.4 Complejidad de los ciclos de transmisión de *T. cruzi*

Los ciclos de transmisión de *T. cruzi* están determinados por la ecología y el comportamiento de sus reservorios vertebrados y sus vectores en sus entornos específicos, y moldeados por las asociaciones entre el parásito, sus vectores, y sus reservorios vertebrados⁴. En consecuencia, la identificación exhaustiva de estas interacciones es esencial para entender los ciclos de transmisión del patógeno, comprender su dinámica, identificar situaciones de riesgo y desarrollar estrategias de control de la transmisión vectorial efectivas y sustentables⁵.

Sin embargo, esto puede llegar a ser complicado debido a la diversidad extraordinaria de organismos involucrados en los ciclos de transmisión de *T. cruzi*, lo que dificulta la identificación de estas interacciones. En efecto, como lo expuesto anteriormente, *T. cruzi*, exhibe una gran diversidad genética, la cual se divide en 7 DTUs, transmitidas por alrededor de 140 especies diferentes de triatomíneos a más de 180 especies de mamíferos, incluyendo animales selváticos, sinantrópicos, domésticos, y el humano. En paralelo, los triatomíneos se alimentan también de la sangre de animales refractarios a la infección por *T. cruzi* (Figura 1).

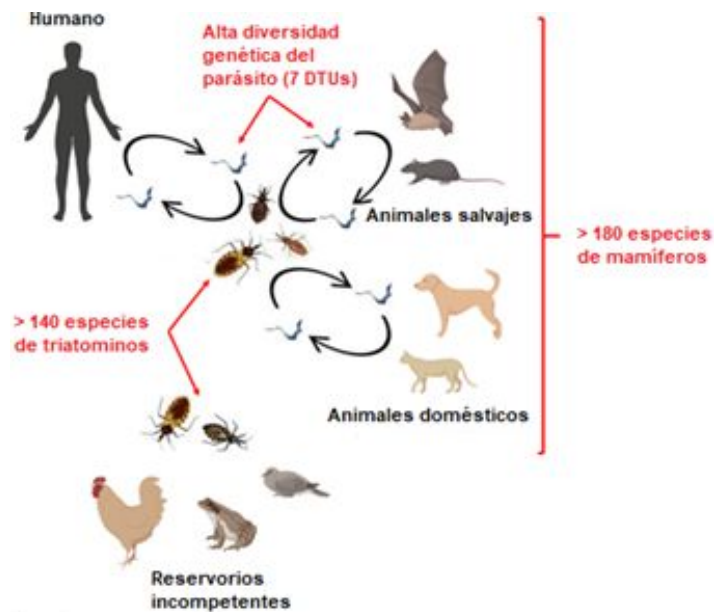


Figura 1 Complejidad de los ciclos de transmisión de *T. cruzi*. Tomado de Hernández *et al.*, 2019.

Recientemente, se ha propuesto en nuestro laboratorio un abordaje basado en secuenciación de nueva generación, que permite identificar de manera simultánea y con alta sensibilidad, la diversidad genética del vector, sus fuentes alimenticias, y la diversidad genética del parásito ^{5,23}.

Este abordaje, llamado metabarcoding, se ilustra en la figura 2; A partir del ADN total contenido en el intestino del vector, se amplifican por PCR y se secuencian de manera simultánea diferentes marcadores moleculares de interés, en este caso marcadores que permiten la identificación de la genética del vector, la genética del parásito y las fuentes alimenticias del vector ^{5,23}. Por lo tanto, la aplicación de este abordaje representa un gran paso hacia adelante para ayudar a inferir los ciclos de transmisión de *T. cruzi*.

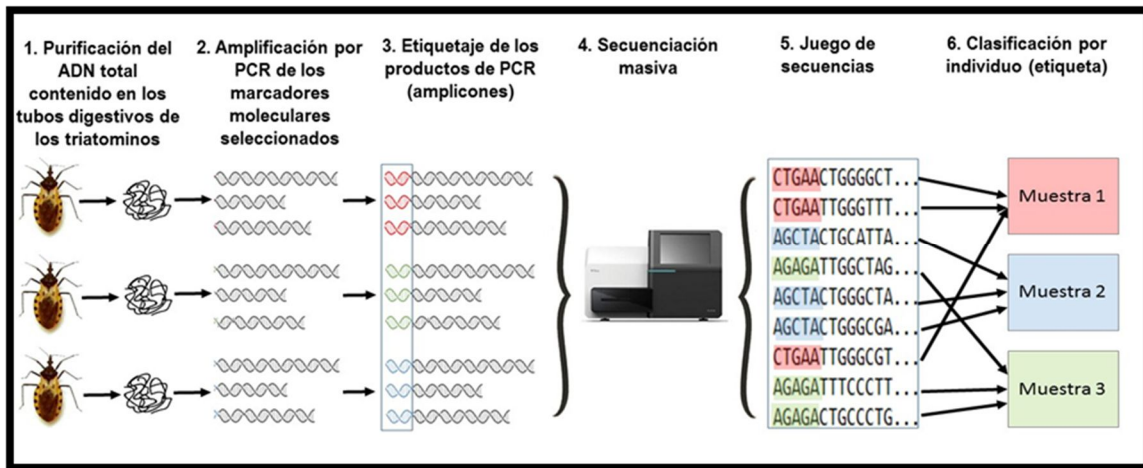


Figura 2 Metabarcoding basado en secuenciación de nueva generación aplicado para la identificación de las asociaciones ecológicas de los triatominos. Tomado de Waleckx *et al.*, 2019.

4 OBJETIVOS.

4.1 Objetivo general.

Identificar las asociaciones entre la diversidad genética de *T. cruzi*; la diversidad genética de *T. dimidiata*; sus fuentes alimenticias, y los ecotopos; para inferir los ciclos de transmisión de *T. cruzi* y su dinámica en tres localidades rurales de Yucatán.

4.2 Objetivos específicos.

- Identificar la diversidad genética de *T. cruzi*; la diversidad genética de *T. dimidiata* y la diversidad de sus fuentes alimenticias; en ecotopos domésticos, peridomésticos y selváticos en tres localidades rurales de Yucatán.
- Evaluar si existen asociaciones entre la diversidad genética de *T. cruzi* y la diversidad genética de *T. dimidiata*; sus fuentes alimenticias y los ecotopos.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Flujograma del diseño experimental

Se presenta el flujograma general de actividades del diseño experimental del presente estudio (Figura 3.).

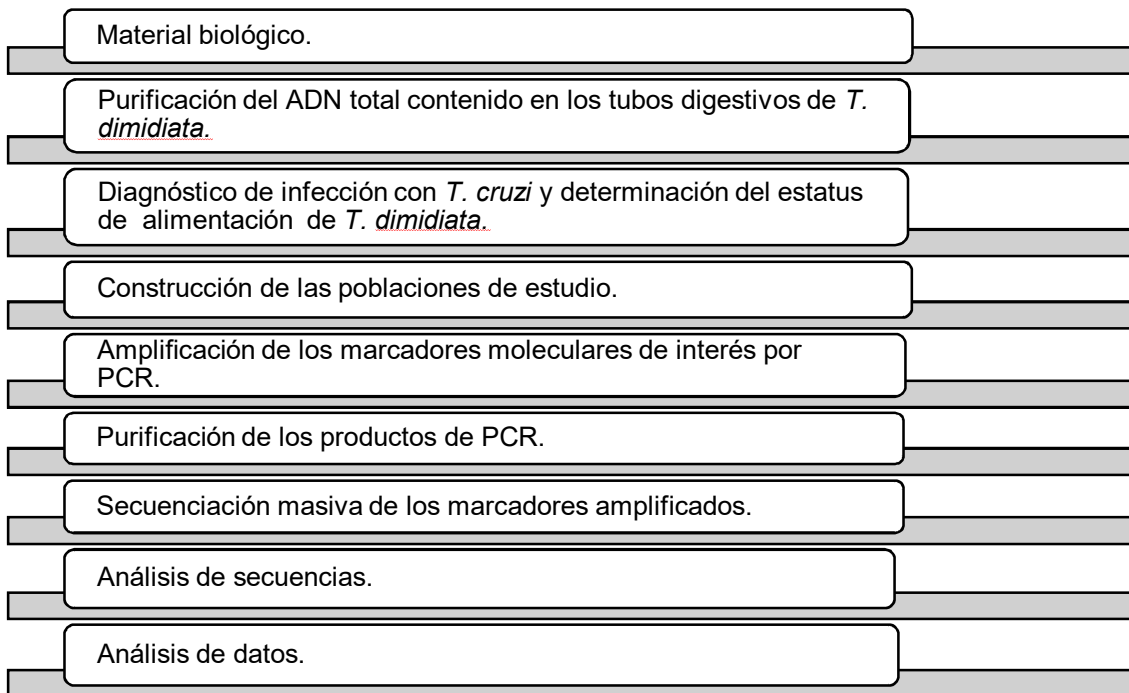


Figura 3 Flujograma del diseño experimental

5.1.1 Material biológico

Fue empleado material biológico obtenido a partir de un muestreo de *T. dimidiata* realizado entre los meses de marzo a junio; durante los años 2017 y 2018; en ecotopos domésticos (dentro de las casas) y peridomésticos (gallineros y traspatios de las casas); de los pueblos de Sudzal (20°52'19"N, 88°59'20"O), Chumbec (20°48'10"N 88°48'49"O) y Teya (21°02'55"N, 89°04'25"O) así como en los alrededores de estos pueblos (ecotopos selváticos; áreas conformadas principalmente por vegetación secundaria, resultado de los cambios de uso de suelo en la región, conocidas localmente como "monte").

Se seleccionaron aleatoriamente 618 especímenes de *T. dimidiata*. Además, se incluyó un espécimen de *T. dimidiata* no infectado y alimentado únicamente con paloma procedente de nuestro insectario como control.

El clima regional en el área de muestreo es cálido y húmedo, con una temperatura media anual de 26 ° C y 1150 mm de lluvia (Figura 4). Las principales actividades son: la caza, la ganadería, la producción de carbón y el cultivo de la milpa. Además, los traspatios son áreas utilizadas para la producción de vegetales y animales que se utilizan para el autoconsumo ^{107,108}.

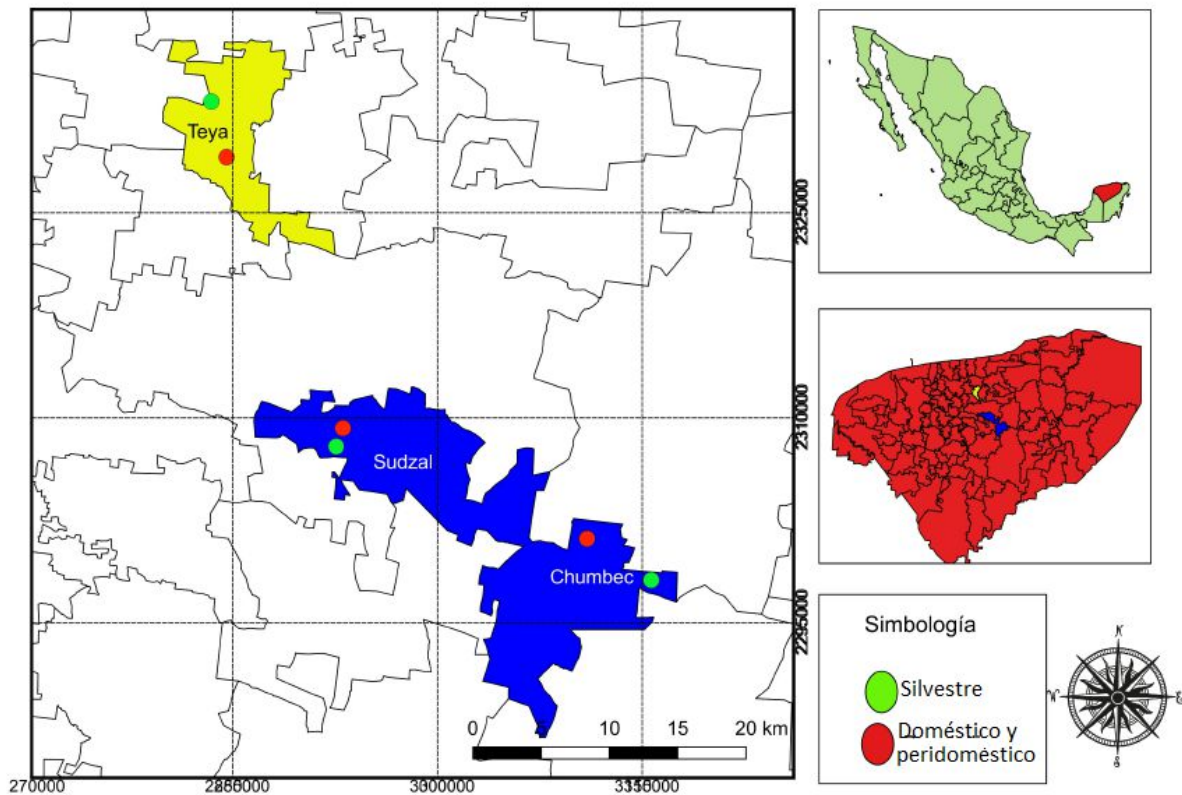


Figura 4 Mapa de las localidades de colecta de *T. dimidiata*. Los círculos rojos indican las áreas de los ecotopos domésticos y peridomésticos, los círculos verdes indican los ecotopos selváticos.

5.1.2 Purificación del ADN total contenido en los tubos digestivos de *T. dimidiata*

El ADN del contenido intestinal de cada uno de los 618 insectos colectados y del insecto control se aisló utilizando el kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN purificado se cuantificó usando un espectrofotómetro BioSpec (Shimadzu Biotech, Kyoto, Japón).

5.1.3 Diagnóstico de infección con *T. cruzi* y determinación del estatus alimenticio de *T. dimidiata*

Para el diagnóstico de infección de los insectos con *T. cruzi*, se amplificó el ADN extraído del contenido intestinal de cada uno de los insectos mediante PCR usando los cebadores TCZ¹⁰⁹ (Cuadro 3). Estos cebadores están diseñados para la amplificación de una porción repetida del ADN satélite de *T. cruzi* (Cuadro 3).

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador T100TM (Biorad, Hercules, CA, EE. UU.), en un volumen de 10 µl que contenía 1 µl de ADN total (~30 ng), 0,2 µM de cada cebador y 5 µl de master mix green DreamTaq 2X (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Los parámetros para la amplificación fueron una etapa de desnaturalización inicial a 94 ° C durante 10 min; 29 ciclos a 94 ° C (20 segundos), 55 ° C (10 segundos) y 72 ° C (30 segundos); y una extensión final de 7 minutos a 72 ° C. Siempre se incluyeron controles positivos (ADN de *T. cruzi* purificado) y negativos (H₂O ultrapura) para cada PCR.

Después de la amplificación, los productos de PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1,0% que contenía bromuro de etidio y se visualizaron por transiluminación UV. Si el fragmento de 188 pb esperado se visualizaba después de la electroforesis, la muestra se clasificaba como "infectada".

Para determinar el estatus alimenticio de los insectos (alimentados/ no alimentados) se amplificó el ADN extraído del contenido intestinal de cada uno de los insectos mediante PCR usando los cebadores L1085 y H1259^{68,110} (Cuadro 3). Estos cebadores son universales para vertebrados y están diseñados para la amplificación de un fragmento de ~ 215 pb del gen mitocondrial del ARN ribosomal 12S¹¹⁰. Las amplificaciones se realizaron en un volumen total de 20 µl que contenía ~ 30 ng de ADN total, 0,2 µM de cada cebador y 10 µl de master mix green DreamTaq 2X (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.).

Los parámetros para la amplificación fueron una etapa de desnaturalización inicial a 95 ° C durante 5 min; seguido de 34 ciclos a 95 ° C (30 segundos), 60 ° C (15 segundos) y 72 ° C (30 segundos); y una extensión final de 10 minutos a 72 ° C. Siempre se incluyeron controles positivos (ADN humano) y negativos (H₂O ultra pura). Después de la

amplificación, los productos de PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1,0% que contenía bromuro de etidio y se visualizaron por transiluminación UV. Si el fragmento de ~ 215 pb esperado se visualizaba después de la electroforesis, la muestra se clasificaba como "alimentado". Si el fragmento no se visualizaba, se realizó una segunda PCR bajo las mismas condiciones, pero sustituyendo la muestra de ADN por el 1° producto de amplificación. Nuevamente, los productos de PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa. Si el fragmento de ~ 215 pb esperado se visualizaba después de la electroforesis, la muestra se clasificaba como "alimentado".

5.1.4 Poblaciones de estudio

Una vez realizados los diagnósticos de la infección con *T. cruzi* y del estatus alimenticio de los 618 especímenes de *T. dimidiata* y el insecto control se construyeron las poblaciones de estudio. Debido a que detectamos una baja prevalencia insectos infectados y con el fin de poder obtener la mayor información posible de cada uno de los insectos se hicieron poblaciones con insectos provenientes de cada uno de los ecotopos de colecta (domésticos, peridomésticos, selváticos) y de cada localidad, procurando aprovechar el mayor número posible de insectos infectados, y que los insectos seleccionados estuvieran preferentemente alimentados.

En total, de los insectos colectados y procesados se seleccionaron 53 insectos infectados con *T. cruzi* y 73 no infectados (N=126), los cuales se clasificaron en 3 poblaciones. Las características de los insectos se presentan en el Cuadro 2. No se detectó infección con *T. cruzi* en los insectos colectados en ecotopos peridomésticos. Por lo tanto, esta población está constituida únicamente por insectos no infectados (Cuadro 2.).

De los insectos colectados y seleccionados para construir nuestras poblaciones, 110 de los insectos fueron adultos de los cuales 52 (47%) estuvieron infectados, 16 de los insectos fueron ninfas de las cuales solo 1 (6%) estuvo infectada con *T. cruzi*.

Cuadro 2 Poblaciones de estudio. Se indica el número de insectos por localidad y por ecotopos, así como el estatus de infección con *T. cruzi*.

| Poblaciones de estudio | | | | | | |
|------------------------|----------------------------------|------------------------|----------------------------------|------------------------|--------------------------------------|--|
| Localidad de colecta | Población de ecotopos domésticos | | Población de ecotopos selváticos | | Población de ecotopos peridomésticos | Total de insectos de <i>T. dimidiata</i> |
| | Insectos sin infección | Insectos con infección | Insectos sin infección | Insectos con infección | Insectos sin infección | |
| Chumbec | 9 | 5 | 12 | 5 | 2 | 33 |
| Sudzal | 6 | 15 | 12 | 1 | 8 | 42 |
| Teya | 6 | 20 | 12 | 7 | 6 | 51 |
| Total | 21 | 40 | 36 | 13 | 16 | 126 |
| | 61 | | 49 | | 16 | 126 |

De los insectos adultos 63 fueron hembras de las cuales 34 (54%) estuvieron infectadas con *T. cruzi* y 47 fueron machos de los cuales 18 (38%) estuvieron infectados con *T. cruzi*.

5.1.5 Amplificación por PCR de los marcadores moleculares de interés.

A partir del ADN total purificado del contenido intestinal de cada uno de los insectos se amplificaron, mediante PCR, diferentes marcadores moleculares de interés para la posterior identificación de; (i) grupos genéticos de *T. dimidiata*; (ii) fuentes alimenticias de *T. dimidiata*, y (iii) DTUs de *T. cruzi*.

La amplificación y la visualización de los amplicones se realizaron como se mencionó anteriormente (apartado C). Las condiciones de PCR para la amplificación de cada uno de los marcadores se presentan en el Cuadro 3.

Una vez confirmada la presencia de las bandas esperadas (ver Cuadro 3) de cada uno de los marcadores, los volúmenes restantes de las reacciones de PCR (~ 18 µl) fueron mezclados en tubos herméticos de 1.5 µl, por insecto, dando un volumen final de ~ 36 a 72 µl en cada tubo.

Cuadro 3 Marcadores moleculares de interés para la identificación de: (i) grupos genéticos de *T. dimidiata*, (ii) DTUs de *T. cruzi*, y (iii) fuentes alimenticias de *T. dimidiata*. De igual manera se enlistan los cebadores específicos para cada marcador, y las condiciones de PCR para la amplificación de cada marcador, así como el peso molecular del fragmento esperado (pb: pares de bases). DI: desnaturalización inicial, H: hibridación, E: elongación, EF: elongación final y H: hold.

| Identificación | Marcador | Tamaño del fragmento esperado | Cebadores | Condiciones de PCR | Ref |
|--|---|---|--|---|--------|
| Infección por <i>T. cruzi</i> | ADN del kinetoplasto; los cebadores están diseñados para la amplificación de una porción repetida de ADN satélite. | 188 pb | TcZ1 5'- dCAGACTCTTGCCACACGGGTGCT-3' TcZ2 5'- dCCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3' | DI: 94°C 10 min H: 94°C 20 seg A: 55°C 10 seg E: 72°C 30 seg X 29 ciclos EF: 72°C 7 min H: 4°C ∞ | 109 |
| Estatus alimenticio /Fuentes alimenticias de <i>T. dimidiata</i> | ADN mitocondrial; los cebadores son universales de vertebrados y están diseñados para la amplificación de una porción del gen 12S rRNA. | 215 pb | L1085 5'-CCCAAAGTGGGATTAGATACCC-3' H1259 5'-GTTTGCTGAAGATGGCGGTA-3' | DI: 95°C 5 min H: 95°C 30 seg A: 60°C 15 seg E: 72°C 30 seg X 34 ciclos EF: 72°C 10 min H: 4°C ∞ | 68,111 |
| DTUs de <i>T. cruzi</i> | ADN nuclear: los cebadores están diseñados para la amplificación de una porción del espacio inter génico del gen del mini-exón. | Tcl y TcBat (350 bp), TcII, TcV y TcVI (300 bp) y TcIV (380–400 bp) | TC 5'-CCCCCTCCCAGGCCACTG-3' Tc1 5'- GTGTCCGCCACCTCCTTCGGGCC-3' Tc2 5'-CCTGCAGGCACACGTGTGTGTG-3' | DI: 95°C 5 min H: 95°C 1 min A: 50°C 1 min E: 72°C 1 min X 35 ciclos EF: 72°C 5 min H: 4°C ∞ | 112 |
| DTUs de <i>T. cruzi</i> | ADN nuclear; los cebadores están diseñados para la amplificación de una porción del espacio inter génico del gen del mini-exón. | 501 pb | TCCH 5'- CCCCCTCCCAGGCCACTG-3' TRyPME3 5'- TTCTGTACTATATTGGTACGCGAAG-3' | DI: 95°C 5 min H: 95°C 1 min A: 65°C 1 min E: 72°C 1 min X 45 ciclos EF: 72°C 5 min H: 4°C ∞ | 113 |
| Grupos genéticos de <i>T. dimidiata</i> | ADN nuclear; los cebadores están diseñados para la amplificación de una porción del espaciador del transcrito interno 2 (ITS-2) | 320 pb | ITS-2_200 F 5'- TCGYATCTAGGCATTGTCTG-3' ITS-2_200 R 5'- CTCGCAGCTACTAAGGGAATCC-3' | DI: 95°C 5 min H: 95°C 1 min A: 55°C 1 min E: 72°C 1 min X 35 ciclos EF: 72°C 5 min H: 4°C ∞ | 38,88 |

5.1.6 Purificación de los productos de PCR

Los productos de PCR de cada marcador mezclados por insecto (un volumen total de ~ 36 a 72µl) fueron finalmente purificados utilizando el kit de purificación PCR clean-up system (Promega) y rehidratados con agua libre de nucleasas en un volumen final de ~ 50µl.

5.2 Secuenciación masiva.

Una vez que los marcadores moleculares de interés fueron amplificados por PCR, mezclados y purificados por individuo (especimen de *T. dimidiata*), los productos se mandaron a la empresa Applied Biological Materials Inc. (Richmond, BC, CANADA) donde fueron etiquetados con una etiqueta molecular única por individuo y secuenciados en una plataforma de secuenciación masiva MiSeq (Illumina) con una profundidad de 500,000 lecturas por insecto (9,071 a 1,271,694). Las lecturas de las secuencias de ADN se obtuvieron en ambos sentidos (directo y reverso).

5.3 Análisis de las secuencias.

Las secuencias obtenidas y clasificadas por insecto se introdujeron en el software Geneious 9.1. Estas se filtraron según la calidad de los nucleótidos y se conservaron únicamente las que tuvieran nucleótido con una calidad de > 20. Posteriormente los extremos de las secuencias de ADN en ambos sentidos fueron ensamblados por insecto.

Para la clasificación inicial de las secuencias por marcador genético, las secuencias fueron alineadas con una única secuencia de referencia de cada marcador (mini-exón de *T. cruzi*, ITS-2 de *T. dimidiata* y 12S de vertebrado). Los alineamientos se realizaron utilizando Muscle implementado en Geneious 9.1, esto para cada uno de los insectos.

Una vez clasificadas las secuencias por marcador se eliminaron las secuencias de los cebadores utilizados para amplificar cada uno de los marcadores.

5.3.1 Secuencias de *T. cruzi*

De las secuencias obtenidas del marcador mini-exon por insecto se descartaron secuencias menores a 250 pb y mayores a 600 pb. Para clasificar las secuencias por DTUs de *T. cruzi* estas fueron alineadas con secuencias de referencia correspondientes a cada una de las DTUs de *T. cruzi*^{19,87} y utilizando la herramienta MEGABLAST. Se

realizaron búsquedas en la base de datos de Genbank, y las que coincidieron en un >98% de identidad y cobertura fueron utilizadas para catalogar las DTUs en cada uno de los insectos infectados. Las que no cumplieron con estos criterios fueron descartadas.

5.3.2 Secuencias de *T. dimidiata*

De las secuencias obtenidas del marcador ITS-2 por insecto se descartaron secuencias menores a 250 pb y mayores a 400 pb. Para clasificar las secuencias por grupos genéticos de *T. dimidiata* estas fueron alineadas con secuencias de referencia correspondientes a cada uno de grupos genéticos de ITS-2 de *T. dimidiata*^{19,87} y utilizando la herramienta MEGABLAST. Se realizaron búsquedas en la base de datos de Genbank, y las que coincidieron en un >98% de identidad y cobertura fueron utilizadas para catalogar el grupo genético de cada uno de los insectos. Las que no cumplieron con estos criterios fueron descartadas.

5.3.3 Secuencias de vertebrados (fuentes alimenticias de *T. dimidiata*)

De las secuencias obtenidas del marcador 12S rRNA por insecto se descartaron secuencias menores a 120 pb y mayores a 300 pb. Las secuencias que se conservaron se analizaron para la detección de posibles secuencias quimeras con UChime^{23,114}.

Las secuencias quiméricas se descartaron para el análisis. Posteriormente, para clasificar las secuencias por fuentes alimenticias de *T. dimidiata* se realizaron búsquedas en la base de datos de Genbank utilizando la herramienta MEGABLAST. Las secuencias que coincidieron en un >96% de identidad y cobertura que representaban más del 0.5% del total de lecturas fueron utilizadas para catalogar la identidad de las fuentes alimenticias de cada uno de los insectos. Las que no cumplieron con estos criterios fueron descartadas.

5.4 Análisis de Resultados

5.4.1 Red de interacciones

Una vez clasificadas las secuencias por especies de fuentes alimenticias y su frecuencia de detección en insectos procedentes de ecotopos domésticos, peridomésticos y selváticos se construyó una red de interacciones el software Cytoscape, esto para visualizar la importancia de las diferentes fuentes alimenticias encontradas, así como las posibles vías de transmisión del parásito.

Los nodos de la red representan las diversas especies detectadas como fuentes alimenticias. El tamaño de los nodos es proporcional al número de veces que cada fuente alimenticia fue encontrada, éstos, fueron calculados e introducidos de manera manual al programa, tomando como base de cálculo las medidas estándar que ofrece el programa. Las líneas unen a las fuentes alimenticias que se encontraron en el contenido intestinal de un mismo insecto y el grosor de las líneas es proporcional al número de veces que se encontró la combinación de fuentes alimenticias en el mismo insecto.

5.4.2 Análisis estadísticos

Primero, se utilizaron estadísticos descriptivos: se calcularon y compararon las prevalencias de insectos infectados con *T. cruzi* y los porcentajes de insectos alimentados en la muestra total, por ecotopos de colecta, por sexos y estadios de *T. dimidiata*. Se establecieron los intervalos de confianza al 95%, los cuales fueron calculados según Wilson Score ¹¹⁵.

Posteriormente, para determinar si había asociación significativa entre variables se aplicaron pruebas de asociación (χ^2 , F-fisher). Los resultados se consideraron significativos cuando $P < 0.05$. En caso de comparaciones múltiples, se aplicó la corrección de Bonferroni ¹¹⁶.

Para evaluar la diversidad de fuentes alimenticias por ecotopos de colecta, grupos genéticos de *T. dimidiata*, estadios y sexos de *T. dimidiata*, se calcularon los índices de diversidad de Shannon ($H' = -\sum (n_i / N) \cdot \ln (n_i / N)$), donde n_i representa el número de individuos de cada especie o DTUs / taxones i , N el número total de individuos, y S el

número total de especies / taxones. Posteriormente, se aplicó la prueba de Shapiro-Wilks y los índices de diversidad se compararon con la prueba de Kruskal-Wallis ^{117,118}.

Todos los estadísticos se realizaron en los Softwares INFOSAT, GraphPad Prism y SPSS.

6 RESULTADOS

6.1 Diagnóstico de infección con *T. cruzi* y determinación del estatus alimenticio de *T. dimidiata*.

La prevalencia de infección de *T. dimidiata* con *T. cruzi* fue del 8.7% (54/618) (IC=0.067, 0.112). El insecto control fue negativo a la infección. La prevalencia de infección de los insectos colectados en Chumbec fue del 6.5% (10/153) (IC= 0.035, 0.116), en Sudzal del 8.6% (17/197) (IC= 0.054, 0.133) y en Teya del 10% (27/268) (IC=0.70, 0.142). No se encontró diferencia significativa entre localidades ($\chi^2 = 1.53$, gl= 2, $P > 0.05$) (Figura 5).

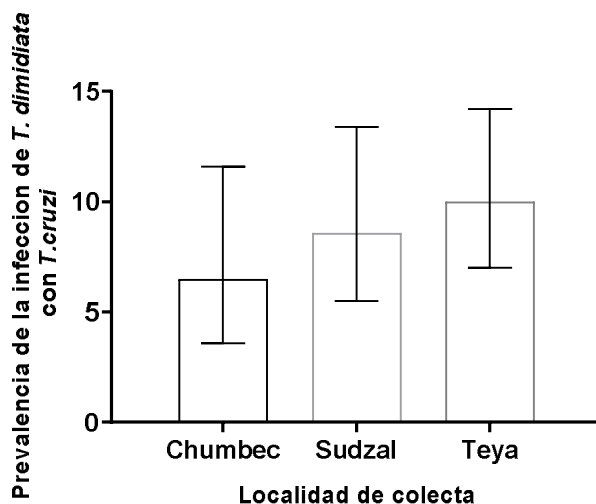


Figura 5 Prevalencia de la infección de *T. dimidiata* con *T. cruzi* en las localidades de estudio. Las barras de error representan los intervalos de confianza (IC) calculados según Wilson Score ¹¹⁵.

La prevalencia de la infección en insectos colectados en ecotopos selváticos fue del 4.7% (13/272) (IC= 0.028, 0.080), mientras que la prevalencia de la infección en insectos colectados en ecotopos domésticos fue del 13% (41/314) (IC=0.097, 0.172). La diferencia entre la prevalencia de infección en insectos colectados en ecotopos selváticos y ecotopos domésticos fue significativa ($\chi^2 = 11.93$, gl= 1, $P=0.0005$) (Figura 6). No

detectamos infección en insectos colectados en ecotopos peridomésticos (0/33) (IC= 0, 0.104).

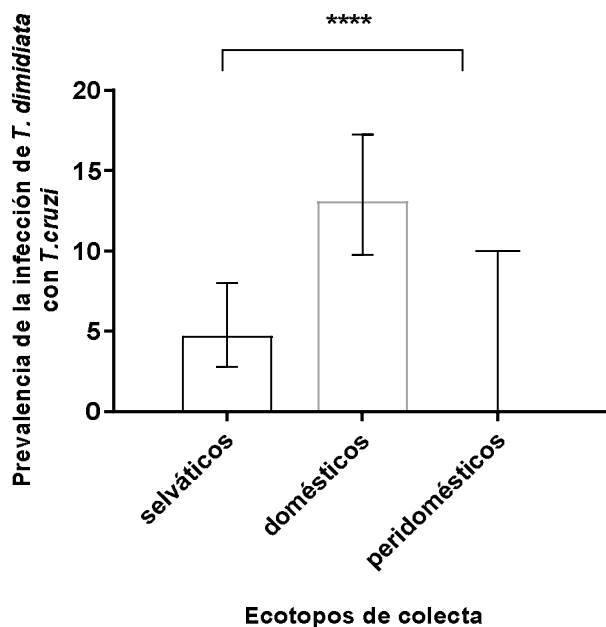


Figura 6 Prevalencia de la infección de *T. dimidiata* con *T. cruzi* en los ecotopos de estudio. **** indica una diferencia significativa con un valor de P de 0.0001 a 0.001. Las barras de error representan los intervalos de confianza (IC) calculados según Wilson Score ¹¹⁵.

Adicionalmente, no hubo diferencia significativa de la prevalencia de la infección entre adultos 8.8% (52/587) (IC= 0.068, 0.114) y ninfas 3.2% (1/31) (IC= 0.005, 0.161) ($F= 1.19$, $P > 0.05$) ni entre machos 7.4% (18/242) (IC= 0.047, 0.114) y hembras 9.8% (34/345) (IC= 0.071, 0.134) ($\chi^2=1.02$, $gl=1$, $P > 0.05$) (Figura 7).

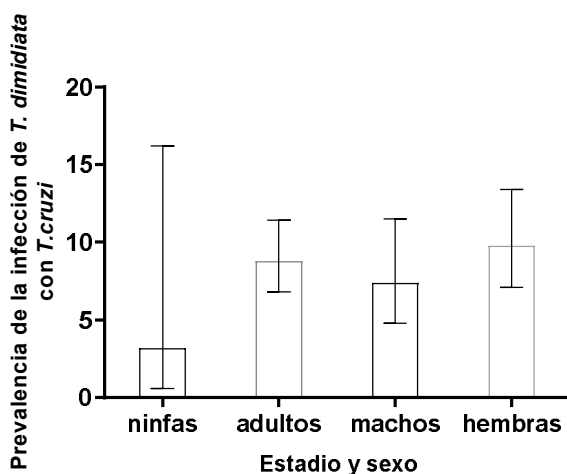


Figura 7 Prevalencia de la infección con *T. cruzi* en estadios y sexos de *T. dimidiata*. Las barras de error representan los intervalos de confianza (IC) calculados según Wilson Score ¹¹⁵.

En cuanto al estatus alimenticio, 198 de los 618 insectos fueron procesados de los cuales el 83.83% (166/198) (IC=0.284, 0.358) se encontraron alimentados. El insecto control también se encontró alimentado.

La proporción de insectos alimentados fue del 81% (48/59) (IC=0.696, 0.892) en Chumbec, del 81% (57/70) (IC=0.707, 0.888) en Sudzal, y del 88% en Teya (61/69) (IC=0.787, 0.940). La proporción de insectos alimentados no fue significativamente diferente entre localidades ($\chi^2 = 1.63$, $gl=2$, $P > 0.05$) (Figura 8).

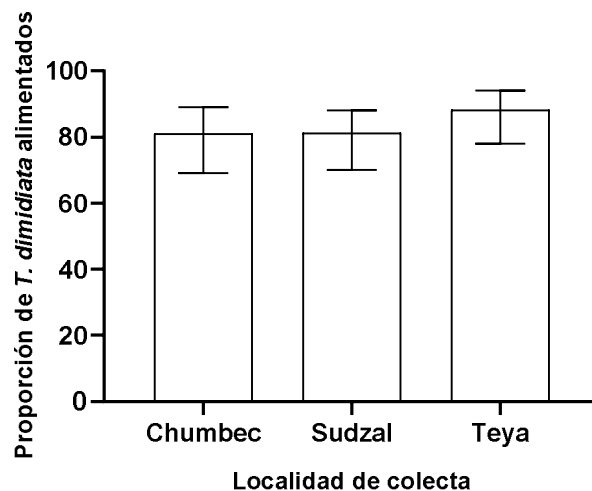


Figura 8 Proporción de insectos alimentados por localidad de colecta. Las barras de error representan los intervalos de confianza (IC) calculados según Wilson Score ¹¹⁵.

La proporción de insectos alimentados fue del 76% (19/25) (IC=0.0565, 0.885) en ecotopos peridomésticos, del 79.41% (81/102) (IC=0.705, 0.861) en ecotopos domésticos, y del 90.1% (64/71) (IC=0.810, 0.951) en ecotopos selváticos. No se encontró diferencia significativa entre ecotopos de colecta ($\chi^2 = 4.32$, $gl=2$, $P > 0.05$) (Figura 9).

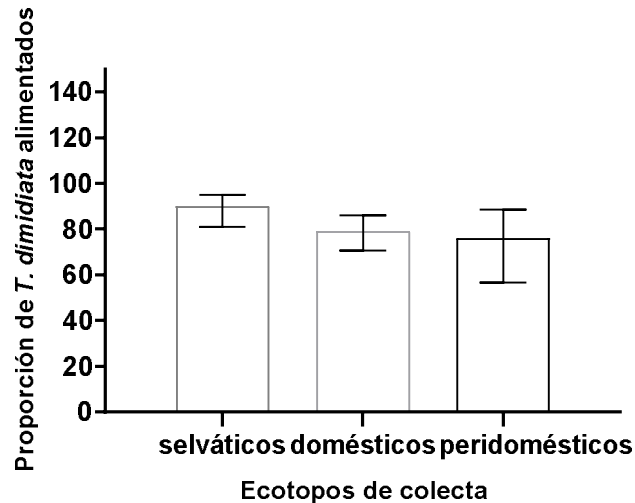


Figura 9 Proporción de insectos alimentados por ecotopos de colecta. Las barras de error representan los intervalos de confianza (IC) calculados según Wilson Score ¹¹⁵.

Adicionalmente, no se encontraron diferencias significativas entre la proporción de adultos alimentados 83%(147/178) (IC=0.763, 0.874), y la proporción de ninfas alimentadas 95% (19/20) (IC=0.763, 0.991) ($F= 0.20 P>0.05$), ni entre la proporción de machos alimentados 85% (63/74) (IC=0.753, 0.914) y la proporción de hembras alimentadas 81% (84/104) (IC=0.7215, 0.871) ($\chi^2=0.57, gl= 1, P > 0.05$) (Figura 10).

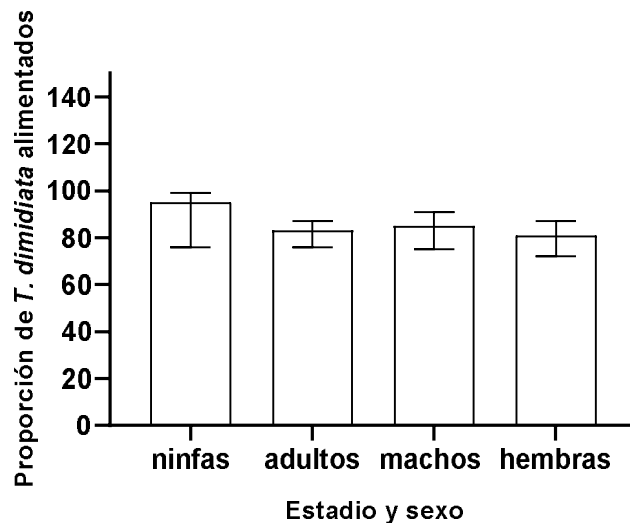


Figura 10 Proporción de insectos alimentados por estadio y sexo de *T. dimidiata*. Las barras de error representan los intervalos de confianza (IC) calculados según Wilson Score ¹¹⁵.

A partir de los resultados obtenidos se construyeron las poblaciones del presente estudio (Cuadro 2, tomado de materiales y métodos).

Cuadro 2. Poblaciones de estudio. Se indica el número de insectos por localidad y por ecotopos, así como el estatus de infección con *T. cruzi*.

| Poblaciones de estudio | | | | | | |
|------------------------|----------------------------------|------------------------|----------------------------------|------------------------|--------------------------------------|--|
| Localidad de colecta | Población de ecotopos domésticos | | Población de ecotopos selváticos | | Población de ecotopos peridomésticos | Total de insectos de <i>T. dimidiata</i> |
| | Insectos sin infección | Insectos con infección | Insectos sin infección | Insectos con infección | Insectos sin infección | |
| Chumbec | 9 | 5 | 12 | 5 | 2 | 33 |
| Sudzal | 6 | 15 | 12 | 1 | 8 | 42 |
| Teya | 6 | 20 | 12 | 7 | 6 | 51 |
| Total | 21 | 40 | 36 | 13 | 16 | 126 |
| | 61 | | 49 | | 16 | 126 |

6.2 Las DTUs de *T. cruzi* en las poblaciones de estudio de *T. dimidiata*.

Se obtuvieron en promedio 171,562.87 (D.S 149,838.45) lecturas del marcador mini-exon por insecto infectado con *T. cruzi* (N=53).

La diversidad de DTUs de *T. cruzi* detectadas incluyó a las DTUs TcI, TcII, y TcIV. Se detectó infección con más de una DTU en el 28.3% (15/53) (IC=0.17,9, 0.415) de los insectos infectados.

La DTU predominante fue TcI, detectada en el 91% (48/53) (IC=0.797, 0.959) de los insectos seguida por la DTU TcIV, detectada en el 32% (17/53) (IC=0.210, 0.454) de los insectos. Finalmente, la DTU TcII fue detectada en el 6% (3/53) (IC=0.0194, 0.153) de los insectos.

La distribución de las DTUs de *T. cruzi* fue diferente entre los insectos colectados en los ecotopos domésticos y selváticos. En los ecotopos domésticos, la DTU TcI se identificó en el 98% (39/40) (IC=0.871, 0.995) de los insectos colectados, la DTU TcIV en el 15% (6/40) (IC=0.070, 0.290) de los insectos colectados y la DTU TcII en el 5% (2/40) (IC=0.013, 0.165) de los insectos colectados. Al contrario, en los ecotopos selváticos, la DTU TcIV fue predominante, identificándose en el 85% (11/13) (IC=0.557, 0.95) de los insectos colectados, la DTU TcI en el 69% (9/13) (IC=0.423, 0.873) de los insectos colectados y la DTU TcII en el 7.7% (1/13) (IC= 0.013, 0.333) de los insectos colectados. La distribución de las diferentes DTUs de *T. cruzi* entre los ecotopos domésticos y selváticos fue significativamente diferente (F-fisher. $P=0.001$).

Después de realizar comparaciones múltiples con corrección de Bonferroni encontramos que la DTU TcI está asociada a los insectos colectados en ecotopos domésticos (F-fisher. $P=0.010 < 0.016$) y la DTU TcIV está asociada a los insectos colectados en ecotopos selváticos (F-fisher. $P=0.00001 < 0.016$).

Además, en los ecotopos domésticos, el 17.5% (7/40) (IC=0.087, 0.319) de los insectos se encontraron infectados con más de una DTU (TcI con TcII, TcI con TcIV). En ecotopos selváticos, el 61.5% (8/13) (IC=0.355, 0.822) de los insectos se encontraron infectados con más de una DTU (TcI con TcIV y TcII con TcIV). La infección con múltiples DTUs fue significativamente más alta en ecotopos selváticos que en ecotopos domésticos (F-fisher, $P= 0.004$) (Figura 11).

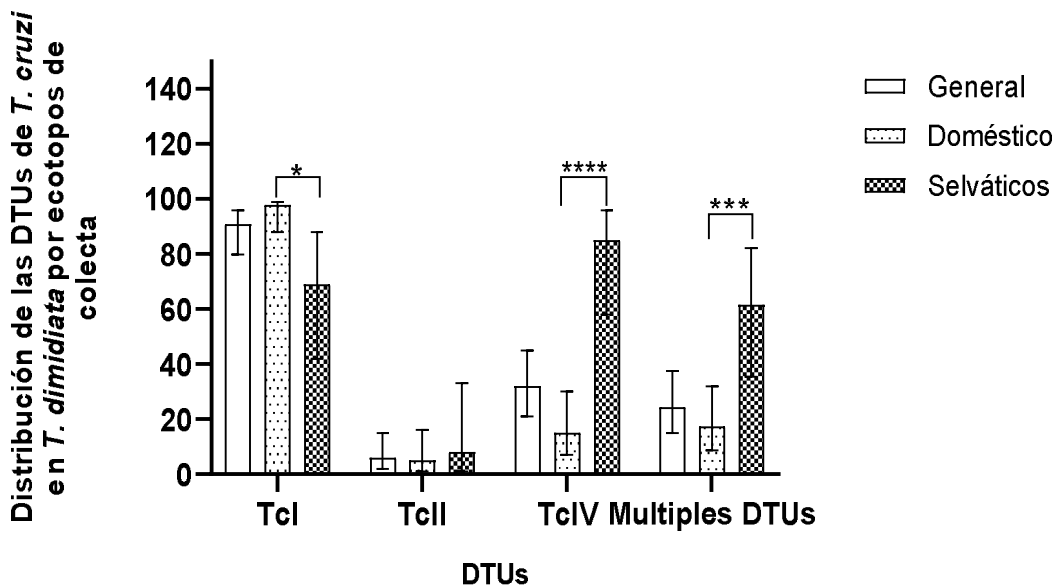


Figura 11 Distribución de las DTUs de *T. cruzi* identificadas en los insectos infectados, por ecotopos de colecta. * indica una diferencia significativa con un valor de P de 0.01 a 0.05, **** indica una diferencia significativa con un valor de P de 0.00001 a 0.0001, *** indica una diferencia significativa con un valor de P de 0.0001 a 0.001. Las barras de error representan los intervalos de confianza (IC) calculados según Wilson Score ¹¹⁵.

La DTU TcI se encontró en el 94% (32/34) (IC=0.809, 0.983) de las hembras, TcII en el 5.9% (2/34) (IC= 0.016, 0.190) y TcIV en el 29.4% (10/34) (IC=0.168, 0.461). TcI se encontró en el 83.3% (15/18) (IC=0.607, 0.941) de los machos, TcII en el 5.6% (1/18) (IC= 0.009, 0.257) y TcIV en el 38.9% (7/18) (IC=0.203, 0.613). La distribución de DTUs

entre hembras y machos infectados no fue significativamente diferente (F-fisher, $P > 0.05$). Solo una ninfa estuvo infectada y fue con la DTU TcI.

Se detectó infección con más de una DTU en el 29.4% (10/34) (IC= 0.168, 0.461) de hembras y en el 27.8% (5/18) (IC=0.124, 0.508) de machos. No se encontraron diferencias significativas entre hembras y machos ($\chi^2= 0.15$, gl= 1, $P > 0.05$) (Figura 12).

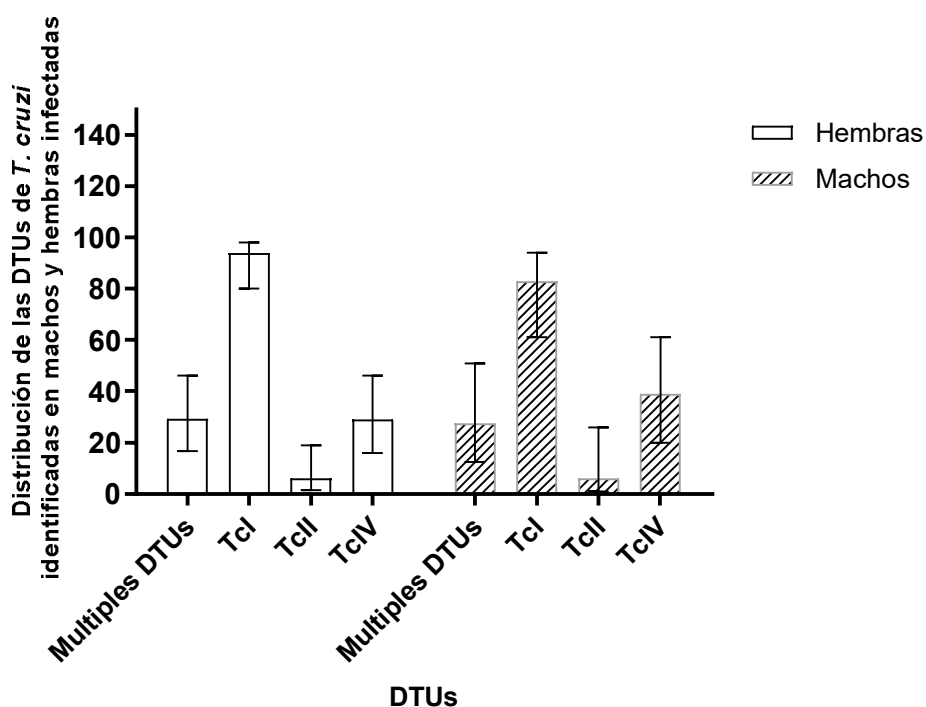


Figura 12 Distribución de las DTUs de *T. cruzi* identificadas en machos y hembras infectadas. Las barras de error representan los intervalos de confianza (IC) calculados según Wilson Score ¹¹⁵.

En cuanto a la relación entre las DTUs infectantes y el estatus alimenticio de los insectos, encontramos que el 100% (N=17) (IC=0.815, 1.00) de los insectos infectados con la DTU TcIV estaban alimentados, el 93.7% (45/48) (IC=83.1 a 97.8) de los insectos infectados con la DTU TcI estaban alimentados y el 66.6% (2/3) (IC=20.7 a 93.8) de los insectos infectados con la DTU TcII estaban alimentados. No se encontró asociación entre las DTUs infectantes y el estatus alimenticio de los insectos (F-fisher, $P= 0.10 > 0.05$).

6.3 Grupos genéticos de *T. dimidiata* en las poblaciones de estudio.

Se obtuvieron en promedio 159,814.03 (D.S 157,442.67) lecturas del marcador ITS-2 por insecto (N=127; incluido el insecto control).

La diversidad detectada de grupos genéticos de *T. dimidiata* incluyó ITS-2 grupo 2, ITS-2 grupo 3 y el híbrido de estos (2,3). Los 3 grupos se encontraron en simpatria. El insecto control fue híbrido.

La mayoría de los insectos colectados fueron del grupo genético ITS-2 grupo 3 83.3%, (105/126) (IC= 0.758, 0.888). El resto de los insectos colectados se distribuyeron entre los grupos genéticos ITS-2 grupo 2 11.9% (15/126) (IC=0.073, 0.187) e híbridos 4.7%, (6/126) (IC=0.022, 0.100).

La distribución de los grupos genéticos de *T. dimidiata* fueron similares en los ecotopos domésticos y selváticos, pero fue diferente en los ecotopos peridomésticos. En efecto, en los ecotopos domésticos y selváticos, se encontraron principalmente insectos del grupo genético ITS-2 grupo 3 de *T. dimidiata* 93% (57/61) (IC=0.843, 0.97) y 94% (46/49) (IC=0.834, 0.978), respectivamente; y en mucho menor proporción insectos del grupo genético ITS-2 grupo 2 de *T. dimidiata* 5% (3/61) (IC=0.016, 0.134) y 2%, (1/49) (IC=0.003, 0.106), respectivamente; e híbridos 2% (1/61) (IC=0.002, 0.087) y 4% (2/49) (IC=0.011, 0.137), respectivamente.

Al contrario, en los ecotopos peridomésticos se encontraron principalmente insectos del grupo 2 69% (11/16) (IC=0.444, 0.858) y los insectos del grupo 3 fueron los menos abundantes 13%, (2/16) (IC= 0.034, 0.360). Finalmente, el 19% de los insectos (3/16) (IC=0.065, 0.430) fueron del grupo híbrido.

En nuestro muestreo se encontró asociación significativa entre los grupos genéticos de *T. dimidiata* y el ecotopo de colecta de los insectos (F-fisher, $P < 0.05$).

Después de realizar comparaciones múltiples con corrección de Bonferroni encontramos asociación significativa entre los insectos del grupo genéticos ITS-2 grupo 2 y los ecotopos peridomésticos (F-fisher, $P = 0.00001 < 0.016$) (Figura 13).

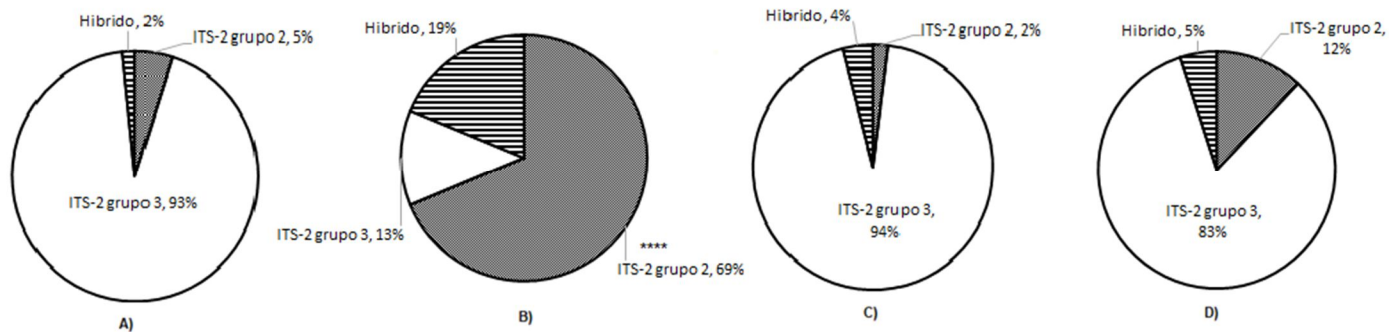


Figura 13 Abundancia de los diferentes grupos genéticos de *T. dimidiata* por ecotopo de colecta. A) ecotopos domésticos B) ecotopos peridomésticos C) ecotopos selváticos D) muestra total. **** indica una diferencia significativa con un valor de *P* de 0.00001 a 0.000.

En nuestras poblaciones de estudio, la prevalencia de la infección con *T. cruzi* fue significativamente mayor en los insectos del grupo genético ITS-2 grupo 3 48% (51/105) (IC=0.392, 0.580) que en los insectos del grupo genético ITS-2 grupo 2 de *T. dimidiata* 13% (2/15) (IC=0.037, 0.378) (F-fisher, *P* = 0.01 < 0.05) (Figura 14).

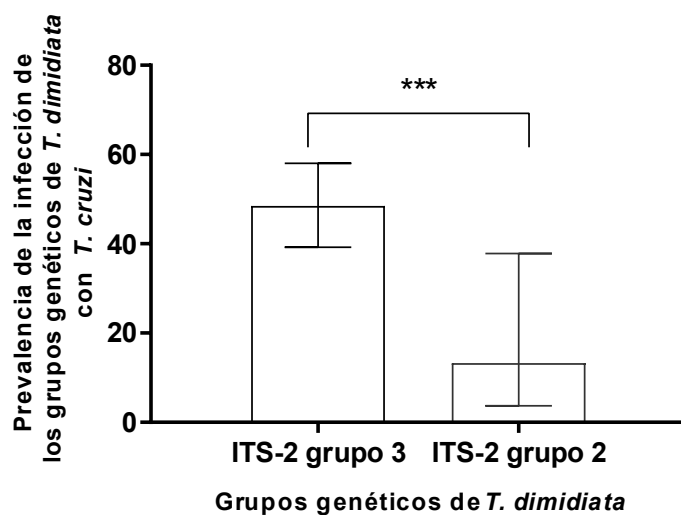


Figura 14 Prevalencia de infección de los grupos genéticos de *T. dimidiata* con *T. cruzi*. *** indica una diferencia significativa con un valor de *P* de 0.0001 a 0.001. Las barras de error representan los intervalos de confianza (IC) calculados según Wilson Score ¹¹⁵.

En cuanto a la relación entre el grupo genético de los insectos, su ecotopo de colecta, y las DTUs de *T. cruzi* identificadas, encontramos que los insectos del grupo 3 colectados en los ecotopos domésticos fueron mayormente infectados con la DTU TcI 97.3% (37/38) (IC=0.0865, 0.995) a diferencia de los insectos del grupo 3 colectados en los ecotopos selváticos, mayormente infectados con la DTU TcIV 84.6% (11/13) (IC=0.577, 0.956).

No hubo asociación significativa entre la infección con múltiples DTUs y los grupos genéticos de *T. dimidiata* (F-fisher, $P > 0.05$) (Cuadro 4).

Cuadro 4 Número de insectos por grupo genético de *T. dimidiata*, ecotopos de colecta, estatus de infección con *T. cruzi*, y DTU identificada.

| Ecotopos de colecta | Grupos genéticos de <i>T. dimidiata</i> | No. de insectos por grupos genéticos de <i>T. dimidiata</i> | No. de insectos sin <i>T. cruzi</i> | No. de insectos infectados con <i>T. cruzi</i> | No. de insectos infectados con la DTU TcI | No. de insectos infectados con la DTU TcII | No. de insectos infectados con la DTU TcIV | No. de insectos con múltiples DTUs |
|-----------------------|---|---|-------------------------------------|--|---|--|--|------------------------------------|
| Domésticos | | | | | | | | |
| | ITS-2 grupo 3 | 57 | 19 | 38 | 37 | 1 | 6 | 6 |
| | ITS-2 grupo 2 | 3 | 1 | 2 | 2 | 1 | - | 1 |
| | ITS-2 grupo híbrido | 1 | 1 | - | - | - | - | - |
| | Total | 61 | 21 | 40 | 39 | 2 | 6 | 7 |
| Selváticos | | | | | | | | |
| | ITS-2 grupo 3 | 46 | 33 | 13 | 9 | 1 | 11 | 8 |
| | ITS-2 grupo 2 | 1 | 1 | - | - | - | - | - |
| | ITS-2 grupo híbrido | 2 | 2 | - | - | - | - | - |
| | Total | 49 | 36 | 13 | 9 | 1 | 11 | 8 |
| Peridomésticos | | | | | | | | |
| | ITS-2 grupo 3 | 2 | 2 | - | - | - | - | - |
| | ITS-2 grupo 2 | 11 | 11 | - | - | - | - | - |
| | ITS-2 grupo híbrido | 3 | 3 | - | - | - | - | - |
| | Total | 16 | 16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| General | | | | | | | | |
| | ITS-2 grupo 3 | 105 | 54 | 51 | 46 | 2 | 17 | 14 |
| | ITS-2 grupo 2 | 15 | 13 | 2 | 2 | 1 | - | 1 |
| | ITS-2 grupo híbrido | 6 | 6 | - | - | - | - | - |
| | Total | 126 | 73 | 53 | 48 | 3 | 17 | 15 |

Adicionalmente, el 96% de los insectos del grupo 3 (49/51) (IC= 0.867, 0.989) y el 50% de los insectos del grupo 2 (1/2) (IC=0.094, 0.905) se encontraban alimentados. No se encontró asociación significativa entre los grupos genéticos de *T. dimidiata* y el estatus alimenticio (F- fisher, $P > 0.05$). Todos los híbridos estuvieron alimentados.

6.4 Fuentes alimenticias de las poblaciones de estudio de *T. dimidiata*.

Se obtuvieron en promedio 113,453.43 (D. S= 179,802.51) lecturas del marcador 12S por insecto (N=122; incluido el insecto control).

El insecto control (criado en insectario) estuvo únicamente alimentado con especies de paloma; *Columba livia* 61.16%, *Columba palumbus* 0.67%, *Columba rupestris* 37.42%.

Pudimos identificar al menos una fuente alimenticia en 121 insectos, y en el insecto control. En total, se identificaron 30 especies de vertebrados como fuentes alimenticias de *T. dimidiata*, con un promedio de fuentes alimenticias por insecto de 2.5 y un índice de diversidad de fuentes alimenticias por insecto (índice de Diversidad de Shannon H')

de $H':2.8$. La distribución de los datos según la prueba de Shapiro-Wilks no fue normal ($P=0.001<0.05$).

El 74% (89/121) (IC=0.650, 0.805) de los insectos se encontraron alimentados con más de una fuente alimenticia y se identificaron hasta 6 especies de fuentes alimenticias en un mismo insecto.

Se identificaron 18 especies de fuentes alimenticias en los insectos colectados en la localidad de Chumbec, 19 en Sudzal y 21 en Teya.

Para los insectos colectados en ecotopos domésticos se identificaron 22 especies de fuentes alimenticias, en ecotopos selváticos 20 y en ecotopos peridomésticos 12 especies. De los insectos colectados en ecotopos domésticos, el 69% (41/59) (IC=0.568, 0.797) se encontraron alimentados con más de una fuente alimenticia, al igual que los insectos colectados en ecotopos selváticos 69% (33/48) (IC=0.546, 0.800). Al contrario, los insectos colectados en ecotopos peridomésticos estuvieron todos alimentados con más de una fuente alimenticia (14/14) (IC=0.784, 1.000).

Las principales fuentes alimenticias fueron humano (*Homo sapiens*) y perro (*Canis lupus*), al menos una de estas dos fuentes alimenticias se detectó en más del 30% de los insectos (Cuadro 5).

Las fuentes alimenticias que se detectaron en $\geq 25\%$ de los insectos se consideraron las principales fuentes alimenticias (Cuadro 5):

En insectos colectados en ecotopos domésticos las principales fuentes alimenticias fueron humano, perro, ratón (*Mus musculus*) y vaca (*Bos spp.*) (Cuadro 5).

Además, se detectaron otros animales, principalmente domésticos: cabra (*Capra hircus*), gato (*Felis catus*), pavo (*Meleagris gallopavo*), gallo (*Gallus gallus*), borrego (*Ovis aries*), cerdo (*Sus scrofa*) y otros animales sinantrópicos: rata (*Rattus rattus*) murciélago frugívoro (*Artibeus literarus*), murciélago hematófago (*Desmodus rotundus*), tortolita (*Zenaida macroura*) y tres especies de palomas (*Columba livia*, *Columba palumbus*, *Streptopelia decaocto*) (Cuadro 5).

También se identificaron algunos animales selváticos incluidos el cerdo de monte (*Pecari tajacu*), coyote (*Canis latrans*), venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*), zorro gris (*Urocyon cinereoargenteus*) y ratón de campo (*Heteromys gaumeri*) (Cuadro 5).

En insectos colectados en ecotopos selváticos las principales fuentes alimenticias fueron humano perro vaca y ratón (Cuadro 5).

Además, se detectaron animales principalmente selváticos: cabeza de viejo (*Eira barbara*), conejo (*Sylvilagus floridanus*), rata trepadora (*Ototylomys phylotis*), armadillo (*Dasypus novemcinctus*), ardilla (*Sciurus spp*), puerco espín (*Coendou bicolor*), cerdo de monte (*Pecari tajacu*), zorro gris (*Urocyon cinereoargenteus*) y ratón de campo (*Heteromys gaumeri*) (Cuadro 5.).

También se identificaron algunos animales sinantrópicos: murciélago frugívoro (*Artibeus literarus*), murciélago hematófago (*Desmodus rotundus*), tortolita (*Zenaida macroura*), paloma (*Columbia livia*) y animales domésticos: cabra (*Capra hircus*) borrego (*Ovis aries*) y cerdo (*Sus scrofa*) (Cuadro 5).

En insectos colectados en ecotopos peridomésticos las principales fuentes alimenticias fueron humano, perro, pavo, gallo, y vaca (Cuadro 5). Además, se detectaron animales domésticos: cerdo y cabra. También se identificaron animales sinantrópicos: ratón común y “ratón yucateco” (*Peromyscus spp*) y animales algunos animales selváticos como cerdo de monte, ratón de campo y armadillo (*Dasypus novemcinctus*) (Cuadro 5).

Cuadro 5 Frecuencias de cada una de las fuentes alimenticias de los insectos infectados y no infectados. Se indican los ecotopos de colecta. La sumatoria puede ser mayor al >100%, por la identificación de fuentes de alimentación múltiples en un mismo insecto. Animales caracterizados como domésticos (D), animales caracterizados como sinantrópicos (SI), animales caracterizados como selváticos (SE).

| Spp. de vertebrado (fuente alimenticia) | Tipo de animal | Insectos no infectados con <i>T. cruzi</i> | | | | Insectos infectados con <i>T. cruzi</i> | | | | Muestra total | | | Total |
|--|----------------|--|-------------|------------|----------------|---|-------------|-------------|-------------|---------------|------------|----------------|-------|
| | | Ecotopos | Domésticos | Selváticos | Peridomésticos | Total | Domésticos | Selváticos | Total | Domésticos | Selváticos | Peridomésticos | |
| | | No. total de insectos | 21 | 36 | 14 | 71 | 38 | 12 | 50 | 59 | 48 | 14 | |
| <i>Homo sapiens</i> | D | 100% (21/21) | 92% (33/36) | 64% (9/14) | 89% (63/71) | 97% (37/38) | 83% (10/12) | 94% (47/50) | 98% (58/59) | 90% (43/48) | 64% (9/14) | 91% (110/121) | |
| <i>Canis lupus</i> | D | 33% (7/21) | 28% (10/36) | 57% (8/14) | 35% (25/71) | 37% (14/38) | 25% (3/12) | 34% (17/50) | 36% (21/59) | 27% (13/48) | 57% (8/14) | 35% (42/121) | |
| <i>Bos spp.</i> | D | 19% (4/21) | 25% (9/36) | 43% (6/14) | 27% (19/71) | 29% (11/38) | 50% (6/12) | 34% (17/50) | 25% (15/59) | 31 (15/48) | 43% (6/14) | 30% (36/121) | |
| <i>Mus musculus</i> | SI | 29%(6/21) | 22% (8/36) | 21% (3/14) | 24% (17/71) | 26% (10/38) | 50% (6/12) | 32% (16/50) | 27% (16/59) | 29% (14/48) | 21% (3/14) | 27% (33/121) | |
| <i>Ovis Aries</i> | D | 14% (3/21) | 14% (5/36) | 21% (3/14) | 15% (11/71) | 5% (2/38) | - | 4% (2/50) | 9% (5/59) | 10% (5/48) | 21% (3/14) | 11% (13/121) | |
| <i>Gallus gallus</i> | D | 5% (1/21) | - | 43% (6/14) | 10% (7/71) | 3% (1/38) | - | 2% (1/50) | 3% (2/59) | - | 43% (6/14) | 7% (8/121) | |
| <i>Meleagris gallopavo</i> | D | 5% (1/21) | - | 50% (7/14) | 11% (8/71) | - | - | - | 2% (1/59) | - | 50% (7/14) | 7% (8/121) | |
| <i>Heteromys gaureri</i> | SI | 10% (2/21) | 3% (1/36) | 14% (2/14) | 7% (5/71) | 5% (2/38) | 8% (1/12) | 6% (3/50) | 7% (4/59) | 4% (2/48) | 14% (2/14) | 7% (8/121) | |
| <i>Sus scrofa</i> | D | 10% (2/21) | - | 7% (1/14) | 4% (3/71) | 3% (1/38) | 8% (1/12) | 4% (2/50) | 5% (3/59) | 2% (1/48) | 7% (1/14) | 4% (5/121) | |
| <i>Pecari tajacu</i> | SE | - | 6% (2/36) | 7% (1/14) | 4% (3/71) | 5% (2/38) | - | 4% (2/50) | 3% (2/59) | 4% (2/48) | 7% (1/14) | 4% (4/121) | |
| <i>Capra hircus</i> | D | 14% (3/21) | 3% (1/36) | - | 6% (4/71) | - | - | - | 5% (3/59) | 2% (1/48) | - | 3% (4/121) | |
| <i>Artibeus lituratus</i> | SI | - | - | - | - | 5% (2/38) | 17% (2/12) | 8% (4/50) | 3% (2/59) | 4% (2/48) | - | 3% (4/121) | |
| <i>Coendou bicolor</i> | SE | - | 6% (2/36) | - | 3% (2/71) | - | 17% (2/12) | 4% (2/50) | - | 8% (4/48) | - | 3% (4/121) | |
| <i>Felis catus</i> | D | - | - | - | - | 8% (3/38) | - | 6% (3/50) | 5% (3/59) | - | - | 2% (3/121) | |
| <i>Zenaida macroura</i> | SI | - | 3% (1/36) | - | 1% (1/71) | 5% (2/38) | - | 4% (2/50) | 3% (2/59) | 2% (1/48) | - | 2% (3/121) | |
| <i>Columba livia</i> | SI | - | 3% (1/36) | - | 1% (1/71) | 3% (1/38) | - | 2% (1/50) | 2% (1/59) | 2% (1/48) | - | 2% (2/121) | |
| <i>Columba palumbus</i> | SI | - | - | - | - | 5% (2/38) | - | 4% (2/50) | 3% (2/59) | - | - | 2% (2/121) | |
| <i>Stroptopelia decaocto</i> | SI | - | - | - | - | 5% (2/38) | - | 4% (2/50) | 3% (2/59) | - | - | 2% (2/121) | |
| <i>Desmodus rotundus</i> | SE | - | - | - | - | 3% (1/38) | 8% (1/12) | 4% (2/50) | 2% (1/59) | 2% (1/48) | - | 2% (3/121) | |
| <i>Odocoileus virginianus</i> | SE | - | - | - | - | 5% (2/38) | - | 4% (2/50) | 3% (2/59) | - | - | 2% (3/121) | |
| <i>rocyon cinereoargentei</i> | SE | 5% (1/21) | 3% (1/36) | - | 3% (2/71) | - | - | - | 2% (1/59) | 2% (1/48) | - | 2% (3/121) | |
| <i>Eira barbara</i> | SE | - | 6% (2/36) | - | 3% (2/71) | - | - | - | - | 4% (2/48) | - | 2% (2/121) | |
| <i>Rattus rattus</i> | D | 5% (1/21) | - | - | 1% (1/71) | - | - | - | 2% (1/59) | - | - | 1% (1/121) | |
| <i>Neotoma micropus</i> | SI | - | 3% (1/36) | - | 1% (1/71) | - | - | - | - | 2% (1/48) | - | 1% (1/121) | |
| <i>Peromyscus spp.</i> | SI | - | - | 7% (1/14) | 1% (1/71) | - | - | - | - | - | 7% (1/14) | 1% (1/121) | |
| <i>Ototylomys phyllotis</i> | SE | - | 3% (1/36) | - | 1% (1/71) | - | - | - | - | 2% (1/48) | - | 1% (1/121) | |
| <i>Sylvilagus floridanus</i> | SE | - | 3% (1/36) | - | 1% (1/71) | - | - | - | - | 2% (1/48) | - | 1% (1/121) | |
| <i>Sciurus spp.</i> | SE | - | 3% (1/36) | - | 1% (1/71) | - | - | - | - | 2% (1/48) | - | 1% (1/121) | |
| <i>Canis latrans</i> | SE | 5% (1/21) | - | - | 1% (1/71) | - | - | - | 2% (1/59) | - | - | 1% (1/121) | |
| <i>Dasyus novemcinctus</i> | SE | - | - | 7% (1/14) | 1% (1/71) | - | - | - | - | - | 7% (1/14) | 1% (1/121) | |

La diversidad de fuentes alimenticias identificadas por insecto (índice de Diversidad de Shannon H') fue similar entre los insectos colectados en ecotopos domésticos (H':2.17), peridomésticos (H':2.21) y selváticos (H':2.11). No hubo diferencia significativa entre la diversidad de fuentes alimenticias de insectos colectados en ecotopos domésticos, peridomésticos y selváticos (kruskal wallis H= 1.27, P>0.05).

Además, la diversidad de fuentes alimenticias identificadas por insecto fue similar entre los insectos no infectados (H':2.28) e infectados con *T. cruzi* (H':2.22). No hubo diferencia significativa entre la diversidad de fuentes alimenticias de insectos no infectados e infectados con *T. cruzi* (kruskal wallis H= 0.4, P>0.05).

Adicionalmente, no hubo diferencia significativa entre la diversidad de fuentes alimenticias detectadas en insectos del grupo genético ITS-2 grupo 2 de *T. dimidiata* (H': 3.3) vs insectos del grupo genético ITS-2 grupo 3 de *T. dimidiata* (H': 2.7) e híbridos (H'4.4) (kruskal wallis H= 2.44, $P>0.05$).

No hubo diferencia significativa entre la diversidad de fuentes alimenticias detectadas en insectos infectados con la DTU TcI (H': 2.7), los insectos infectados con la DTU TcII (H': 2) e insectos infectados con la DTU TcIV (2.2, H'2.4) (kruskal wallis H= 3.34, $P>0.05$).

Tampoco hubo diferencia significativa entre la diversidad de fuentes alimenticias detectadas en adultos (H': 2.19) y ninfas (H': 2.31), tampoco entre machos (H': 2.09) y hembras (H'2.17,) (kruskal wallis H= 0.08, $P>0.05$; kruskal wallis H= 0.24, $P>0.05$, respectivamente).

Guardando solamente las cinco fuentes alimenticias principales del muestreo total (>25% ver cuadro 5) (humano, perro, vaca, ratón, y borrego), no encontramos asociación significativa entre insectos infectados con *T. cruzi* y fuente alimenticia (F- Fisher, $P>0.05$).

Tampoco se encontró asociación significativa entre estas principales fuentes alimenticias y los ecotopos de colecta de los insectos (F- fisher, $P > 0.05$).

Adicionalmente no se encontró asociación significativa entre las mismas 5 fuentes alimenticias y DTUs infectantes (F- Fisher, $P>0.05$), ni entre fuentes alimenticias y grupos genéticos de *T. dimidiata* (F- Fisher, $P>0.05$).

Se encontró asociación significativa entre de las 5 fuentes alimenticias y la co-ocurrencia entre ellas en un mismo insecto (F-fisher, $P > 0.05$). Realizamos comparaciones múltiples para saber cuál de las fuentes alimenticias estaba (n) asociada (s) entre ellas. Se encontró asociación significativa entre vaca y borrego ($\chi^2=7.7$, gl= 1, $P 0.005 < 0.01$).

Adicionalmente se realizó una prueba de asociación (F-fisher) las 5 fuentes de alimenticias (humano, perro, vaca, ratón, borrego) y la co-ocurrencia de estas en un mismo insecto con aves de corral (gallo y pavo). Se encontró asociación significativa entre humano y pavo (F- fisher, $P 0.009 < 0.01$).

A partir de todas las especies detectadas en los insectos colectados en los diferentes ecotopos, se construyó una red de interacciones entre las fuentes alimenticias de *T. dimidiata* (Figura 15).

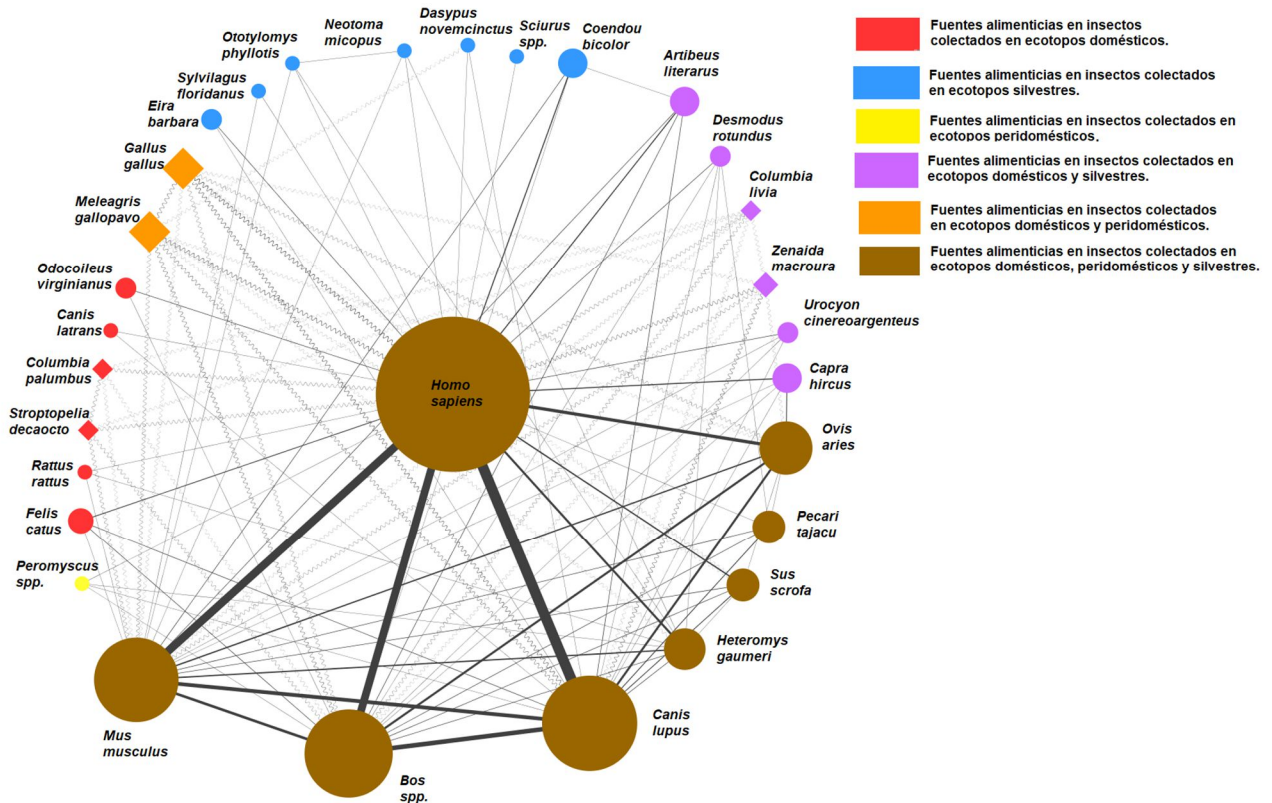


Figura 15 Red de interacciones entre las fuentes alimenticias de *T. dimidiata*. Los nodos de color rojo indican las fuentes alimenticias identificadas en insectos colectados en ecotopos domésticos, los nodos de color azul indican las fuentes alimenticias identificadas en insectos colectados en ecotopos selváticos, los nodos de color amarillo indican las fuentes alimenticias identificadas en insectos colectados en ecotopos peridomésticos, los nodos de color morado (combinación de rojo con azul) indican las fuentes alimenticias identificadas tanto en insectos colectados en ecotopos domésticos como insectos colectados en ecotopos selváticos, los nodos de color naranja (rojo/amarillo) indican las fuentes alimenticias identificadas en insectos colectados tanto en ecotopos domésticos como en ecotopos peridomésticos, los nodos de color café (rojo/azul/amarillo) indican las fuentes alimenticias identificadas en insectos colectados en los tres tipos de ecotopos. El tamaño de los nodos es proporcional a la ocurrencia de identificación. Los nodos con forma de diamante se utilizan para diferenciar a las especies refractarias a la infección por *T. cruzi* en este caso aves, y los nodos en forma de círculos se utilizan para las especies que pueden ser infectadas por el parásito *T. cruzi*. Las líneas negras sólidas unen especies de mamíferos, entre las cuales *T. cruzi* puede circular, mientras que las líneas grises onduladas implican especies de aves, que solo sirven como fuentes de sangre para los insectos. El grosor de las líneas es proporcional a la frecuencia de identificación de las fuentes alimenticias juntas en un mismo insecto.

Los nodos de color azul corresponden a los animales identificados únicamente en insectos colectados en ecotopos selváticos. Interesantemente, estos animales corresponden únicamente a especies caracterizadas como selváticos: cabeza de viejo, conejo, rata trepadora, armadillo, ardilla, y puerco espín.

Los nodos de animales detectados únicamente en insectos colectados en ecotopos domésticos (color rojo) abarcan al animal doméstico gato, dos especies de palomas sinantrópicas y los animales selváticos coyote y venado cola blanca.

El nodo amarillo corresponde al ratón yucateco, el cual fue detectado únicamente en un insecto colectado en ecotopos peridomésticos.

Los nodos de color morado corresponden a los animales detectados en insectos colectados en ecotopos domésticos y selváticos, la mayoría fueron animales sinantrópicos: murciélago frugívoro, murciélago hematófago, tortolita, paloma, zorro gris y el animal doméstico cabra.

Los nodos naranjas corresponden a los animales detectados en insectos colectados en ecotopos domésticos y peridomésticos: estos animales fueron aves de corral: pavo y gallo.

Los nodos cafés corresponden a los animales detectados en insectos colectados en ecotopos domésticos, peridomésticos y selváticos, la mayoría fueron animales caracterizados como animales domésticos; perro, vaca, borrego, cerdo, además de humano y los animales selváticos cerdo de monte y el ratón de campo.

Humano y perro fueron los animales más identificados, además de ser las especies que tuvieron mayor co-ocurrencia un mismo insecto.

6.5 Estructura tentativa de los ciclos de transmisión de *T. cruzi* en nuestra zona de estudio.

Los resultados de los patrones de alimentación e infección de *T. dimidiata* sugieren que existe una estructuración espacial de los ciclos de transmisión de *T. cruzi* entre los ecotopos domésticos, peridomésticos y selváticos.

Los principales resultados que sugieren esta estructuración espacial de los ciclos de transmisión de *T. cruzi* son los siguientes:

- Los insectos colectados en los ecotopos peridomésticos no estuvieron infectados con *T. cruzi* a diferencia de los insectos colectados en ecotopos domésticos y selváticos. Además, la infección con *T. cruzi* fue mayor en los insectos colectados en los ecotopos domésticos que en los insectos colectados en los ecotopos selváticos.
- La DTU TcI se distribuyó principalmente en los ecotopos domésticos a diferencia de la DTU TcIV que se distribuyó principalmente en los ecotopos selváticos. Los insectos del grupo genético ITS-2 grupo 2 de *T. dimidiata* estuvieron asociados con los ecotopos peridomésticos, donde, no se encontraron insectos infectados con *T. cruzi* y unas de las principales fuentes alimenticias en estos ecotopos fueron animales refractarios a la infección con *T. cruzi* (pavo y gallo). Los insectos del grupo genético ITS-2 grupo 3 de *T. dimidiata* fueron significativamente más infectados que los insectos del grupo ITS-2 grupo 2 de *T. dimidiata*.
- Las principales fuentes alimenticias de *T. dimidiata* en nuestro estudio fueron humano y perro. Además, descubrimos que la variedad de fuentes alimenticias en insectos colectados en ecotopos selváticos incluyó mayormente animales selváticos y en insectos domésticos y peridomésticos animales domésticos. Por lo tanto, podemos sugerir que la conexión de los ciclos de transmisión de *T. cruzi* está dirigida por el movimiento de humano y perro entre los ecotopos domésticos, peridomésticos y selváticos. (Figura 16).

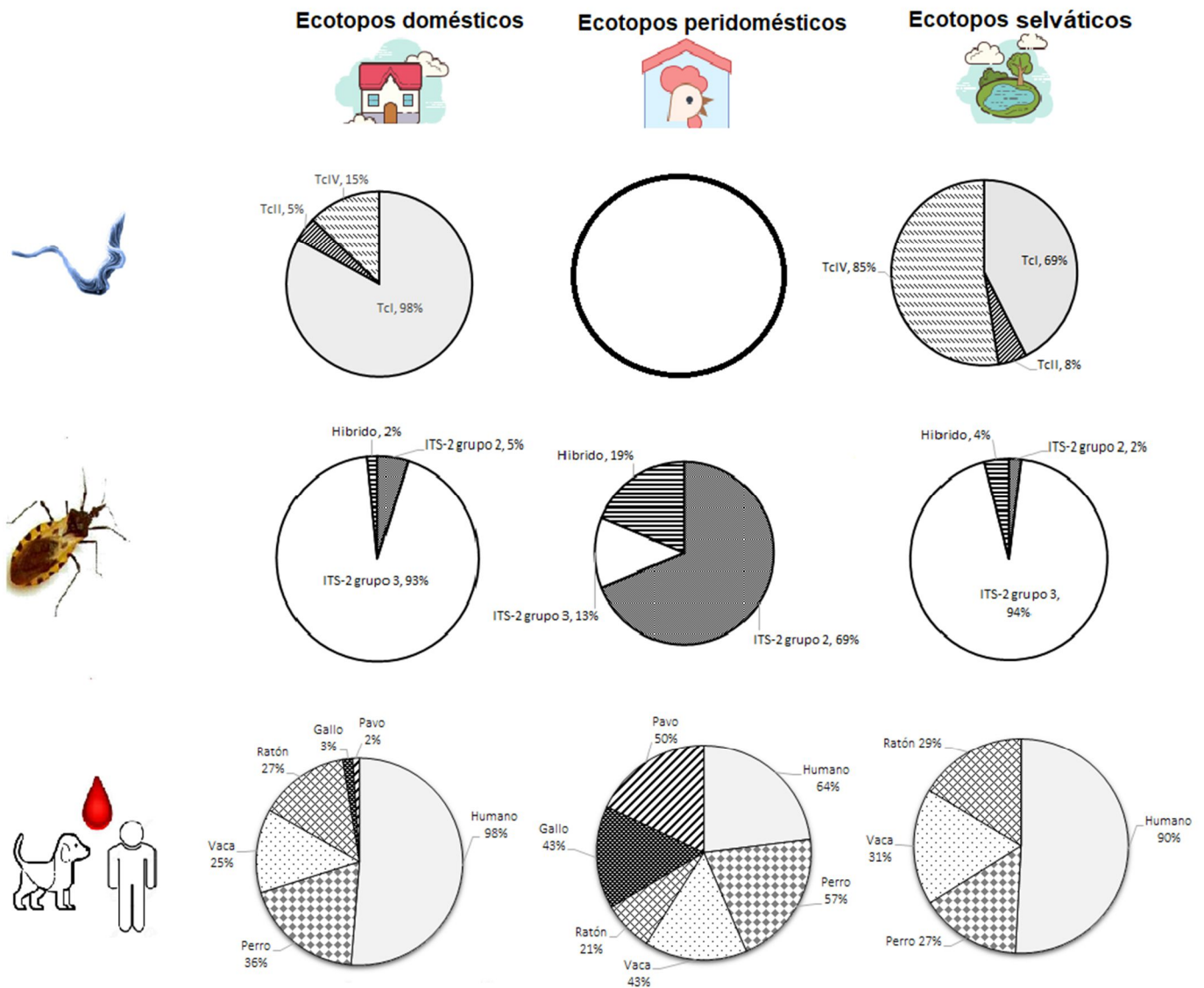


Figura 16 Representación gráfica de la estructuración espacial de los ciclos de transmisión de *T. cruzi*. La graficas de las fuentes alimenticias incluyen a las fuentes que se detectaron en $\geq 25\%$ de los insectos en cada ecotopo de colecta. La sumatoria puede ser mayor a 100%, debido a la detección de múltiples DTUs de *T. cruzi* o múltiples fuentes alimenticias en algunos insectos de *T. dimidiata*.

7 DISCUSIÓN

7.1 Prevalencia de la infección de *T. dimidiata* con *T. cruzi*.

La prevalencia de la infección de *T. dimidiata* con *T. cruzi* que encontramos en este estudio (8.7%) fue más baja que la que se reportó previamente en esta área (~ 30%)^{8,75}. Esta diferencia pudiera estar influenciada por cambios ambientales^{3,63,119}. Sabemos que *T. cruzi* depende de varias especies de mamíferos para completar su ciclo de vida^{3,63,119} y a su vez los reservorios vertebrados dependen del paisaje y disponibilidad de recursos¹²⁰.

Además, el desarrollo reciente de proyectos de implementación de estrategias de control de la enfermedad de Chagas en esta zona podría también explicar esta diferencia^{17,18,38,121–124}. Finalmente, no podemos descartar problemas de detección con la PCR. En este sentido, Moo-Millan et al. 2019 reportaron una inhibición de la reacción de PCR en 10% de las muestras⁸.

Cabe recalcar que no se encontró infección con *T. cruzi* en los insectos colectados en ecotopos peridomésticos. Esto pudiera estar relacionado con el hecho de que en ecotopos peridomésticos, los insectos se colectaron principalmente en áreas asociados a aves de corral (gallineros)¹²⁵, las cuales son refractarias a la infección con *T. cruzi*. Sin embargo, es importante resaltar que en estos insectos también identificamos animales competentes a la infección con *T. cruzi* (ej. humano, perro, vaca, ratón, armadillo, ver Cuadro 5).

A diferencia de lo reportado anteriormente⁸, encontramos que la prevalencia de la infección con *T. cruzi* es significativamente mayor en insectos colectados en ecotopos domésticos que en insectos colectados en ecotopos selváticos. Esto sugiere que los insectos están particularmente expuestos a la infección con *T. cruzi* en ecotopos domésticos, lo cual no resulta extraño, ya que se ha reportado (en este estudio y estudios previos) que una de las principales fuentes alimenticias de *T. dimidiata* es el perro y este se caracteriza por ser un importante reservorio doméstico de *T. cruzi* en Latinoamérica^{8,126–128}.

Además, una mayor prevalencia de *T. cruzi* en insectos colectados en ecotopos domésticos resalta el riesgo de transmisión intradomiciliaria (particularmente al humano) y la importancia de intervenir con estrategias de control para irrumpir los ciclos locales de transmisión de *T. cruzi* ^{4,5,23,47}.

7.2 Estatus alimenticio de *T. dimidiata*.

Alrededor del 90% de los insectos se encontraron alimentados. Esta proporción fue mayor a lo que se reportó previamente, y se explica probablemente por la metodología utilizada, en la cual reamplificamos sistemáticamente los productos de PCR cuando no se observaba ninguna banda después de la primera ronda de amplificación del marcador 12S. Esto también puede explicar que en nuestro estudio el porcentaje de insectos alimentados no se encontró asociado a los ecotopos de colecta, a diferencia de lo reportado en otros estudios donde reportan que los insectos colectados en ecotopos selváticos tienen un pobre estado nutricional ⁸.

7.3 Las DTUs de *T. cruzi*, grupos genéticos de *T. dimidiata*, y sus fuentes alimenticias en las poblaciones de estudio.

En este estudio se detectaron las DTUs TcI, TcII, y TcIV, confirmando que en México circulan diversas DTUs ^{15,22,43,61,62}. Otros estudios recientes confirman esta diversidad de DTUs circulando en triatomíneos y reservorios vertebrados ^{23,64–65}.

La DTU predominante fue la TcI, se encontró en más de 90% de los insectos y fue la DTU dominante en los insectos colectados en ecotopos domésticos (97% de los insectos), mientras que TcIV fue la DTU predominante en los insectos colectados en ecotopos selváticos (84%). Esto sugiere que existe una estructuración espacial de los ciclos de transmisión de *T. cruzi*. Además concuerda con lo reportado en estudios previos donde la DTU TcI es la DTU más abundante, principalmente en Norteamérica ^{15,22,23,43,47,61,62,70–72}, y la DTU TcIV se ha detectado en su mayoría en ciclos de transmisión selváticos ^{59,60}.

Encontramos infección con múltiples DTUs de *T. cruzi* en alrededor de 30% de los insectos infectados. Esto confirma la alta sensibilidad del abordaje del metabarcoding, que permite la identificación de más de una DTU en un mismo insecto ^{5,23}. Es importante mencionar que una vez que el insecto triatómino adquiere la infección con *T. cruzi*, será portador del parásito de por vida ⁸. Por lo tanto, las múltiples DTUs se pueden haber

adquirido en múltiples eventos de infección, pero también en un evento de infección único ocurrido al alimentarse de un reservorio infectado con múltiples DTUs.

Como previamente reportado, los insectos del grupo genético ITS-2 grupo 3 fueron los más abundantes (~85%)⁹¹. El porcentaje restante (~15%) fueron insectos del grupo genético ITS-2 grupo 2 e híbridos.

Los insectos del grupo ITS-2 grupo 2 e híbridos se identificaron principalmente en los ecotopos peridomésticos. La presencia de insectos híbridos de *T. dimidiata* ocurre por el apareamiento aleatorio entre chinches de diferentes grupos genéticos⁹¹. Por lo tanto, la abundancia de chinches del grupo genético híbrido va en función a prevalencia en conjunto de los grupos genéticos 2 y 3 en tiempo y espacio⁹¹.

Las áreas peridomésticas se han sugerido como propicias para la reproducción y el resguardo de las chinches. En nuestro estudio, los insectos del grupo genético híbrido de *T. dimidiata* fueron más abundantes en ecotopos peridomésticos y encontrados en simpatria con insectos del grupo genético ITS-2 grupo 2 (el grupo más abundante en estos ecotopos además de asociado significativamente a estos ecotopos) y 3^{125,129}. Por lo tanto, los ecotopos peridomésticos podrían fungir como sitios de reproducción e hibridación importantes de *T. dimidiata*.

Se encontró asociación significativa entre los grupos genéticos de *T. dimidiata* y la infección con *T. cruzi*, con una mayor prevalencia de la infección con *T. cruzi* en insectos del grupo genético ITS-2 grupo 3 que en los insectos del grupo genético ITS-2 grupo 2. En estudios previos no se encontró asociación significativa⁹¹.

El hecho de haber encontrado una asociación significativa entre infección con *T. cruzi* y grupo genético de *T. dimidiata* puede sugerir una estructuración espacial de los ciclos de transmisión de *T. cruzi*; En nuestro estudio, los insectos ITS-2 grupo 2 se identificaron principalmente en ecotopos peridomésticos donde no detectamos el parásito, mientras que los insectos ITS-2 grupo 3 se identificaron principalmente en ecotopos domésticos y selváticos donde circula el parásito y las principales DTUs TcI y TcIV, respectivamente.

En nuestras poblaciones de estudio, identificamos 30 especies de fuentes alimenticias y se lograron identificar hasta 6 fuentes alimenticias por insecto. La diversidad de fuentes alimenticias identificadas fue mayor a lo reportado en otros estudios^{8,68,130}, confirmando

la alta sensibilidad de nuestro abordaje de metabarcoding, el cual nos permitió detectar fuentes alimenticias múltiples, y no solo la dominante ²³.

A través de este estudio pudieron identificar a los potenciales reservorios de *T. cruzi* en. Sin embargo, para confirmar el carácter de reservorio de *T. cruzi* de las fuentes alimenticias de *T. dimidiata*, es necesario caracterizar las interacciones parásito-reservorio a partir de sangre u órganos de las especies de fuentes alimenticias de *T. dimidiata* identificadas en este estudio.

Las fuentes alimenticias detectadas en *T. dimidiata* incluyeron especies de animales tanto domésticos, como selváticos y sinantrópicos. Los animales detectados como fuentes alimenticias en nuestro estudio (Cuadro 5.) confirman lo reportado en un estudio previo donde predijeron la co-ocurrencia de *T. dimidiata* con diversas especies de mamíferos de la región ⁶³. Inesperadamente, no se detectó a la zarigüeya como fuente alimenticia en ninguno de los insectos, a pesar de ser el animal reportado como uno de los animales con mayor prevalencia de la infección con *T. cruzi* en la región (12-54%) ^{62,98}.

Es por ello que llegamos a dudar de la especificidad de los cebadores utilizados para amplificar ADN del género *Didelphis*. Sin embargo, en nuestro laboratorio logramos amplificar el gen 12S del ARN ribosomal a partir de ADN total extraído de sangre de zarigüeya (*Didelphis spp.*) y un estudio realizado en Guatemala utilizó la misma técnica y logró identificar a la zarigüeya como fuente alimenticia de triatominos ¹³¹. Esta ausencia también puede deberse a que las zarigüeyas estén adquiriendo la infección a través de otras vías como la vía oral y no precisamente por picadura y defecación del vector triatmino, y sugiere que este animal no sea realmente una fuente alimenticia de los triatominos en la región ⁸.

El humano se detectó como fuente alimenticia de más del 90% de los insectos colectados. Esto no es sorprendente, existen reportes previos donde el humano se ha detectado en altas proporciones en triatominos colectados tanto en ecotopos domésticos como peridomésticos e incluso en ecotopos selváticos ^{7,8,23,125,132,133}, por ejemplo en *T. infestans* en Bolivia ^{132,133}, *T. dimidiata* en Guatemala, Colombia y Yucatán ^{7,8,125,131}.

Además, gracias al insecto control criado en el laboratorio podemos descartar contaminación cruzada, en este insecto detectamos únicamente ADN de palomas.

Las principales fuentes alimenticias en todos los ecotopos fueron humano y perro, esto concuerda con lo reportado anteriormente, donde se menciona al perro como uno de los eslabones más importantes en la transmisión de *T. cruzi* al humano ⁸.

Por lo tanto, la reducción de las poblaciones de perros (campañas de esterilización); la vacunación de los perros para reducir su capacidad de carga parasitaria y capacidad de transmisión a los vectores triatominos (además de prevenir la progresión de las enfermedades cardíacas en estos reservorios); su protección con collares impregnados de insecticida ^{7,140}, pueden ser estrategias de control que logren interrumpir la transmisión intradomiciliaria de la enfermedad de Chagas al humano ^{7,8,14,16,18,85}

A demás de humano y perro se detectó una variedad de fuentes alimenticias que incluyo animales característicos de cada ecotopo de colecta. En insectos colectados en ecotopos selváticos los animales que se detectaron como fuentes alimenticias fueron principalmente animales selváticos; lo mismo sucedió con los insectos colectados en ecotopos domésticos, esto ya se había reportado ⁸. Por lo tanto, la conexión de los ciclos de transmisión de *T. cruzi* se sugiere que está dirigida por el movimiento del humano y el perro entre ecotopos. (Figura 16).

Para los insectos colectados en los ecotopos peridomésticos además de humano y perro las principales fuentes alimenticias fueron aves de corral (gallo, pavo) lo cual concuerda con lo reportado previamente ^{7,8,134}.

No se detectó infección en insectos colectados en los ecotopos peridomésticos, en este sentido, recientemente se sugirió la implementación de zooprofilaxis como estrategia de control; aumento de gallineros y/o aumento de las poblaciones aviares en las localidades rurales para generar un efecto de “dilución” de la infección de *T. cruzi* en *T. dimidiata* ⁷

Esta estrategia pudiera ser eficaz en controlar la transmisión del parásito *T. cruzi* al disminuir su densidad poblacional. Sin embargo, nosotros encontramos que existe una

asociación significativa entre la co-ocurrencia en un mismo insecto alimentado de aves de corral y animales competentes a la infección por *T. cruzi*.

De ser implementada esta estrategia de control, habría que evaluar los resultados secundarios que podría traer esta estrategia; como el posible aumento de poblaciones de vectores en los alrededores de los domicilios e incluso dentro de ellos, la presencia inesperada de otras enfermedades transmitidas por vectores, etc.

En cuanto a la alimentación con más de una fuente alimenticia y la co-ocurrencia entre especies hubo asociación significativa entre vaca y borrego. El ganado se encuentra en el traspatio de las casas (ecotopos peridomésticos) o en las afueras de las localidades (ranchos, periferias) ^{108,120}.

Una estrategia de control aplicada en estas áreas podría ser, por ejemplo, la reducción las cabezas de ganado (ayudar a la venta y/o promover el consumo) en las temporadas de inmigración de los insectos, para reducir el encuentro vector- reservorio. Actualmente no existen reportes de seroprevalencia de la infección en estos animales, por lo tanto, valdría la pena evaluarla y desarrollar estrategias de control sobre estos animales.

Estas estrategias en combinación con otras estrategias como la limpieza de los ecotopos peridomésticos o el uso de mosquiteros y/o trabajar con la gente del lugar reforzando la educación y el empoderamiento de la comunidad en la reducción factores de riesgo pueden mejorar la eficacia e interrumpir la transmisión intradomiciliaria de la enfermedad de Chagas ^{7,8,80,118,142,143}

A pesar de ver una variedad de fuentes alimenticias de *T. dimidiata* constituida por animales característicos de cada ecotopo de colecta no se detectó diferencia significativa entre la diversidad de fuentes alimenticias detectadas en los insectos colectados en los diferentes ecotopos (ni entre los grupos genéticos de *T. dimidiata*, estadios, sexos, estatus de infección con *T. cruzi* de *T. dimidiata* y DTUs infectantes). Esto pudiera ser un resultado del comportamiento generalista de *T. dimidiata* en el que la probabilidad de interacción depende del grado de co-ocurrencia vector-mamífero ⁶³.

Finalmente es importante mencionar que en nuestro estudio puede existir un sesgo muestral, es decir una distorsión que se introduce debido a la forma en que se seleccionó la muestra ¹⁴¹.

8 CONCLUSIONES

Los insectos del grupo genético ITS-2 grupo 2 de *T. dimidiata* están asociados a los ecotopos peridomésticos (también se identificaron insectos del grupo ITS- 3 grupo 3 e híbridos) además, estos insectos no se encontraron infectados a diferencia los insectos colectados en ecotopos domésticos y selváticos donde el principal grupo genético colectado fue ITS-2 grupo 3 (también se identificaron insectos del grupo ITS-2 grupo 2). Los insectos colectados en ecotopos domésticos están asociados a la infección con la DTU TcI y los insectos colectados en ecotopos selváticos están asociados a la infección con la DTU TcIV. De igual manera las fuentes alimenticias de *T. dimidiata* variaron según el ecotopo de colecta a pesar de que humano y perro fueron las principales fuentes alimenticias en todos los insectos.

Los patrones de alimentación e infección de *T. dimidiata*, sugieren que existe una estructuración espacial de los ciclos de transmisión de *T. cruzi* y que la conexión de los ciclos de transmisión pudiera estar dirigida por el movimiento del humano y de perros entre los ecotopos domésticos, peridomésticos y selváticos.

Los hallazgos permiten una mejor comprensión de los ciclos de transmisión de *T. cruzi*, que pueden contribuir al desarrollo de estrategias efectivas y sustentables en el control de la transmisión vectorial.

9 REFERENCIAS.

1. Organización Mundial de la Salud. Enfermedades transmitidas por vectores [Internet]. World Health Organization; 2018 [citado de enero de 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>.
2. Organización Panamericana de la Salud. Enfermedad de Chagas en las Américas: una revisión de la situación actual de salud pública y su visión para el futuro. 2018 [citado de junio de 2018] Disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=14399%3Aenfermedad-de-chagas-en-las-americas-una-revision-de-la-situacion-actual-de-salud-publica-y-su-vision-para-el-futuro&catid=3591%3Achagas-disease&Itemid=72315&lang=es.
3. Organización Mundial de la Salud. Enfermedad de Chagas: control y eliminación - 63a Asamblea Mundial de la Salud. 2010:1-5. [citado de enero de 2018] Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=15376&Itemid=.
4. Waleckx E, Arnal A, Dumonteil E. Metabarcoding, un nuevo enfoque para el estudio de los ciclos de transmisión de la enfermedad de Chagas y la ecología de sus vectores. en: Zamora–Bustillos R, Sandoval–Gío JJ, editors. Contribución de la Biotecnología al Desarrollo de la Península de Yucatán. Mérida, Yucatán, México: TECNM; 2019. p. 1052-1065.
5. Hernández-Andrade, A., Moo-Millan, J., Cigarroa-Toledo, N., Ramos-Ligonio, A., Herrera, C., Bucheton, B., y Roiz, D. 2019. Metabarcoding: A Powerful Yet Still Underestimated Approach for the Comprehensive Study of Vector-Borne Pathogen Transmission Cycles and Their Dynamics. En Vector-Borne Diseases-Recent Developments in Epidemiology and Control. IntechOpen.
6. Johnson PTJ, De Roode JC, Fenton A. Why infectious disease research needs community ecology. *Science* (80). 2015;349:6252.
7. Flores-Ferrer A, Waleckx E, Rascalou G, Dumonteil E, Gourbière S. *Trypanosoma cruzi* transmission dynamics in a synanthropic and domesticated host community. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13:12.
8. Moo-millan JI, Arnal A, Pérez-carrillo S, Hernandez-Andrade, A., Ramírez-Sierra, M. J., Rosado-Vallado, M., y Waleckx, E. Disentangling *Trypanosoma cruzi* transmission cycle dynamics through the identification of blood meal sources of natural populations of *Triatoma dimidiata* in Yucatán , Mexico. *Parasit Vectors*.; *Parasites & Vectors*, 2019;12:1:572.
9. Hotez PJ, Dumonteil E, Betancourt Cravioto M, Bottazzi, M. E, Tapia-Conyer, R., Meymandi, Sy Pecoul, B. An Unfolding Tragedy of Chagas Disease in North America. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7:10.
10. Arnal A, Waleckx E, Herrera C, Dumonteil E. Estimating the current burden of Chagas disease in Mexico: a systematic review of epidemiological surveys from 2006 to 2017. *bioRxiv*. 2018:423145.

11. Carabarin-Lima A, González-Vázquez MC, Rodríguez-Morales, O., Baylón-Pacheco, L., Rosales-Encina, J. L., Reyes-López, P. A., y Arce-Fonseca. Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: An update. *Acta Trop.* 2013;127:2:126-135.
12. Salud S de. Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información. Semana 45, 2017 [Internet]. gob.mx. [citado agosto de 2019]. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-boletin-epidemiologico>.
13. Dumonteil, E., Nouvellet, P., Rosecrans, K., Ramirez-Sierra, M. J., Gamboa-León, R., Cruz-Chan, V., y Gourbière, S. Eco-Bio-Social Determinants for House Infestation by Non-domiciliated *Triatoma dimidiata* in the Yucatan Peninsula, Mexico. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7:9.
14. Waleckx, E., Camara-Mejia, J., Ramirez-Sierra, M. J., Cruz-Chan, V., Rosado-Vallado, M., Vazquez-Narvaez, S., y Dumonteil, E. An innovative ecohealth intervention for Chagas disease vector control in Yucatan, Mexico. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2014;109:2:143-149.
15. Dorn, P. L., McClure, A. G., Gallaspy, M. D., Waleckx, E., Woods, A. S., Monroy, M. C., y Stevens, L. . The diversity of the Chagas parasite, *Trypanosoma cruzi*, infecting the main Central American vector, *Triatoma dimidiata*, from Mexico to Colombia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11:9:1-15.
16. Lima-Cordón, R. A., Stevens, L., Ortíz, E. S., Rodas, G. A., Castellanos, S., Rodas, A., y Monroy, M. C. . Implementation science: Epidemiology and feeding profiles of the Chagas vector *Triatoma dimidiata* prior to Ecohealth intervention for three locations in Central America. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12:11:1-19.
17. Charron D. Ecohealth Research in Practice: Innovative Applications of an Ecosystem Approach to Health, Insight and Innovation in Development. New York and Ottawa: Springer and International Development Research Centre, 2012.
18. Cha S, Pasos-alquicira R, Waleckx E, Pe S, Dumonteil E. Non-randomized controlled trial of the long- term efficacy of an Ecohealth intervention against Chagas disease in Yucatan , Mexico. 2018:1-15.
19. Barges, M. D., Klisiowicz, D. R., Gonzalez-Candelas, F., Ramsey, J. M., Monroy, C., Ponce, C., y Schofield, C. J. Phylogeography and genetic variation of *Triatoma dimidiata*, the main chagas disease vector in Central America, and its position within the genus *Triatoma*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2:5.
20. Junqueira, C., Caetano, B., Bartholomeu, D. C., Melo, M. B., Ropert, C., Rodrigues, M. M., y Gazzinelli, R. T. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: Lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Rev Mol Med.* 2010;12:1-23.
21. Enfermedades centro para el control y la prevencion de enfermedades C. Centro Para el Control y la Prevención de Enfermedades, CDC. Manual de Evaluación de la Actividad Física. 2006: 01-95 [citado de enero de 2018] Disponible en: <http://www.msal.gov.ar/argentina-saludable/pdf/Spanish-Eval-Handbook.pdf>.

22. Brenière SF, Waleckx E, Barnabé C. Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10:8:1-19.
23. Dumonteil, E., Ramirez-Sierra, M. J., Pérez-Carrillo, S., Teh-Poot, C., Herrera, C., Gourbière, S., y Waleckx, E. Detailed ecological associations of triatomines revealed by metabarcoding and next-generation sequencing: Implications for triatomine behavior and *Trypanosoma cruzi* transmission cycles. *Sci Rep*. 2018;8:1:1-13.
24. Barnabe, C., Buitrago, R., Bremond, P., Aliaga, C., Salas, R., Vidaurre, P., y Breniere S. Putative panmixia in restricted populations of *Trypanosoma cruzi* isolated from wild triatoma infestans in Bolivia. *PLoS One*. 2013;8:11.
25. Tibayrenc M, Kjellberg F, Ayala FJ. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc Natl Acad Sci*. 1990;87:7:2414-2418.
26. Ocana-Mayorga S, Llewellyn MS, Costales JA, Miles MA, Grijalva MJ. Sex, subdivision, and domestic dispersal of *Trypanosoma cruzi* Lineage I in Southern Ecuador. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4:12:1-8.
27. Marcili, A., Lima, L., Cavazzana, M., Junqueira, A., Veludo, H., Da Silva, F., y Teixeira, M. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology*. 2009;136:6:641-655.
28. Zingales, B., Miles, M. A., Campbell, D. A., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M., y Andrade S. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol*. 2012;12:2:240-253.
29. Westenberger SJ, Barnabé C, Campbell DA, Sturm NR. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics*. 2005;171:2:527-543.
30. Sturm NR, Vargas NS, Westenberger SJ, Zingales B, Campbell DA. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol*. 2003;33:3:269-279.
31. De Freitas, J. M., Augusto-Pinto, L., Pimenta, J. R., Bastos-Rodrigues, L., Gonçalves, V. F., Teixeira, S. M., y Machado, C. R. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog*. 2006;2:3.
32. Tomasini N, Diosque P. Evolution of *Trypanosoma cruzi*: Clarifying hybridisations, mitochondrial introgressions and phylogenetic relationships between major lineages. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110:3:403-413.
33. Jiménez P, Jaimes J, Poveda C, Ramírez JD. A systematic review of the *Trypanosoma cruzi* genetic heterogeneity, host immune response and genetic factors as plausible drivers of chronic chagasic cardiomyopathy . *Parasitology*. 2019;146:3:269-283.
34. Rozas, M., De Doncker, S., Aduai, V., Coronado, X., Barnabé, C., Tibayrenc, M., y

Dujardin. Multilocus Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment–Length Polymorphism Genotyping of *Trypanosoma cruzi* (Chagas Disease): Taxonomic and Clinical Applications. J Infect Dis. 2007;195:9:1381-1388.

35. Duffy, T., Bisio, M., Altcheh, J., Burgos, J. M., Diez, M., Levin, M. J., y Schijman, A. G. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. PLoS Negl Trop Dis. 2009;3:4.
36. Llewellyn, M. S., Messenger, L. A., Luquetti, A. O., Garcia, L., Torrico, F., Tavares, S. B., y Deleuze, J. F. Deep Sequencing of the *Trypanosoma cruzi* GP63 Surface Proteases Reveals Diversity and Diversifying Selection among Chronic and Congenital Chagas Disease Patients. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9:4:1-23.
37. Burgos, J. M., Diez, M., Vigliano, C., Bisio, M., Risso, M., Duffy, T., y Lucero, R. H. Molecular Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units in End-Stage Chronic Chagas Heart Disease and Reactivation after Heart Transplantation. Clin Infect Dis. 2010;51:5:485-495.
38. Ramirez-Sierra MJ, Herrera-Aguilar M, Gourbière S, Dumonteil E. Patterns of house infestation dynamics by non-domiciliated *Triatoma dimidiata* reveal a spatial gradient of infestation in rural villages and potential insect manipulation by *Trypanosoma cruzi*. Trop Med Int Heal. 2010;15:1:77-86.
39. Yeo, M., Mauricio, I. L., Messenger, L. A., Lewis, M. D., Llewellyn, M. S., Acosta, N., y Miles, M. A. Multilocus sequence typing (MLST) for lineage assignment and high resolution diversity studies in *Trypanosoma cruzi*. PLoS Negl Trop Dis. 2011;5:6.
40. Higuera SL, Guhl F, Ramírez JD. Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (DTUs) through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. Parasites and Vectors. 2013;6:1:1-6.
41. A. Prata. Clinical and epidemiological aspects of chagas disease. Lancet infection disease. Clin Epidemiol Asp Chagas Dis. 2001;1:92-100.
42. Orantes, L. C., Monroy, C., Dorn, P. L., Stevens, L., Rizzo, D. M., Morrissey, L., y Cahan, S. H. Uncovering vector, parasite, blood meal and microbiome patterns from mixed-DNA specimens of the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata*. PLoS Negl Trop Dis. 2018;12:10.
43. Ramos-Ligonio A, Torres-Montero J, López-Monteon A, Dumonteil E. Extensive diversity of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units circulating in *Triatoma dimidiata* from central Veracruz, Mexico. Infect Genet Evol. 2012;12:7:1341-1343.
44. Messenger LA, Miles MA, Bern C. Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. Expert Rev Anti Infect Ther. 2015;138:995-1029.
45. Tibayrenc M, Ayala FJ. The population genetics of *Trypanosoma cruzi* revisited in the light of the predominant clonal evolution model. Acta Trop. 2015;151:1:156-165.
46. Flores-Ferrer A, Marcou O, Waleckx E, Dumonteil E, Gourbière S. Evolutionary ecology of Chagas disease; what do we know and what do we need? Evol Appl. 2018;114:470-487.

47. Villanueva-Lizama, L., Teh-Poot, C., Majeau, A., Herrera, C., y Dumonteil, E. Molecular genotyping of *Trypanosoma cruzi* by next-generation sequencing of the mini-exon gene reveals infections with multiple parasite discrete typing units in Chagasic patients From Yucatan, Mexico. *The Journal of infectious diseases*, 2019;219:12.
48. Rassi A, Rassi A, Marcondes de Rezende J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infect Dis Clin North Am*. 2012;26:2:275-291.
49. Andrade LO, Machado CRS, Chiari E, Pena SDJ, Macedo AM. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Mol Biochem Parasitol*. 1999;100:2:163-172.
50. Lewis MD, Francisco AF, Taylor MC, Jayawardhana S, Kelly JM. Host and parasite genetics shape a link between *Trypanosoma cruzi* infection dynamics and chronic cardiomyopathy. *Cell Microbiol*. 2016;18:10:1429-1443.
51. Gironès N, Rodríguez CI, Carrasco-Marín E, Hernáez RF, López de Rego J, Fresno M. Dominant T- and B-cell epitopes in an autoantigen linked to Chagas' disease. *J Clin Invest*. 2001;107:8:985-993.
52. Poveda, C., Fresno, M., Gironès, N., Martins-Filho, O. A., Ramírez, J. D., Santi-Rocca, J., y Guhl, F. Cytokine profiling in chagas disease: Towards understanding the association with infecting *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (A benefit trial sub-study). *PLoS One*. 2014;9:3:1-8.
53. Sanoja C, Carbajosa S, Fresno M, Gironès N. Analysis of the Dynamics of Infiltrating CD4+ T Cell Subsets in the Heart during Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. *PLoS One*. 2013;8:6.
54. Messenger LA, Miles MA. Evidence and importance of genetic exchange among field populations of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop*. 2015;151:1:150-155.
55. Messenger LA, Miles MA, Bern C. Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2015;13:8:995-1029.
56. Burgos, J. M., Altcheh, J., Bisio, M., Duffy, T., Valadares, H. M., Seidenstein, M. E., y Macedo, A. M. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *Int J Parasitol*. 2007;37:12:1319-1327.
57. Luquetti, A. O., Tavares, S. B., Siriano, L. D., Oliveira, R. A. D., Campos, D. E., Morais, C. y Oliveira, E. C. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in central Brazil. A study of 1,211 individuals born to infected mothers. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110:3:369-376.
58. Zumaya-Estrada, F. A., Messenger, L. A., Lopez-Ordóñez, T., Lewis, M. D., Flores-Lopez, C. A., Martínez-Ibarra, A. J., y Miles, M. A.. North American import? Charting the origins of an enigmatic *Trypanosoma cruzi* domestic genotype. *Parasites and Vectors*. 2012;5:1:1-9.
59. Carrasco, H. J., Segovia, M., Llewellyn, M. S., Morocoima, A., Urdaneta-Morales, S., Martínez, C., y de Noya, B. Geographical distribution of *Trypanosoma cruzi*

genotypes in Venezuela. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6:6.

60. Guhl F. Molecular Epidemiology of *Trypanosoma cruzi*. Rev Esp Salud Publica. 2013;1-8.
61. Ibáñez-Cervantes, G., Martínez-Ibarra, A., Noguera-Torres, B., López-Orduña, E., Alonso, A. L., Perea, C., y León-Avila, G.. Identification by Q-PCR of *Trypanosoma cruzi* lineage and determination of blood meal sources in triatomine gut samples in Mexico." Parasitology international 2013: 62:1:36-43.
62. López-Cancino, S. A., Tun-Ku, E., De la Cruz-Felix, H. K., Ibarra-Cerdeña, C. N., Izeta-Alberdi, A., Pech-May, A., y Ramsey, J. M. Landscape ecology of *Trypanosoma cruzi* in the southern Yucatan Peninsula. Acta Trop. 2015;151:1:58-72.
63. Ibarra-Cerdeña CN, Valiente-Banuet L, Sánchez-Cordero V, Stephens CR, Ramsey JM. *Trypanosoma cruzi* reservoir—triatomine vector co-occurrence networks reveal meta-community effects by synanthropic mammals on geographic dispersal. PeerJ. 2017;5.
64. Pennington PM, Paiz C, Grajeda LM, Cordón-Rosales C. Short report: Concurrent detection of *Trypanosoma cruzi* lineages I and II in domestic *Triatoma dimidiata* from Guatemala. Am J Trop Med Hyg. 2009;80:2:239-241.
65. Ruíz-Sánchez, R., León, M. P. D., Matta, V., Reyes, P. A., López, R., Jay, D., y Monteón, V. M. *Trypanosoma cruzi* isolates from Mexican and Guatemalan acute and chronic chagasic cardiopathy patients belong to *Trypanosoma cruzi* I. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005;100:3:281-283.
66. Flores-Ferrer A, Marcou O, Waleckx E, Dumonteil E, Gourbière S. Evolutionary ecology of Chagas disease; what do we know and what do we need. Evol Appl. 2018;11:4:470-487.
67. Herrera CP, Licon MH, Nation CS, Jameson SB, Wesson DM. Genotype diversity of *Trypanosoma cruzi* in small rodents and *Triatoma sanguisuga* from a rural area in New Orleans, Louisiana. Parasites and Vectors. 2015;8:1:1-9.
68. Waleckx E, Suarez J, Richards B, Dorn PL. *Triatoma sanguisuga* blood meals and potential for chagas disease, Louisiana, USA. Emerg Infect Dis. 2014;20:12:2141-2143.
69. Gürtler, R. E., Cecere, M. C., Vázquez-Prokopec, G. M., Ceballos, L. A., Gurevitz, J. M., del Pilar Fernández, M., y Cohen, J. E. Domestic Animal Hosts Strongly Influence Human-Feeding Rates of the Chagas Disease Vector *Triatoma infestans* in Argentina. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8:5.
70. Monteiro, F. A., Peretolchina, T., Lazoski, C., Harris, K., Dotson, E. M., Abad-Franch, F., y Salazar-Schettino. Phylogeographic Pattern and Extensive Mitochondrial DNA Divergence Disclose a Species Complex within the Chagas Disease Vector *Triatoma dimidiata*. PLoS One. 2013;8:8.
71. Cab M. Caracterización biológica y aportación filogenética de aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos de una población sinantrópica de *Didelphis virginiana* (Mammalia : Didelphimorphia). Tesis doctoral. UADY. Yucatán. 2016.

72. Pérez, S. Determinación de la infección natural y de los linajes de *Trypanosoma cruzi* asociados con la estructura genética de *Triatoma dimidiata* vector de la enfermedad de Chagas en Teya, Yucatán, México. Instituto Tecnológico De Conkal. Yucatán. 2013:42.
73. Rengifo-Correa, L., Stephens, C. R., Morrone, J. J., Téllez, J. L., y Gonzalez-Salazar, C. Understanding transmissibility patterns of Chagas disease through complex vector–host networks. *Parasitology*. 2017;144:6:760-772.
74. Curtis-Robles R, Lewis BC, Hamer SA. High *Trypanosoma cruzi* infection prevalence associated with minimal cardiac pathology among wild carnivores in central Texas. *Int J Parasitol Parasites Wildl*. 2016;5:2:117-123.
75. Dumonteil, E., Gourbière, S., Barrera-Pérez, M., Rodríguez-Félix, E., Ruiz-Piña, H., Baños-Lopez, O., y Rabinovich, J. E. Geographic distribution of *Triatoma dimidiata* and transmission dynamics of *Trypanosoma cruzi* in the Yucatan Peninsula of Mexico. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;67:2:176-183.
76. Noireau F, Diosque P, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi*: Adaptation to its vectors and its hosts. *Vet Res*. 2009;40:2.
77. Rabinovich JE, dan Kitron U, Obed Y, Yoshioka M, Gottdenker N, Chaves LF. Ecological patterns of blood-feeding by kissing-bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106:4:479-494.
78. Coura JR, Viñas PA, Junqueira ACV. Ecoepidemiology, Short history and control of chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109:7:856-862.
79. Dorn, P. L., Nicholas, M., Axen, H., Smith, N., Richards, B. R., Charabati, J., y Kilpatrick, C. Hypothesis testing clarifies the systematics of the main Central American Chagas disease vector, *Triatoma dimidiata*, across its geographic range. *Infect Genet Evol*. 2016;44:431-443.
80. Castillo D, Wolff M. Aspectos del comportamiento de los triatominos (Hemiptera: Reduviidae), vectores de la enfermedad de Chagas. *Biomédica, Rev del Inst Nac Salud*. 2000;20:1:59-64.
81. Ruiz-piña H, Reyes-novelo E. Mamíferos sinantrópicos y la transmisión de enfermedades zoonóticas en el área rural de Yucatán. 2013;(September).
82. Minter-Goedbloed E, A. B. Croon JJ. The insusceptibility of chickens to *Trypanosoma cruzi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1981;75:3:350-353.
83. Kierszenbaum, F., Gottlieb, C. A., y Budzko, D. B. Antibody-independent, natural resistance of birds to *Trypanosoma cruzi* infection. *The Journal of parasitology*. 1981: 656-660.
84. Lent, H., y Wygodzinsky, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bulletin of the American museum of Natural History*, 1979:163:3:123-520.
85. Waleckx E, Gourbière S, y Dumonteil E. Intrusive versus domiciliated triatomines

and the challenge of adapting vector control practices against chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015;110:3:324-338.

86. Gourbière S, Dorn P, Tripet F, Dumonteil E. Genetics and evolution of triatomines: From phylogeny to vector control. Heredity (Edinb). 2012;108:3:190-202.
87. Justi SA, Cahan S, Stevens L, Monroy C, Lima-cordón R, Dorn PL. Molecular Phylogenetics and Evolution Vectors of diversity : Genome wide diversity across the geographic range of the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata* sensu lato (Hemiptera : Reduviidae). Mol Phylogenet Evol. 2018;120:144-150.
88. Marcilla, A., Barges, M. D., Ramsey, J. M., Magallon-Gastelum, E., Salazar-Schettino, P. M., Abad-Franch, F., y Mas-Coma, S. The ITS-2 of the nuclear rDNA as a molecular marker for populations, species, and phylogenetic relationships in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. Mol Phylogenet Evol. 2001;18:1:136-142.
89. Landaverde-González P, Menes M, Melgar S, Bustamante D, Monroy C. Common pattern of distribution for Mesoamerican *Triatoma dimidiata* suggest geological and ecological association. Acta Trop. 2020;204
90. Lima-Cordón, R. A., Monroy, M. C., Stevens, L., Rodas, A., Rodas, G. A., Dorn, P. L., y Justi, S. A. Description of *Triatoma huehuetenanguensis* sp. N., a potential chagas disease vector (hemiptera, reduviidae, triatominae). Zookeys. 2019;820:51-70.
91. Herrera-Aguilar M, Be-Barragán LA, Ramirez-Sierra MJ, Tripet F, Dorn P, Dumonteil E. Identification of a large hybrid zone between sympatric sibling species of *Triatoma dimidiata* in the Yucatan peninsula, Mexico, and its epidemiological importance. Infect Genet Evol. 2009;9:6:1345-1351.
92. Barbu C, Dumonteil E, Gourbière S. Evaluation of spatially targeted strategies to control non-domiciliated *Triatoma dimidiata* vector of chagas disease. PLoS Negl Trop Dis. 2011;5:5.
93. Waleckx E, Pasos-Alquicira R, Ramírez-Sierra MJ, Dumonteil E. Sleeping habits affect access to host by Chagas disease vector *Triatoma dimidiata*. Parasites and Vectors. 2016;9:1:1-6.
94. Dumonteil, E., Gourbière, S., Barrera-Pérez, M., Rodríguez-Félix, E., Ruiz-Piña, H., Baños-Lopez, O., y Rabinovich, J. Geographic distribution of *Triatoma dimidiata* and transmission dynamics of *Trypanosoma cruzi* in the Yucatan Peninsula of Mexico. Am J Trop Med Hyg. 2002;67:2:176-183.
95. Barbu C, Dumonteil E, Gourbière S. Characterization of the dispersal of non-domiciliated *Triatoma dimidiata* Through the selection of spatially explicit models. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4:8.
96. Farfán-García AE, Angulo-Silva VM. *Triatoma dimidiata* populations' (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) feeding behaviour in an endemic zone and related epidemiological implications. Rev Salud Publica. 2011;13:1:163-172.
97. Guzman-Tapia Y, Ramírez-Sierra MJ, Dumonteil E. Urban Infestation by *Triatoma dimidiata* in the City of Mérida, Yucatán, México. Vector-Borne Zoonotic Dis.

2007;7:4:597-606.

98. Zavala-Velazquez J. La enfermedad de Chagas en el estado de Yucatan, Mexico. *Rev Biomed.* 2003;14:1:35-43.
99. Zeledn R, Rica UDC, Jose S, Rica C. Emphasis on its Insect Vectors. *World Health.*1981:51.
100. Cruz-reyes A, Pickering-lópez JM. Chagas disease in Mexico : an analysis of geographical distribution during the past 76 years - A Review. 2006;101:345-354.
101. Jiang, X., Peery, A., Hall, A. B., Sharma, A., Chen, X. G., Waterhouse, R. M., y Lawson, D. Genome analysis of a major urban malaria vector mosquito, *Anopheles stephensi*. 2014;15:9:459.
102. Massad E, Coutinho FAB. Vectorial capacity, basic reproduction number, force of infection and all that: Formal notation to complete and adjust their classical concepts and equations. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107:4:564-567.
103. Logue, K., Keven, J. B., Cannon, M. V., Reimer, L., Siba, P., Walker, E. D., y Serre, D. Unbiased Characterization of *Anopheles Mosquito* Blood Meals by Targeted High- Throughput Sequencing. *PLoS neglected tropical diseases.* 2016;10:3:1-18.
104. Rinker DC, Pitts RJ, Zwiebel LJ. Disease vectors in the era of next generation sequencing. *Genome Biol.* 2016;17:1:1-11.
105. Kieran, T. J., Gottdenker, N. L., Varian, C. P., Saldaña, A., Means, N., Owens, D., y Glenn, T. C. Blood Meal Source Characterization Using Illumina Sequencing in the Chagas Disease Vector *Rhodnius pallescens* (Hemiptera: Reduviidae) in Panamá. *J Med Entomol.* 2017;54:6:1786-1789.
106. Reeves LE, Gillett-Kaufman JL, Kawahara AY, Kaufman PE. Barcoding blood meals: New vertebrate-specific primer sets for assigning taxonomic identities to host DNA from mosquito blood meals. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12:8.
107. Durán-García R, Méndez-González ME. Selva baja caducifolia con cactáceas candelabriformes. *Biodivers y Desarro Hum en Yucatán. CICY.* 2010:141-142..
108. García-Frapolli E, Toledo V, Martínez Alier J. Apropiación de la naturaleza por una comunidad Maya yucateca: un análisis económico-ecológico. *Rev Iberoam Econ Ecológica. REVIBEC.* 2008;7:7:27-42.
109. Moser DR, Cook GA, Ochs DE, Bailey CP, McKane MR, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Parasitology.* 1989;99 Pt 1:7:57-66.
110. Kitano T, Umetsu K, Tian W, Osawa M. Two universal primer sets for species identification among vertebrates. *Int J Legal Med.* 2007;121:5:423-427.
111. Wong, Y. Y., Macias, K. J., Martínez, D. G., Solorzano, L. F., Ramirez-Sierra, M. J., Herrera, C., y Dumonteil, E. Molecular epidemiology of *Trypanosoma cruzi* and *Triatoma dimidiata* in costal Ecuador. *Infect Genet Evol.* 2016;41:207-212.
112. Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers

- define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1996;83:2:141-152.
113. Majeau, A., Herrera, C., y Dumonteil, E. An improved approach to *Trypanosoma cruzi* molecular genotyping by next-generation sequencing of the mini-exon gene. In *T. cruzi* Infection . Humana Press, New York, NY. 2019. pp. 47-60
 114. Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*. 2011;27:16:2194-2200.
 115. Wilson Score RG. Improved confidence intervals for the difference between binomial proportions based on paired data. *Stat Med*. 1998;17:22.
 116. Bonferroni, C. E., Bonferroni, C., y Bonferroni, C. E. Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilita. 1936.
 117. Shapiro, S. S., Wilk, M. B., y Chen, H. J. 1968. A comparative study of various tests for normality. *Journal of the American statistical association*, 1968:63:324.
 118. Kruskal, W. H. A nonparametric test for the several sample problem. *The Annals of Mathematical Statistics*.1952. 23:4:525-540..
 119. Villalobos, G., Nava-Bolaños, A., De Fuentes-Vicente, J. A., Téllez-Rendón, J. L., Huerta, H., Martínez-Hernández, F., y Córdoba-Aguilar, A. A reduction in ecological niche for *Trypanosoma cruzi*-infected triatomine bugs. *Parasites and vectors*. 2019.12:1:240.
 120. Durán García R, Arellano Morín J, Méndez Gonzáles ME. Hacia la estrategia estatal de biodiversidad. *Biodivers y Desarro Hum en Yucatán*. 2010:483-490.
 121. Rosecrans K, Cruz-Martin G, King A, Dumonteil E. Opportunities for Improved Chagas Disease Vector Control Based on Knowledge, Attitudes and Practices of Communities in the Yucatan Peninsula, Mexico. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8:3.
 122. Dumonteil, E., Nouvellet, P., Rosecrans, K., Ramirez-Sierra, M. J., Gamboa-León, R., Cruz-Chan, V., y Gourbière, S. Eco-Bio-Social Determinants for House Infestation by Non-domiciliated *Triatoma dimidiata* in the Yucatan Peninsula, Mexico. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7:9:1-9.
 123. Pacheco-Tucuch FS, Ramirez-Sierra MJ, Gourbière S, Dumonteil E. Public street lights increase house infestation by the chagas disease vector triatoma dimidiata. *PLoS One*. 2012;7:4:3-9.
 124. Dumonteil E, Ramirez-Sierra MJ, Ferral J, Euan-Garcia M, Chavez-Nuñez L. Usefulness of Community Participation for the Fine Temporal Monitoring of House Infestation by Non-Domiciliated Triatomines. *J Parasitol*. 2009;95:2:469-471.
 125. Koyoc-Cardena, E., Medina-Barreiro, A., Escobedo-Ortegón, F. J., Rodríguez-Buenfil, J. C., Barrera-Perez, M., Reyes-Novelo, E., y Manrique-Saide, P. Chicken coops, *Triatoma dimidiata* infestation and its infection with *Trypanosoma cruzi* in a rural village of Yucatan, Mexico. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2015. 57:3: 269-272.
 126. Curtis-Robles R, Meyers AC, Auckland LD, Zecca IB, Skiles R, Hamer SA. Parasitic interactions among *Trypanosoma cruzi*, triatomine vectors, domestic animals, and

- wildlife in Big Bend National Park along the Texas-Mexico border. *Acta Trop.* 2018;188:225-233.
127. Bustamante DM, De Urioste-Stone SM, Juárez JG, Pennington PM. Ecological, social and biological risk factors for continued *Trypanosoma cruzi* transmission by *Triatoma dimidiata* in Guatemala. *PLoS One.* 2014;9:8.
 128. Enriquez GF, Cardinal M V., Orozco MM, Schijman AG, Gürtler RE. Detection of *Trypanosoma cruzi* infection in naturally infected dogs and cats using serological, parasitological and molecular methods. *Acta Trop.* 2013;126:3:211-217.
 129. Ramírez-González MG, Flores-Villegas AL, Salazar-Schettino PM, Gutiérrez-Cabrera AE, Rojas-Ortega E, Córdoba-Aguilar A. Zombie bugs? Manipulation of kissing bug behavior by the parasite *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 2019;200.
 130. Bosseno, M. F., García, L. S., Baunaure, F., Gastelúm, E. M., Gutierrez, M. S., Kasten, F. L., y Brenière, S. F. Short report: Identification in triatomine vectors of feeding sources and *Trypanosoma cruzi* variants by heteroduplex assay and a multiplex miniexon polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;74:2:303-305.
 131. Stevens L, Monroy MC, Rodas AG, Dorn PL. Hunting, Swimming, and Worshiping: Human Cultural Practices Illuminate the Blood Meal Sources of Cave Dwelling Chagas Vectors (*Triatoma dimidiata*) in Guatemala and Belize. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8:9.
 132. Buitrago, N. L. R., Bosseno, M. F., Waleckx, E., Brémond, P., Vidaurre, P., Zoveda, F., y Brenière, S. F. Risk of transmission of *Trypanosoma cruzi* by wild *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Bolivia supported by the detection of human blood meals. *Infection, Genetics and Evolution.* 2013: 19: 141-144..
 133. Buitrago, R., Bosseno, M. F., Depickère, S., Waleckx, E., Salas, R., Aliaga, C., y Brenière, S. F. Blood meal sources of wild and domestic *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Bolivia: Connectivity between cycles of transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Parasites and Vectors.* 2016;9:1:1-10.
 134. S Schwarz, A., Sternberg, J. M., Johnston, V., Medrano-Mercado, N., Anderson, J. M., Hume, J. C., y Billingsley, P. F. Antibody responses of domestic animals to salivary antigens of *Triatoma infestans* as biomarkers for low-level infestation of triatomines. *Int J Parasitol.* 2009;39:9:1021-1029.
 135. Izeta-Alberdi A, Ibarra-Cerdeña CN, Moo-Llanes DA, Ramsey JM. Geographical, landscape and host associations of *Trypanosoma cruzi* DTUs and lineages. *Parasites and Vectors.* 2016;9:1:1-20.
 136. Monteon V, Alducin C, Hernández J, Ramos-Ligonio A, Lopez R. High frequency of human blood in *Triatoma dimidiata* Captured inside dwellings in a rural community in the Yucatan Peninsula, Mexico, but low antibody seroprevalence and electrocardiographic findings compatible with Chagas disease in humans. *Am J Trop Med Hyg.* 2013;88:3:566-571.
 137. Ramsey JM, Schofield CJ. Control of Chagas disease vectors. *Salud Publica Mex.* 2003;45:2:123-128.

138. Amelotti I, Catalá SS, Gorla DE. Effects of fipronil on dogs over *Triatoma infestans*, the main vector of *Trypanosoma cruzi*, causative agent of Chagas disease. *Parasitol Res.* 2012;111:4:1457-1462.
139. Gürtler, R. E., Ceballos, L. A., Stariolo, R., Kitron, U., y Reithinger, R. Effects of topical application of fipronil spot-on on dogs against the Chagas disease vector *Triatoma infestans*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 2009.103:3: 298-304.
140. Quijano-Hernández IA, Castro-Barcena A, Vázquez-Chagoyán JC, Bolio-González ME, Ortega-López J, Dumonteil E. Preventive and therapeutic DNA vaccination partially protect dogs against an infectious challenge with *Trypanosoma cruzi*. *Vaccine.* 2013;31:18:2246-2252.
141. Schwartz, L. F., Lineberry, M., Park, Y. S., Kamin, C. S., y Hyderi, A. A.. Development and evaluation of a student-initiated test preparation program for the USMLE step 1 examination. *Teaching and learning in medicine,* 2018: 30:2:, 193-201.

