



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS



Licenciatura en Biología

“Caracterización genética de los linajes de *Trypanosoma cruzi* en poblaciones del vector *Dipetalogaster maxima*”

Proyecto de Tesis del

Sr. Esteban Andres Esquivias Flores

como requisito parcial para obtener el Título

Profesional de

Biólogo

Director de Tesis: Carlos Alberto Flores López

Ensenada, Baja California, México, 7 de febrero del 2022

I

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS

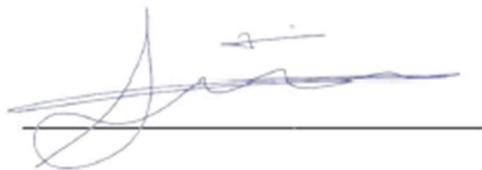
**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LOS LINAJES DE *Trypanosoma cruzi* EN
POBLACIONES DEL VECTOR *Dipetalogaster maxima*.**

T E S I S P R O F E S I O N A L

QUE PRESENTA

ESTEBAN ANDRES ESQUIVIAS FLORES

APROBADO POR

A blue ink signature, appearing to read 'Julio', written over a horizontal line.

Dr. Julio Enrique Valencia Suárez
Sinodal

A black ink signature, appearing to read 'Andrés', written over a horizontal line.

Dr. Andrés Martínez Aquino
Sinodal

A black ink signature, appearing to read 'Carlos', written over a horizontal line.

Dr. Carlos Alberto Flores López
Director

RESUMEN

Resumen de la tesis de Esteban Andres Esquivias Flores presentada como requisito parcial para la obtención de la Licenciatura en Biología. Ensenada, Baja California, México. Febrero de 2023.

“Caracterización genética de los linajes de *Trypanosoma cruzi* en poblaciones del vector *Dipetalogaster maxima*”

Resumen aprobado:



Dr. Carlos Alberto Flores López

Los hemípteros de la subfamilia Triatominae son chinches hematófagas que se alimentan de distintos grupos de mamíferos, “reptiles” y aves. Las especies de Triatominae son vectores del parásito *Trypanosoma cruzi*, agente responsable de la enfermedad de Chagas. El sistema taxonómico utilizado para clasificar al parásito se conoce como unidades discretas de tipificación por su siglas en inglés como Discrete Typing Units (DTU's), definiéndose estos como un conjunto de organismos que pertenecen a la misma especie pero que cuentan con diferencias genético-moleculares insuficientes para categorizarse como una subespecie. Distintos estudios han encontrado una correlación entre el DTU de *T. cruzi* con las distintas patologías que puede desarrollar una persona infectada, por lo que es de suma importancia determinar los DTU's que se encuentren circulando en una región geográfica. Esta tesis tuvo como objetivo describir los DTU's de *T. cruzi* presentes en el vector *Dipetalogaster maxima*, el cual es un vector endémico de la región de Cabo en Baja California Sur. La descripción genética se realizó a partir de la amplificación y secuenciación de cinco marcadores moleculares. Se diagnosticaron aproximadamente 924 especímenes del vector, colectados entre los años 2016-2021 a través de la distribución natural del vector. Las secuencias obtenidas se utilizaron para construir árboles filogenéticos a partir del método Bayesiano. Nuestros resultados arrojaron que hay un predominio del DTU TcI (comúnmente asociado con patologías miocardiopáticas), así como la presencia del DTU TcIV y TcIV-USA (un linaje nuevo recientemente descrito). Adicionalmente se encontró la presencia del parásito *T. rangeli* en una sola chinche, siendo este el primer estudio que reporta a esta especie en México. En conclusión, nuestros resultados concuerdan con otros estudios similares de México, en donde predomina el DTU TcI. Además, se reporta por vez primera a la TcIV-USA en México, por lo que se sugiere continuar ampliando el número de vectores, hospederos y regiones geográficas incluidos en estudios de esta naturaleza, para continuar describiendo la diversidad genética de *T. cruzi* que circula actualmente en la naturaleza.

Palabras clave: DTU, Triatominae, Hematófago, Filogenias, Chagas

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis padres Jorge, Lorena y mis hermanos Mariel y Jorge que sin ellos y sin su apoyo no podría estar en el lugar donde estoy en este mismo momento. A pesar de que esto representa la culminación de una etapa de 4-5 años, esto no significa que será el momento de dejar de echarle las ganas que se merece, esto simplemente es el inicio de mi vida en la biología y sin su presencia no podría estar aquí.

A mis compañeros y amigos biólogos (mención honorífica al shortyfest que los tkm y que han dejado marca en mí desde la pandemia hasta el momento) que siempre han representado una gran parte de mi felicidad en Ensenada y en mi vida, es bueno saber que tengo colegas en los cuales puedo confiar y que pueden confiar en mí, tanto en lo profesional como en lo amistoso.

A todas las personas que he conocido en esta travesía por la universidad las cuales me han otorgado pizcas de conocimiento y habilidades que me permiten estar presente en estos momentos, sintiéndome pleno y capaz de superar cualquier obstáculo o reto sea o no en el rubro de la biología. Y a los profesores que marcaron mi formación académica como la Dra. Alejandra, Dr. Ernesto, Dr. Alejandro, Dr. Julio V., Dr. Julio L., Dr. Gorgonio, Dr. Andrés, Dr. Aldo, entre otros.

Al Dr. Carlos Flores que siempre ha estado apoyándome y que no ha desistido en toda esta travesía de realizar una tesis y este proyecto conmigo, el cual cree en mi potencial y en mi futuro académico/profesional. A usted no solo lo veo como un colega o un mentor, también como un gran amigo.

A la Universidad Autónoma de Baja California por otorgarme todos estos momentos, recuerdos y vivencias al lado de personas tan importantes y significativas para mi desarrollo personal y profesional. A pesar de no haber tenido las mejores experiencias debido a percances administrativos o por la forma en la que se rige la universidad, agradezco la oportunidad de ser un Cimarrón.

Y un agradecimiento especial a una de las personas que más quiero en esta vida, que sin su presencia, sus regaños, sus motivaciones y sus nalgadas en mis pomponelas, no sería la persona que soy en estos momentos, no sería capaz de darme cuenta de todo el potencial que tengo, de la calidad de biólogo que soy y puedo ser.

A ti mi rockybolonias te agradezco esto y mucho más, gracias por nuestra relación y por todo lo que he aprendido de ti y de mí, nuestro pasado, presente y futuro.

Mil gracias, Elisa.

ÍNDICE

Resumen	II
Agradecimientos	III
Introducción	5
Antecedentes	9
Hipótesis	12
Objetivo	12
Objetivo general	12
Objetivos específicos	12
Metodología	13
Colecta de individuos	13
Identificación de chinches	18
Extracción de ADN	18
Diagnóstico de <i>T. cruzi</i>	21
Amplificación de marcadores para análisis filogenético	24
Secuenciación de amplicones y análisis filogenéticos	26
Resultados	33
Muestras diagnosticadas	33
Análisis filogenéticos	35
Discusión	44
Descripción de DTU's en <i>D. maxima</i>	44
Descripción de <i>T. rangeli</i>	47
Baja prevalencia de <i>T. cruzi</i> en <i>D. maxima</i>	49
Alto índice de DTU's en <i>D. maxima</i>	50
Conclusiones	53
Referencias	54

INTRODUCCIÓN

El parásito *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), es el protozoario responsable de causar el mal de Chagas, una enfermedad letal que ha logrado salir del área a la que es endémica (*i.e.*, Latinoamérica), por lo que actualmente se considera como una enfermedad de impacto global (Tanowitz, Weiss, & Montgomery, 2011). El parásito tiene distintas formas en las cuales puede infectar a una persona, sin embargo, el principal mecanismo de transmisión es a partir de las chinches hematófagas de la subfamilia Triatominae (*i.e.*, triatominos). Estas actúan como vectores naturales del parásito dado que este es digenético, es decir, que requiere dos hospederos distintos para completar su ciclo de vida. El ciclo de vida se desarrolla dentro de un vector triatomo (Filo: Arthropoda; Clase: Insecta; Orden: Hemiptera; Familia: Reduviidae; Subfamilia: Triatominae) y un hospedero definitivo que suelen ser mamíferos de los órdenes: Cingulata, Pilosa, Chiroptera, Carnivora, Rodentia, Lagomorpha, Primates y de la infraclass Marsupialia (Coura & Dias, 2009). Incluso, llegan a infectar a mascotas como: perros, gatos, ratas, ratones y cuyes (Coura & Dias, 2009). Recientemente se describió su presencia en la lechuga común americana (*Tyto furcata*), rompiendo el patrón de especificidad hospedatoria de *T. cruzi* asociado a vertebrados mamíferos (Martínez-Hernández *et al.*, 2022).

La transmisión del vector triatomo al hospedero vertebrado se lleva a cabo cuando las heces del vector infectado con *T. cruzi* entran en contacto con el sitio de la incisión provocada por el vector o en su caso con una mucosa (Bern, 2015).

Algunas vías de transmisión independientes del vector incluyen: el trasplante de órganos, transmisión congénita y transfusiones de sangre (Guhl, 2013). Con respecto a los casos de transmisión por vector, este se distribuye de forma endémica a lo largo de México, Centroamérica y Sudamérica, incluyendo regiones sureñas de Estados Unidos (Coura & Dias, 2009; Roellig *et al.*, 2015). En Latinoamérica la enfermedad de Chagas está asociada principalmente a viviendas rurales construidas con materiales que favorecen la colonización de los triatominos en altitudes menores de los 1800 m sobre el nivel del mar (m s. n. m.) a pesar de haberse encontrado una chinche infectada a 2400 m s. n. m. (Borja & Espinosa, 2004). La patología ocasionada por la enfermedad causa principalmente daños al corazón, los cuales pueden categorizarse en dos fases: aguda y crónica (Sánchez-Guillén *et al.*, 2006).

A la fecha, no se cuenta con una vacuna para la prevención de una infección por *T. cruzi*, mientras que los medicamentos que usualmente se usan para controlar la infección (nifurtimox y benznidazol) son de limitada eficacia (Muñoz *et al.*, 2012). Además, dichos medicamentos suelen ser efectivos solamente en la fase aguda de la infección. Durante la fase crónica únicamente alcanzan a aletargar los padecimientos asociados con la infección crónica (Mills, 2020). Cabe mencionar que esta última fase es la más común en pacientes, dado que la misma engloba aproximadamente desde la cuarta a octava semana de infección hasta un periodo de 10 a 30 años después de la infección original (Mills, 2020). Es por esto que los métodos más eficaces para controlar la dispersión de la infección consisten principalmente en el control de las poblaciones de triatominos (Lee *et al.*, 2010).

En México se han descrito 31 especies de triatominos (Ramsey *et al.*, 2015), y a 19 se le han reportado la presencia del parásito *T. cruzi* (Ramsey *et al.*, 2015). A partir del estudio realizado por la Organización Mundial de la Salud y Organización Panamericana de la Salud (OPS & OMS) en el año 2006, se logró estimar la prevalencia para diversos países, uno de ellos México. Dicho estudio estimó el número de posibles mexicanos infectados a partir de la identificación de las regiones, provincias, estados o zonas endémicas con el parásito *T. cruzi*, calculando la población rural y la urbana y contemplando caracteres de migración a ciudades cercanas (OMS & OPS, 2006). Contando con una prevalencia de 1.1 millones de mexicanos infectados con *T. cruzi* y alrededor de 29.5 millones habitando en condiciones y zonas de riesgo de infección (OMS & OPS, 2006). A pesar de haberse reportado la presencia de cinco especies de triatominos en la península de Baja California, solo se ha reportado la presencia de *T. cruzi* para un Triatominae, *i.e.*, *Dipetalogaster maxima* (Uhler, 1894) (Jiménez, Llinas & Palacios., 2003).

Una de las metodologías para confirmar la presencia del parásito dentro de las chinches es la secuenciación de amplicones de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) a partir de muestras de ADN del tracto digestivo de las chinches (Ramsey *et al.*, 2012; Flores-López *et al.*, 2022). Sin embargo, la mayoría de los estudios se limitan a la amplificación por PCR de una secuencia de 188 pb que aumenta el número de copias de una secuencia de ácidos nucleicos que es única en la especie *T. cruzi* (Moser, Kirchhoff, & Donelson, 1989). Aunque la amplificación de esta región genómica tiene ciertas ventajas que facilitan en gran medida al diagnóstico del parásito debido a las numerosas

copias dentro del genoma del parásito unicelular, está también posee desventajas, una de ellas siendo la imposibilidad de determinar el linaje genético del parásito a partir de esta metodología. Hecho que ha promovido el desarrollo de marcadores moleculares alternativos (*e.g.* COII-ND1, TRY2, DHFR-TS, RB19, etc) al mencionado, con el fin de permitir el diagnóstico de los linajes genéticos presentes en los hospederos vertebrados y en sus respectivos vectores (Izeta-Alberdi et al., 2016; Flores-López *et al.*, 2022).

ANTECEDENTES

Trypanosoma cruzi es un parásito eucariota, unicelular y diploide, el cual tiene una reproducción clonal (Gaunt *et al.*, 2003). Sin embargo, se ha descrito que en ocasiones el parásito tiene la capacidad de recombinar (por mecanismos desconocidos) su material genético con otros linajes de la misma especie dentro del hospedero mamífero (Gaunt *et al.*, 2003). De esta manera, se forman linajes híbridos entre linajes que predominantemente se consideran asexuales (Machado & Ayala, 2001), lo que ha ocasionado que la clasificación de *T. cruzi* sea debatible. En la actualidad el parásito se clasifica con una nomenclatura que utiliza el término de unidades discretas de tipificación (DTU's) (Tibayrenc, 1998). Los DTU's se definen como un conjunto de organismos que pertenecen a la misma especie y cuentan con una similitud genético-molecular y algunas características biológicas entre ellos (Guhl, 2013). En 2009 se llevó a cabo una reunión satélite en Brasil en donde un comité de investigadores expertos en estudios con *Trypanosoma cruzi* determinó la nueva clasificación de la diversidad genética del parásito en seis DTU's (TcI-TcVI) incluyendo una séptima categoría TcBat para comunidades de murciélagos de Brasil, Colombia y Panamá (Zingales *et al.*, 2009; Pinto *et al.*, 2012).

La evaluación de los DTU's en *T. cruzi* solamente se puede visualizar a partir del estudio de las relaciones evolutivas del parásito, los cuales se realizan a partir del análisis filogenéticos de distintos marcadores moleculares. Dicha clasificación es relevante debido a la aparente correlación con la patología a desarrollarse en pacientes infectados y el linaje asociado. Zingales (2018) recopiló artículos que demostraron la prevalencia de la enfermedad de Chagas y la patología asociada a cada DTU, en donde el TcI (Sur de

Estados Unidos, México y Centroamérica) ocasiona problemas mayormente asociados a miocardiopatías, así mismo, las infecciones de TcII-TcVI (Sudamérica) parecen estar asociadas principalmente a patologías digestivas y miocardiopatías. Por otro lado, Monje-Rumi *et al.*, 2020, describen una correlación positiva entre la clasificación por medio de los DTU's y la patología de los pacientes, reportando una asociación entre los linajes TcV y TcVI y los problemas digestivos asociados, demostrando una mayor probabilidad y riesgo de que se desarrollen problemas digestivos con estos linajes.

Anterior a la clasificación actual, la diversidad genética de *T. cruzi* se clasificaba en dos grupos: TcI y TcII (Zingales *et al.*, 2009). Actualmente, basado en análisis filogenéticos a partir de secuencias de diversos loci de ADN, la clasificación de *T. cruzi* se categoriza en siete distintos linajes (Cosentino & Agüero, 2012). Cabe señalar que recientemente se reportó un posible nuevo DTU en el suroeste de Estados Unidos a partir del análisis filogenético de las secuencias parciales de cinco genes distintos: 1) el citocromo oxidasa subunidad II y NADH deshidrogenasa subunidad 1 (COII-ND1) (marcadores mitocondriales); 2) el gen nuclear TcCLB.508213.20 ; 3) gen de tripanotión reductasa (TRY2); 4) el dihidrofolato reductasa-timidilato sintasa (DHFR-TS) y 5) la proteína de unión al ARN 19 (RB19) (Machado y Ayala, 2001; Yeo *et al.*, 2011; Flores-López *et al.*, 2022). Adicionalmente a este estudio, la reciente descripción de *T. cruzi* en un ave (*Tyto frugata*) (Martínez-Hernández *et al.*, 2022) apoya el hecho de que no se ha terminado de describir la totalidad de la diversidad genética de *T. cruzi*. Esto debido a diversos factores como la falta de estudios enfocados en las diversas especies de vectores y hospederos estudiados, así como la heterogeneidad en las zonas geográficas estudiadas.

A la fecha no hay un solo estudio que haya descrito los DTU's de *T. cruzi* en el noroeste de México. Por lo que se tiene un desconocimiento sobre los linajes presentes en la zona. Específicamente en la península de Baja California se han registrado un total de cinco especies de triatominos: *Paratriatoma hirsuta*, *Triatoma rubida*, *Triatoma protracta*, *Triatoma peninsularis*, y *Dipetalogaster maxima* (Waleckx *et al.*, 2022). De estos, *D. maxima* es una especie de interés zoonótico (enfermedad que puede ser transmitida de un animal al hombre o viceversa), dado su confirmación en ser portador de *T. cruzi* (Jiménez, Llinas & Palacios, 2003), con una presencia alrededor de las mayores zonas urbanas en Baja California Sur y comportamiento agresivo durante sus búsquedas de alimentación (Martínez-Ibarra *et al.*, 2018). La agresividad se observa en la alimentación diversa de especies de vertebrados que se ha reportado como fuentes de alimento de la especie, incluyendo humanos (Ryckman & Ryckman, 1967). Aunado a esto, *D. maxima* es un triatomino endémico a la zona más sureña de la península de Baja California. Endemismo, que probablemente hace de *D. maxima* el vector de *T. cruzi* con la distribución geográfica más restringida de todas las especies de triatominos.

HIPÓTESIS

En el vector *Dipetalogaster maxima* circula una baja diversidad de linajes genéticos de *Trypanosoma cruzi*, debido a la restringida distribución geográfica que tiene la especie.

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar filogenéticamente las unidades discretas de tipificación (DTU's) de *Trypanosoma cruzi* presentes en el vector endémico *Dipetalogaster maxima*.

Objetivos específicos

- Obtener muestras de ADN a partir de los tractos digestivos de *Dipetalogaster maxima* de especímenes capturados
- Diagnosticar la presencia de *T. cruzi* a través de técnicas de PCR.
- Realizar un análisis filogenético para determinar los DTU's presentes en *D. maxima*.

METODOLOGÍA

Colecta de individuos

La colecta de triatominos se realizó en la región sureña de la Península de Baja California (estado de Baja California Sur) dentro de la región de Cabo en el hábitat rocoso de *D. maxima* (ver Figura 1). El muestreo de triatominos se realizó durante los meses de junio y julio de 2020 y 2021, respectivamente, por parte del técnico del CIBNOR Avelino Cota Castro. Los especímenes fueron colectados durante el día a partir de la técnica de utilizar al colector como carnada, en donde el colector se posiciona arriba de rocas de granito (hábitat natural de *D. maxima*) y espera un máximo de cinco minutos para ver si comienzan a salir especímenes. En aquellos sitios donde los triatominos salían de sus escondites dentro de las rocas y se aproximaban al colector, estos eran tomados con el apoyo de pinzas y colocados en frascos de etanol al 95%. Los frascos fueron rotulados con las coordenadas geográficas del sitio de colecta, así como con la fecha y los colectores. Un total de 14 sitios fueron muestreados durante los dos años de colecta (ver Tabla I).

Tabla I. Información de los sitios en donde se muestreo para los ciclos 2016, 2017, 2018, 2020 y 2021 en la región del Cabo.

Sitio	Coordenadas		Año de colecta
	N	W	
Sitio 1	23° 31.650'	109° 46.933'	2017-2018-2020-2021
Sitio 2	23° 32.100'	109° 46.900'	2017-2018-2020-2021
Sitio 3	23° 32.933'	109° 48.650'	2017-2018-2020-2021
Sitio 4	23° 37.067'	109° 37.983'	2020-2021
Sitio 5	23° 51.633'	110° 10.333'	2017-2018-2020-2021
Sitio 6	24° 1.533'	110° 7.300'	2020-2021
Sitio 7	24° 1.183'	110° 7.833'	2020-2021
Sitio 8	24° 0.850'	110° 8.800'	2020-2021
Sitio 9	23° 59.717'	110° 9.083'	2020-2021
Sitio 10	23° 23.733'	110° 12.267'	2020-2021
Sitio 11	23° 29.967'	110° 10.517'	2020-2021
Sitio 12	23° 31.733'	110° 10.550'	2020-2021
Sitio 13	23° 30.240'	109° 44.940'	2020-2021
Sitio 14	23° 32.933'	109° 31.850'	2020-2021
Sitio 15	23° 24.066'	110° 3.088'	2016
Sitio 16	23° 23.238'	110° 2.765'	2016
Sitio 17	23° 20.478'	110° 1.479'	2016
Sitio 18	23° 26.146'	110° 3.261'	2016
Sitio 19	23° 13.054'	109° 49.541'	2016
Sitio 20	23° 14.279'	109° 57.607'	2016

Sitio	Coordenadas		Año de colecta
	N	W	
Sitio 21	23° 24.175'	110° 12.307'	2016
Sitio 22	23° 30.492'	110° 9.257'	2016
Sitio 23	24° 3.055'	110° 8.817'	2017
Sitio 24	23° 59.590'	110° 9.096'	2017-2018
Sitio 25	23° 24.459'	110° 5.800'	2017-2018
Sitio 26	23° 54.031'	110° 9.191'	2018

Aunado a los especímenes capturados en el 2020 y 2021, y para atender el objetivo general de este estudio, se incluyeron secuencias (no publicadas) de *T. cruzi* obtenidas a partir de especímenes de *D. maxima* los cuales fueron colectados en los años de 2016 a 2018.

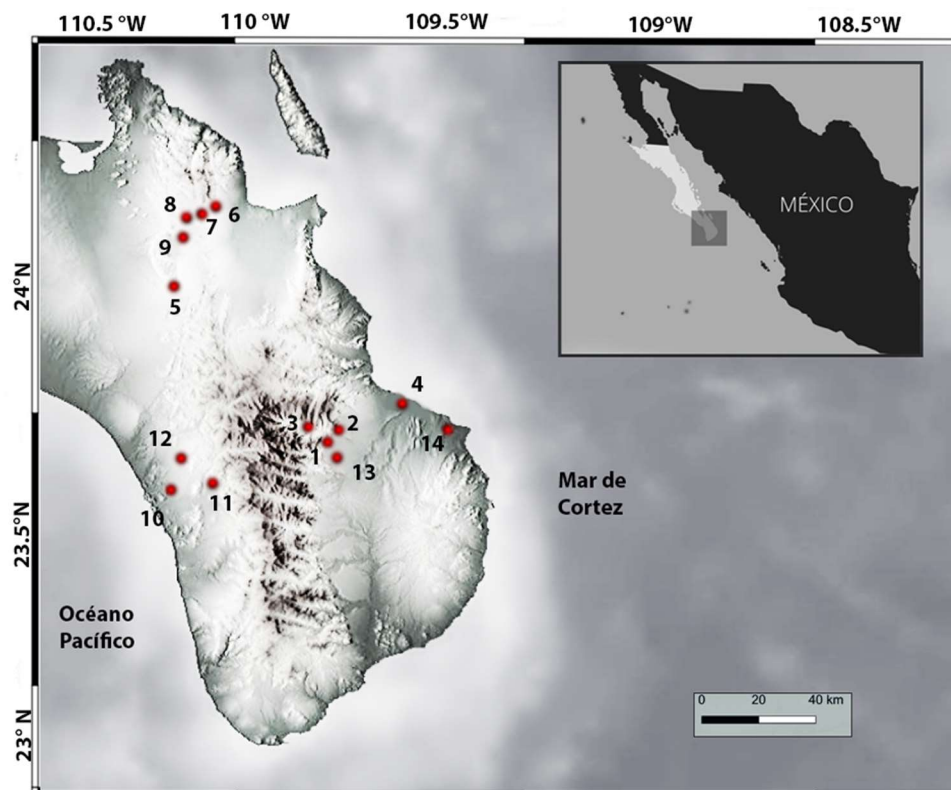


Figura 1. Sitios de colecta de *D. maxima* en los años 2020-2021 en la región de Cabo en Baja California Sur.

Del total de chinches colectadas en los distintos sitios, se optó por escoger las chinches con el diagnóstico de ADN a partir de la calidad y pureza del mismo (ver sección “Extracción de ADN”) y a las de mayor tamaño. Dado que estos serían individuos desarrollados entre los estadios de adultez y los últimos estadios juveniles pre reproductivos. Otorgando así una mayor posibilidad de detección de *T. cruzi* en el tracto digestivo (Ramsey *et al.*, 2012). Esto es debido a que la infección de *T. cruzi* en triatominos no es por vía vertical dado a que no nacen con la infección (Garrido *et al.*, 2021), y requieren diversos números de presas para alcanzar el estadio de la adultez, aumentando la probabilidad de infectarse por medio de la diversidad de presas (Kollien

& Schaub, 2000). Para el caso de *D. maxima*, se publicó recientemente que la capacidad de alimentación previo al estadio de adultez fue de un total de 11 presas en condiciones de laboratorio (Meraz-Medina, Martínez-Ibarra & Noguera-Torres, 2022).

En la Figura 2, se observan los sitios de colecta para el 2020-2021 y por su parte, los sitios distintos que se utilizaron en los muestreos del 2016-2018 los cuales toman un total de 26 puntos de muestreos establecidos para el análisis de infección y filogenia. Los puntos fueron seleccionados basados en el hábitat preferido de las chinches de los afloramientos de granito, y el conocimiento de muestreos pasados (2016-2018) así como también con base en y los análisis de diagnósticos positivos de *T. cruzi*.

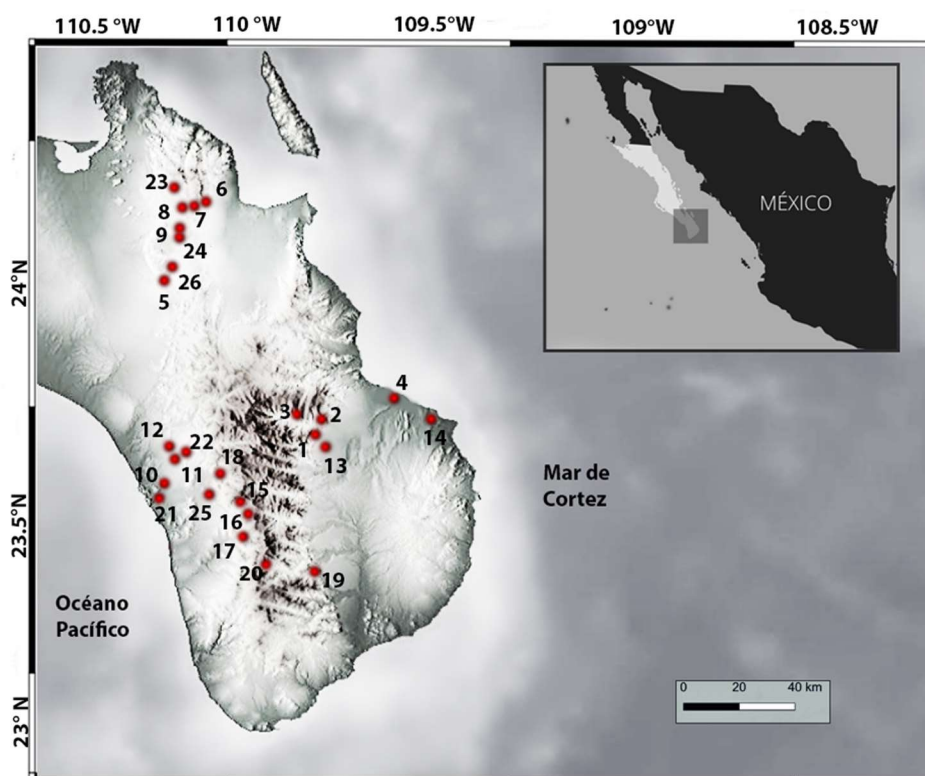


Figura 2. Sitios de colecta desde el 2016, 2017, 2018, 2020 y 2021 en la región del Cabo en Baja California.

Identificación de chinches

A partir de las claves taxonómicas para identificar a las especies de Triatominae, (Lent & Wygodzinsky de 1979) se identificó las diferencias morfológicas de las ninfas, huevos y adultos para reconocer a detalle las especies en América o por lo menos, las más comunes y frecuentes. Para el caso de *D. maxima* se enfocaron los colectores en la coloración café oscuro con tonos negros en su cuerpo y una banda roja a lo largo del borde exterior del conexivo en el margen abdominal. En la zona de la cabeza, cuentan con un tono negro pulido y posee el doble de largo que ancho y un poco más corta que el pronoto. No solo la morfología es lo importante para esta especie ya que según los reportes y características listadas en esta revisión de triatominos, toman a *D. maxima* como una especie agresiva que suele acercarse a sus presas ("reptiles" y algunos mamíferos) (Marsden *et al.*, 1979) en días de alta temperatura y a partir de sus termorreceptores logran ubicar el calor corporal de sus presas. Una vez colectadas, las chinches (ninfas y adultas) se sometieron a una identificación final a partir del uso de estereoscopio para comprobar con diferentes estructuras la taxonomía.

Extracción de ADN

La extracción de ADN se hizo a partir de los tractos digestivos de los especímenes, ya que es en este tejido donde *T. cruzi* se replica dentro del insecto. El procedimiento con respecto a la disección de los tractos digestivos consiste en la selección de cada individuo, manipulando al espécimen con pinzas de disección en una caja de Petri (previamente

esterilizados). Posteriormente se procede a realizar una incisión con una navaja de disección esterilizada por medio de la zona abdominal cercana a la cloaca, cortando aproximadamente desde la mitad del conxivo de la zona lateral derecha hasta la mitad del conxivo de la zona lateral izquierda, siendo el margen lateral abdominal. Una vez que la incisión se realizó, con el apoyo de pinzas de disección se realiza la extracción del tracto digestivo. Para este proceso fue necesario utilizar un estereoscopio, así como observar y distinguir el tracto digestivo del tejido interior o cutícula. Una vez localizado el tracto digestivo este fue colocado en un tubo de 1.5 mL previamente esterilizado y almacenado a -20 grados Celsius (°C) hasta su respectiva extracción de ADN. Cabe señalar que entre cada disección, todo el equipo de disección (*i.e.*, pinzas, bisturí y caja de Petri) se esterilizó con alcohol al 70% y un mechero bunsen. Esto con el fin de evitar la posible contaminación de *T. cruzi* con otros especímenes de *D. maxima*.

A partir de cada tracto digestivo, se realizó la extracción de ADN con el kit de columnas de sílica de Invitrogen™ (PureLink Genomic DNA kit) en el Laboratorio Multidisciplinario de la Facultad de Ciencias (LMFC) de la UABC. El protocolo consiste en la colocación de 180 µL de buffer de digestión a cada tracto digestivo. Posteriormente se procedió a romper el tejido con la ayuda de un pistilo estéril. Inmediatamente después se agregó 20 µL de proteinasa K la cual tiene como función desnaturalizar todo el tejido proteico de la muestra. La digestión se llevó a cabo a 55°C. La incubación se realizó en una incubadora, en agitación constante durante el periodo de incubación. El tiempo de incubación depende de la facilidad de digestión de cada tejido, en donde el tejido se incubó en promedio 3 horas, sin embargo, con ciertos tejidos se incubaron hasta 24 horas para

garantizar la digestión total del tracto. Una vez concluida la incubación se procedió a separar el tejido no digerido de la muestra. Separación que se logra a partir de una centrifugación a 14,000 revoluciones por minuto (rpm) en una microcentrífuga marca eppendorf por un total de tres minutos. Después de la centrifugación se procedió a remover el material sobrenadante de la muestra con mucho cuidado de no llevarse ninguna partícula del material no digerido. Este sobrenadante es colocado en un nuevo tubo estéril de 1.5 mL con tapa, al cual se le añade 20 μ L de ARNasa y se procede a mezclar la solución con vortex. Una vez mezclada, se añadió 200 μ L del buffer de ligamiento y mezclando la solución en un vortex por un par de segundos. Posteriormente se añaden 200 μ L de etanol al 100% y se mezcla inmediatamente cinco segundos en el vortex. Inmediatamente después se traslada toda la solución (~640 μ L) a una columna de sílica puesta en un tubo de colecta estéril y se procede a ligar el ADN a la columna. Este ligamiento se obtiene a partir de centrifugar la muestra a 9,700 rpm por un minuto. Una vez terminada la centrifugación, se descartó el tubo de colecta con desechos y se añade un nuevo tubo de colecta estéril. Siguiendo con el lavado de ADN, se añadieron 500 μ L del buffer de lavado 1, para posteriormente proceder a centrifugar la muestra a 9,700 rpm durante un minuto. Tras la finalización de la separación, el fluido del tubo de colecta se desechó. Se procedió a obtener otro tubo de colecta estéril para la columna y se añadieron 500 μ L del buffer de lavado 2. Mismo que se centrifugó a 14,000 rpm durante tres minutos. Una vez que se descarte el tubo de colecta, se utilizó un microtubo de centrífuga de 1.5 mililitros y se añadieron 25 μ L del buffer de elución y se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto para garantizar que la columna de sílica se humedezca

completamente. Una vez transcurrido el minuto se procede a eluir el ADN de la columna a partir de una centrifugación a 14,000 rpm por 1 minuto y medio.

Una vez obtenido el ADN se procedió a medir la pureza y concentración de los ácidos nucleicos en un espectrofotómetro Nanodrop Thermo Scientific™. Para esto se utilizó un microlitro de la muestra de ADN genómico purificado y se colocó en el espectrofotómetro previamente calibrado (*i.e.*, con un microlitro de agua libre de nucleasas y posteriormente con un microlitro del mismo buffer de elución que se utilizó para eluir los ácidos nucleicos de la columna de sílica) y se procedió a medir la absorbancia del ADN. Las mediciones de absorbancia de cada muestra fueron registradas en la bitácora de laboratorio en donde la determinación de las muestras con una calidad adecuada como para determinar la presencia de *T. cruzi* fueron las siguientes: 1) concentraciones de ADN mayores a 10 ng/μL; 2) absorbancias de 1.7-2.0 (indicativo de ADN de alta pureza) en la tasa de 260/280 nm de longitud de onda, y 3) una absorbancia de 260/230 de entre 2.0-2.2, indicativos de ADN con pocas impurezas.

Una vez que las muestras se hayan medido en el espectrofotómetro, se observaron y registraron los parámetros de absorbancia a 260/230 nm en ng/μL y 260/280 nm de cada muestra para su selección. Una vez seleccionadas las muestras a utilizarse se almacenaron las mismas en un congelador a -80 °C dentro del LMFC con su rótulo específico.

Diagnóstico de *T. cruzi*

El diagnóstico de *T. cruzi* en muestras con buena calidad de ADN se realizó a partir de una PCR (reacción en cadena de polimerasa) con los cebadores TcZ1 y TcZ2

(Moser, Kirchhoff, & Donelson, 1989). Cebadores que normalmente son utilizados por la comunidad científica para el diagnóstico por PCR de *T. cruzi* debido a que: 1) amplifican una región genómica que solamente está presente en el genoma de *T. cruzi* y 2) tienen como blanco un locus que se encuentra en muchas copias en cada célula de *T. cruzi* (rasgo importante, debido a la unicelularidad del parásito en cuestión). La región amplificada por PCR es de 188 pares de bases. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: la solución mastermix se conformó por 2.5 µL del buffer para Invitrogen™ PCR 10X, 0.5 µL de New England Biolabs and Fluorogenics™ dNTPs a 10 mM, 0.75 µL de Invitrogen™ MgCl₂ a una concentración de 50 mM, los primers (TcZ1-TcZ2) con 1.25 µL para c/u, Invitrogen™ Taq polimerasa de aproximadamente 0.05 µL a 5 U/µl, 5.7 µL de H₂O, multiplicándose por el número de muestras que se realizarán + 2 (para evitar la falta de mastermix) y nuestra muestra de ADN purificado de tres µL a 20 ng/µL. Creando un volumen total de 15 µL de PCR por reacción. Con respecto a las temperaturas utilizadas en la PCR para la amplificación del marcador estas fueron las siguientes: una desnaturalización inicial de 94°C por cuatro minutos, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C de anillamiento por 30 segundos y 72°C de extensión por 30 segundos. Al finalizar los 35 ciclos se incluyó un tiempo de extensión adicional de 4 min a 72°C.

Las PCR's se hacían con un total de no más de 12 muestras de *D. maxima* por corrida, asegurándose siempre de incluir un control negativo y un control positivo. Para los controles positivos se utilizaron 2 µL de cepas de *T. cruzi*, dado que cuentan con una calidad de ADN excelente, ya que al momento de realizar las extracciones de ADN a partir del tracto digestivo (TD) de la chinche, es posible tener inconvenientes debido a

que la mayor cantidad de ADN existente es de la chinche y no del parásito, existiendo diversas reglas específicas al momento de obtener la lectura de la calidad de ADN por medio del espectrofotómetro. Para el control positivo se utilizaron 20 ng de ADN genómico de *T. cruzi*.

La corroboración del diagnóstico por PCR se realizó a partir de una electroforesis en un gel de agarosa de 50 mL al 1.5% con buffer TAE al 1X. El ADN se visualizó en un fotodocumentador con luz ultravioleta en la longitud de onda de 310 nm, dado que el gel de agarosa contuvo cuatro μ L de SYBR SAFE (Invitrogen™). Los geles se corrieron a un voltaje de 50 mV durante 60-80 minutos hasta que la marca del buffer de carga lograra desplazarse hasta el punto medio del gel y se utilizó una escalera de 100 pb - 1517 pb a 50 μ g/ml de New England Biolabs and Fluorogenics™. Una vez terminado el gel, se procedió a utilizar el fotodocumentador para observar los resultados de la electroforesis. Tomando una foto de cada gel (ver Figura 4) para su diagnóstico visual y tener el listado de electroforesis realizadas, junto con su resultado en la bitácora del laboratorio. En la Tabla II se muestran los organismos positivos con su respectivo sitio de colecta, sus coordenadas, el estadio ninfal y el año de colecta. Estas muestras con excepción de 21-01-03 fueron utilizadas para realizar los distintos árboles filogenéticos y establecer los DTU's que existen en Baja California para la región del Cabo.

Tabla II. Información principal de las chinches con diagnóstico positivo en los distintos años de estudio.

Muestra	Sitio	N	W	Estadio	Año de colecta
16-7-N2-07	21	23°24.175'	110°12.307'	N2	2016
16-7-N3-03	21	23°24.175'	110°12.307'	N3	2016
16-7-N3-05	21	23°24.175'	110°12.307'	N3	2016
16-7-♂-01	21	23°24.175'	110°12.307'	MA	2016
16-7-♀-01	21	23°24.175'	110°12.307'	HA	2016
17-11-N3-03	5	23° 51.633'	110°09.971'	N3	2017
Muestra	Sitio	N	W	Estadio	Año de colecta
17-13-N3-13	1	23°32.1'	109°46.862'	N3	2017
17-13-N3-12	1	23°32.1'	109°46.862'	N3	2017
17-11-N3-01	3	23° 32.933'	109° 48.650'	N3	2017
17-15-♀-02	2	23°31.65'	109°46.876'	HA	2017
18-10-N3-03	24	23°59.501'	110°09.096'	N3	2018
18-10-N3-05	24	23°59.501'	110°09.096'	N3	2018
18-10-N3-07	24	23°59.501'	110°09.096'	N3	2018
18-10-♀-01	24	23°59.501'	110°09.096'	HA	2018
18-10-♂-01	24	23°59.501'	110°09.096'	MA	2018
18-15-N1-02	2	23°31.65'	109°46.876'	N1	2018
18-15-N3-05	2	23°31.65'	109°46.876'	N3	2018
20-02-01	2	23°31.65'	109°46.93'	*	2020
21-01-03	1	23°32.1'	109°46.9'	*	2021

Nota. HA = Hembra Adulta. MA = Macho Adulto. Nx = Estadio ninfal. * = Estadio ninfal no identificado.

Amplificación de marcadores para análisis filogenéticos

Se puso a prueba amplificar un total de cinco marcadores adicionales en todas las muestras que resultaron positivas a *T. cruzi* a partir de reacciones de PCR. Los marcadores

seleccionados son secciones de loci polimórficos que previamente han sido utilizadas para análisis filogenéticos de *T. cruzi* (Flores-López *et al.*, 2022). Estos marcadores consistieron desde marcadores mitocondriales (*i.e.*, el citocromo oxidasa subunidad II y NADH deshidrogenasa subunidad 1 (COII-ND1)) (Machado & Ayala, 2001); y cuatro marcadores nucleares, el gen nuclear TcCLB.506529.310 (Flores-López & Machado, 2011), el gen de tripanotión reductasa (TRY2), el dihidrofolato reductasa-timidilato sintasa (DHFR-TS) y la proteína de unión al ARN 19 (RB19) (Machado & Ayala, 2002; Yeo *et al.*, 2011).

Para las PCRs de amplificación se usaron las siguientes condiciones: 94°C por cinco minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 49-55°C de anillamiento por 30 segundos y 72°C de extensión por un minuto 30 segundos. La variación de la temperatura de alineamiento varió de acuerdo al marcador utilizado (en el caso de COII-ND1 se utilizó una temperatura de 49°C, para los otros marcadores se mantuvo la temperatura de 55°C). Los primers de cada marcador molecular utilizados en la PCR fueron los siguientes: COII-ND1 (F-5'-GCTACTARTTCACTTTCACATTC-3') (R-5'-GCATAAATCCATGTAAGACMCCACA-3'); TcCLB.508213.20 (F-5'-TTCTTTCAGGCTGCGATTTT-3'), (R-5'-CGCTGTTTGGCTCATTTCTT-3'); TRY2 (F-5'-A-CTGGAGGCTGCTTGGAACGC-3'), (R-5'-GGATGCACACCRATRGTGTTGT-3') RB19 (F-5'-TNACNGGNCCNAAYATG-3'), (R-5'-TYTCNRCCATRAANGT-3'); DHFR-TS (F-5'-CGCTGTTTAAGATCCGNATGCC-3'), (R-5'-CGCATAGTCAATGACCTCCATGTC-3').

Secuenciación de amplicones y análisis filogenéticos

Todos aquellos amplicones que se amplificaron fueron secuenciados bidireccionalmente en un secuenciador 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) en la compañía Macrogen (Corea del Sur - <https://dna.macrogen.com/>). Los cromatogramas derivados de la secuenciación se analizaron y editaron manualmente en Geneious 2022.1 (<https://www.geneious.com>, Kearse *et al.*, 2012). La veracidad y posibles errores de inserciones/deleciones creadas durante la PCR se evaluó a partir de la comparación de los cromatogramas generados durante la secuenciación bidireccional.

Todas las secuencias que pasaron la evaluación de calidad (ver sección de la Extracción de ADN) fueron utilizadas para los análisis filogenéticos señaladas en la Tabla II y Tabla V. Las secuencias obtenidas se alinearon con secuencias homólogas extraídas de GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> Benson *et al.*, 2013) con el fin de tener una representación de cada uno de los DTU's de *T. cruzi* para cada marcador molecular (ver Tabla III). Los alineamientos se realizaron en el programa Seaview 5.0.5 (Gouy *et al.*, 2010) y se alinearon en la modalidad de aminoácidos con el algoritmo de MUSCLE (dentro de Seaview) utilizando como grupo externo a *T. cruzi marinkellei* (Robert, 2004). Los alineamientos resultantes de ácidos nucleicos se utilizaron para la estimación de árboles filogenéticos, mismos que se realizaron con la estadística bayesiana en MrBayes 3.2 (Tamura *et al.*, 2007; Ronquist & Huelsenbeck, 2003). En donde los modelos de sustitución de ADN se estimaron en jModeltest (Posada, 2008) para cada marcador de forma independiente. Para los análisis bayesianos, las cadenas de Markov Chain Monte Carlo se corrieron hasta que la desviación estándar fuera menor a 0.1.

Un árbol consenso derivado de los análisis bayesianos se generó y editó visualmente en FigTree 1.4.4 (Rambaut, 2016).

Tabla III. Información sobre muestras y cepas recuperadas de GenBank mostrando el DTU correspondiente, organismo y código depositado en GenBank.

Muestra	GenBank	DHFR-TS	Organismo
Y_Strain_TcII	JN942599	TcII	<i>Homo sapiens</i>
CL_Brener	XM810234	TcVI	<i>Triatoma infestans</i>
Sc43_cl1	AY785646	TcV	<i>Triatoma infestans</i>
Esm_cl3	AY785639	TcII	<i>Homo sapiens</i>
GA_Rac45	GU212916	TcIV-USA	<i>Procyon sp.</i>
Caesar_Dog_Ila	GU212932	TcIV-USA	<i>Canis familiaris</i>
TN_Rac18_Ila	GU212920	TcIV-USA	<i>Procyon sp.</i>
STC_35R	GU212919	TcIV-USA	<i>Procyon sp.</i>
GA_Rac69	GU212917	TcIV-USA	<i>Procyon sp.</i>
CANIII_cl1	AF358941	TcIV	<i>Homo sapiens</i>
4_EP_255	AF358943	TcIV	<i>Rhodnius prolixus</i>
12_TEH	AF358926	TcI	Triatominae
20_CUICA	AF358936	TcI	<i>Philander opossum</i>
SC13	AF358942	TcI	<i>Rhodnius pallescens</i>
CUTIA_cl1	AF358934	TcI	<i>Dasyprocta aguti</i>
Sylvio_X10_cl1	CP015659	TcI	<i>Homo sapiens</i>
M6241_Ilcl_TcIII	AF358944	TcIII	<i>Homo sapiens</i>
36_X110_8_Ilcl	AF358947	TcIII	<i>Canis familiaris</i>
M5631_Ilcl	AF358945	TcIII	<i>Dasyus novemcinctus</i>
M5631_cl5	AF358945	TcIII	<i>Dasyus novemcinctus</i>
CM17	AF358946	TcIII	<i>Dasyus sp.</i>

Muestra	GenBank	COII-ND1	Organismo
CANIII_cl1_Brazil_TcIV	AF359030	TcIV	<i>Homo sapiens</i>
Tulahuen_Chile_TcIV	AF359042	TcVI	<i>Homo sapiens</i>
CL_F11F5	AF359041	TcVI	<i>Triatoma infestans</i>
X1108	AF359034	TcIII	<i>Canis familiaris</i>
EPP	AF359044	TcV	<i>Homo sapiens</i>
BRJ_Guatemala_TcIV	EU302217	TcIV	<i>Homo sapiens</i>
CM_17	AF359033	TcIII	<i>Dasytus sp.</i>
10R26	HQ604907	TcIV	<i>Aotus sp.</i>
Esc19	KR135423	TcIV-USA	<i>Triatoma protracta</i>
92122102R_USA_TcIV	GU212871	TcIV-USA	<i>Procyon lotor</i>
STC_10R_USA_TcIV	GU212900	TcIV-USA	<i>Procyon lotor</i>
Tex15	MF670302	TcIV-USA	<i>Triatoma sanguisuga</i>
Tex16	MF670303	TcIV-USA	<i>Triatoma sanguisuga</i>
92101601P	GU212870	TcIV-USA	<i>Didelphis virginiana</i>
Florida_C16	AF359010	TcIV-USA	<i>Triatoma sanguisuga</i>
Colombia_Tcl	EU302213	Tcl	<i>Homo sapiens</i>
TeH_c12_c192_Mexico_Tcl	AF359009	Tcl	Triatominae
St5_Guatemala_Tcl	EU302209	Tcl	<i>Triatoma dimidiata</i>
USA_Armadillo_Tcl	GU212880	Tcl	Dasypodidae
85_818_Tcl	AF359026	Tcl	<i>Didelphis marsupialis</i>
CUICA_Tcl	AF359024	Tcl	<i>Philander opossum</i>
Silvio_Tcl	EU302222	Tcl	<i>Homo sapiens</i>
Esm_c13	AF359035	TcII	<i>Homo sapiens</i>
CBB_cl3	AF359037	TcII	<i>Homo sapiens</i>

Muestra	GenBank	TcCLB	Organismo
CBB_c13_B	HQ859558	TcII	<i>Homo sapiens</i>
EPP_B	HQ859562	TcV	<i>Homo sapiens</i>
ESMERALDO_c13_A	HQ859555	TcII	<i>Homo sapiens</i>
TU18_cl2_A	HQ859559	TcII	<i>Triatoma infestans</i>
Tex_1	MZ014573	TcIV-USA	<i>Triatoma gerstaeckeri</i>
Tex_15	MZ014575	TcIV-USA	<i>Triatoma sanguisuga</i>
DF81_AT17_Tucs	MZ014617	TcIV-USA	<i>Triatoma recurva</i>
CANIII_cl1	HQ859551	TcIV	<i>Homo sapiens</i>
EP_255	HQ859552	TcIV	<i>Rhodnius prolixus</i>
Tex_2	MZ014574	TcI	<i>Triatoma gerstaeckeri</i>
Tex_34	MZ014578	TcI	<i>Triatoma gerstaeckeri</i>
DF79_AT6_Tucs	MZ014615	TcI	<i>Triatoma recurva</i>
133_79_c17_A	HQ758544	TcI	<i>Homo sapiens</i>
S034_c14_A	HQ859546	TcI	<i>Triatoma infestans</i>
SC13	HQ859550	TcI	<i>Rhodnius pallescens</i>
39_EPP_A	HQ859561	TcV	<i>Homo sapiens</i>
CL_Brener	XM_803199	TcVI	<i>Triatoma infestans</i>
M5631_c15	HQ859554	TcIII	<i>Dasypus novemcinctus</i>
M6241_c16	HQ859553	TcIII	<i>Homo sapiens</i>

Muestra	GenBank	TRY2	Organismo
ESM32_TcII	AF358992	TcII	<i>Homo sapiens</i>
CBBc13_TcII	*	TcII	<i>Homo sapiens</i>
PSC_O_TcV	*	TcV	<i>Homo sapiens</i>
Esm_c13	AF358992	TcII	<i>Homo sapiens</i>
Y_clone_Brazil_TcII	AY785711	TcII	<i>Homo sapiens</i>
SC43_Bolivia	AY785721	TcV	<i>Triatoma infestans</i>

Sc43_c11	AY785721	TcV	<i>Triatoma infestans</i>
CL_Brener	AY785725	TcVI	<i>Triatoma infestans</i>
Tulac2_TcVI	*	TcVI	<i>Homo sapiens</i>
Ca1_05	*	Tcl	<i>Triatoma infestans</i>
85_818_Bolivia_Tcl	AF358982	Tcl	<i>Didelphis marsupialis</i>
EV13c	*	Tcl	<i>Rhodnius prolixus</i>
Vall3	KR108813	Tcl	<i>Triatoma protracta</i>
Va118	KR108815	Tcl	<i>Triatoma protracta</i>
CUICA Brazil	AF358981	Tcl	<i>Philander opossum</i>
SC13_Colombia	AF358987	Tcl	<i>Rhodnius pallescens</i>
CUTIA_Brazil	AF358979	Tcl	<i>Dasyprocta aguti</i>
YuYu_Brazil	AY785713	Tcl	<i>Triatoma infestans</i>
Colombiana	AY785715	Tcl	<i>Homo sapiens</i>
FLORIDA	AF358970	Tcl	<i>Triatoma sanguisuga</i>
Dm28c_Venezuela	AY785717	Tcl	<i>Didelphis marsupialis</i>
CUTIA_c11	AF358979	Tcl	<i>Dasyprocta aguti</i>
A80_Guyana	AF358976	Tcl	<i>Didelphis marsupialis</i>
Sylvio_X10_c11_AF358975	AF358975	Tcl	<i>Homo sapiens</i>
M5631_Brazil_TcIII	AF358989	TcIII	<i>Dasypus novemcinctus</i>
M5631_c15	AF358989	TcIII	<i>Dasypus novemcinctus</i>
CM17_Colombiana_TcIII	AF358990	TcIII	<i>Dasypus sp.</i>
CM_17	AF358990	TcIII	<i>Dasypus sp.</i>
NR_c13_Chile	AY785723	TcV	<i>Homo sapiens</i>
Tulahuen_cl2	AF359002	TcVI	<i>Homo sapiens</i>
NR_c13	AY785724	TcV	<i>Homo sapiens</i>
Ab3_10	EU302259	TcIII	<i>Triatoma infestans</i>
CANIII	AF358986	TcIV	<i>Homo sapiens</i>
CANIII_c11	AF358986	TcIV	<i>Homo sapiens</i>
BRJ_Guatemala_TcIV	EU302257	TcIV	<i>Homo sapiens</i>

Muestra	GenBank	RB19	Organismo
MQ56_Tulac2_TcVI	*	TcVI	<i>Homo sapiens</i>
MQ59_PSC_O_TcV	*	TcV	<i>Homo sapiens</i>
X109_2_TcIII	KF889639	TcIII	<i>Canis familiaris</i>
M6241_TcIII	KF889637	TcIII	<i>Homo sapiens</i>
Tulahuen_c12	KF889646	TcVI	<i>Homo sapiens</i>
Sc43_c11	KF889643	TcV	<i>Triatoma infestans</i>
SO3_c15	KF889642	TcV	<i>Triatoma infestans</i>
CL_Brener	KF889644	TcVI	<i>Triatoma infestans</i>
MQ57_CA1_05_TcI	*	TcI	<i>Triatoma infestans</i>
EV13c	*	TcI	<i>Rhodnius prolixus</i>
Vall3	KR108801	TcI	<i>Triatoma protracta</i>
Vall7	KR108802	TcI	<i>Triatoma protracta</i>
Vall8	KR108803	TcI	<i>Triatoma protracta</i>
Vall3	KR108802	TcI	<i>Triatoma protracta</i>
Vall4	KR108805	TcI	<i>Triatoma protracta</i>
SoCa11	KR108806	TcI	<i>Triatoma protracta</i>
SoCa12	KR108807	TcI	<i>Triatoma protracta</i>
SoCa13	KR108808	TcI	<i>Triatoma protracta</i>
Esc2	KR108809	TcI	<i>Triatoma protracta</i>
Esc46	KR108812	TcI	<i>Triatoma protracta</i>
Cutia_TcI	KF889623	TcI	<i>Dasyprocta aguti</i>
Sp104_TcI	KF889624	TcI	<i>Triatoma spinolai</i>
CUTIA_C11	KF889623	TcI	<i>Dasyprocta aguti</i>
Sylvio_X10_c11	KF889622	TcI	<i>Homo sapiens</i>
Esc19	KR108810	TcIV-USA	<i>Triatoma protracta</i>
Esc26	KR108811	TcIV-USA	<i>Triatoma protracta</i>

Dog_Theis_TcIV	KF889630	TcIV-USA	<i>Canis familiaris</i>
92122102R_TcIV	KF889629	TcIV-USA	<i>Procyon lotor</i>
MQ53_CANIII_TcIV	KF889628	TcIV	<i>Homo sapiens</i>
CANIII_c11	KF889628	TcIV	<i>Homo sapiens</i>
CM17	KF889638	TcIII	<i>Dasypus sp.</i>
M5631_c15	KF889636	TcIII	<i>Dasypus novemcinctus</i>
MQ54_Esm32_TcII	KF889635	TcII	<i>Homo sapiens</i>
Esmc13	KF889635	TcII	<i>Homo sapiens</i>
MQ55_CBBc13_TcII	*	TcII	<i>Homo sapiens</i>

En la Tabla III se observa de forma enlistada a las muestras utilizadas en la creación de filogenias, obtenidas por medio de GenBank, resaltando el DTU al que pertenecen, el código de identificación en GenBank y el organismo del cual se extrajo esta muestra de ADN. Cabe resaltar que las muestras marcadas con un “*”, son cepas que se encuentran en nuestro laboratorio y que al momento no han sido almacenadas en GenBank.

RESULTADOS

Muestras diagnosticadas

La Tabla I muestra los distintos sitios de muestreo junto con sus coordenadas geográficas correspondientes y la cantidad de chinches colectadas por sitio. Con respecto a la extracción de ADN se utilizaron un total de 207 tractos digestivos de especímenes de *D. maxima* señalados en la Tabla IV, los cuales, representan el total de sitios visitados en el ciclo 2020-2021. En total, 76 muestras cumplieron con la pureza, calidad y concentración de ADN requeridos para el diagnóstico de *T. cruzi* (46 muestras del 2020 y 30 del 2021). A las 207 muestras se les realizó el diagnóstico vía PCR, y solamente dos muestras fueron positivas para *T. cruzi*. De los años 2016-2018 se analizaron previamente 717 muestras, abarcando 924 organismos en total.

Tabla IV. Resultados de chinches procesadas para su extracción, PCR y diagnóstico de *T. cruzi*.

Chinches	Año de colecta	
	2020	2021
Extracciones de TD	105	102
TD para PCR	46	30
# de Chinches infectadas	1	1
Total de Chinches	207	

Nota. TD = Tracto Digestivo

Al observar la Figura 3 se indican los sitios en donde los organismos colectados obtuvieron un diagnóstico positivo durante los muestreos realizados en los cinco años mencionados (2016-2018, 2020-2021), teniendo como resultado a seis sitios distintos con la presencia de especímenes positivos para *T. cruzi*.

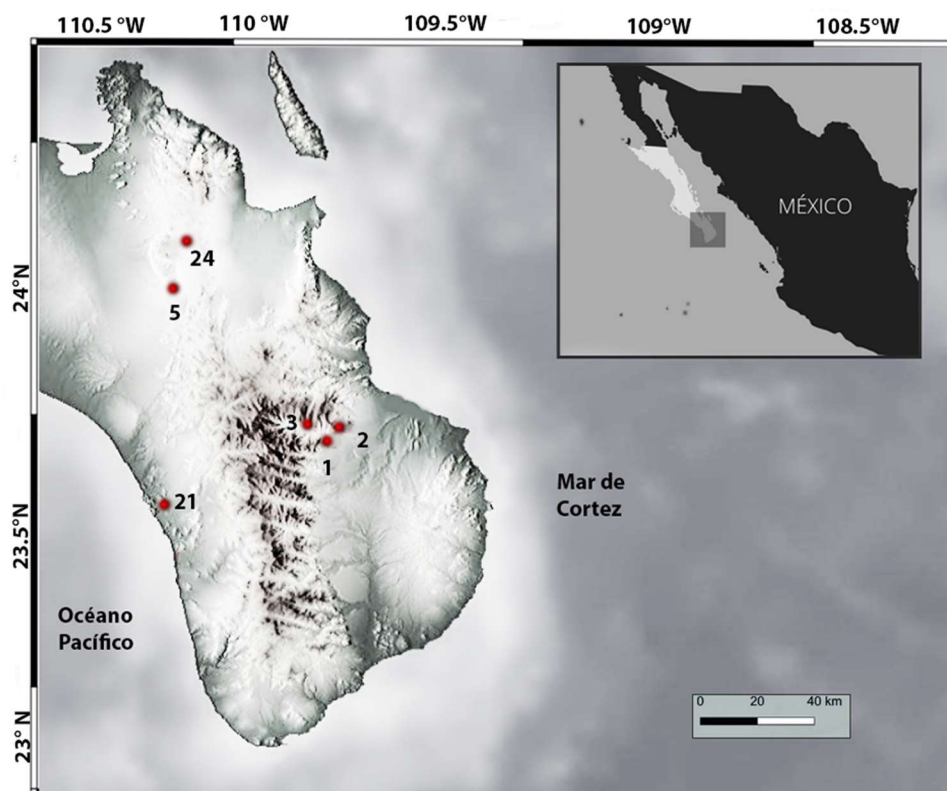


Figura 3. Sitios de colecta donde algunos organismos colectados resultaron positivos al diagnóstico de *T. cruzi* desde el 2016-2018 al 2020-2021.

La tasa de infección estimada a partir de las muestras de ADN con la calidad y pureza necesarias para realizar el diagnóstico fue de 2.17% ($n=1/46$) para el 2020 y 3.33% ($n=1/30$) para el 2021, y un 2.63% ($n=2/76$) por los dos sitios y años.

Al revisar los tamaños del abdomen, cabeza y cuerpo total, se logró inferir que ambas muestras positivas del 2020 y 2021 eran estadios ninfales ya que dichos especímenes no poseían alas (un rasgo que solamente los adultos poseen). Estos datos concuerdan con los resultados de los especímenes colectados entre el 2016-2018 en donde la mayoría de especímenes colectados se encontraron fuera de la fase adulta.

Análisis filogenéticos

Del total de muestras positivas con el marcador TcZ, se probó amplificar el total de los cinco marcadores moleculares vía PCR (ver Tabla V). En la Figura 4 se muestra el ejemplo de la amplificación vía PCR del marcador TcZ indicando la presencia de ADN de *T. cruzi* en la muestra RG06 y en el control positivo. Aunque solo la muestra 20-02-01 logró utilizarse para los análisis filogenéticos, solo en el marcador COII-ND1, ya que la otra muestra del 2021 no produjo un cromatograma limpio al secuenciarse, lo cual imposibilitó su uso para los análisis filogenéticos.

Tabla V. DTU's asociados a las muestras positivas de acuerdo al marcador molecular utilizado.

Muestra	DHFR-TS (1,200 pb)	COII-ND1 (1,272pb)	TcCLB.508213.20 (578 pb)	TRY2 (1,335 pb)	RB19 (408 pb)
16-7-N2-07	Tcl	Tcl	Tcl	Tcl	Tcl
16-7-N3-03	Tcl	Tcl	-	Tcl	Tcl
16-7-N3-05	-	Tcl	-	-	-
16-7-♂-01	-	Tcl	-	Tcl	TclIV-USA
16-7-♀-01	Tcl	Tcl	Tcl	Tcl	Tcl
17-11-N3-03	-	-	TclIV-USA	-	-
17-13-N3-13	Tcl	Tcl	-	Tcl	-
17-13-N3-12	Tcl	Tcl	Tcl	Tcl	-
17-11-N3-01	TclIV-USA	-	TclIV-USA	-	-
17-15-♀-02	Tcl	Tcl	Tcl	Tcl	Tcl
18-10-N3-03	-	-	TclIV-USA	-	TclIV-USA
18-10-N3-05	-	-	Tcl	-	-
18-10-N3-07	-	-	-	<i>T. rangeli</i>	-
18-10-♀-01	Tcl	Tcl	Tcl	Tcl	Tcl
18-10-♂-01	-	TclIV	-	TclIV	-
18-15-N1-02	-	Tcl	Tcl	-	Tcl
18-15-N3-05	-	-	Tcl	-	-
20-02-01	-	Tcl	-	-	-

Se observa en la Tabla V cómo a partir de cada marcador utilizado se encontró el DTU asociado a cada muestra utilizada, estableciendo un análisis filogenético por medio de la estadística bayesiana y abarcando los distintos DTU's (Tcl, TcIV TcIV-USA) y al *T. rangeli* como lo establecido en las Figuras 5-10.

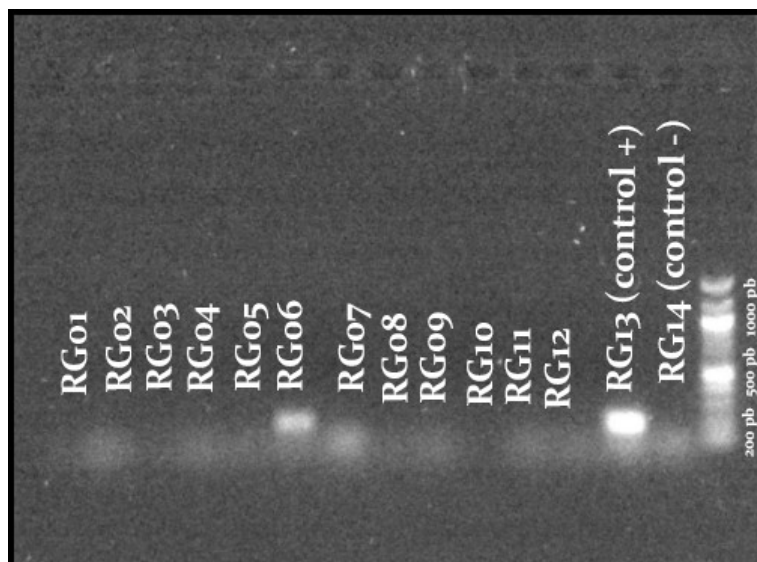


Figura 4. Electroforesis con el marcador TcZ como control positivo y escalera 100-1000pb. En este caso el control positivo y la muestra con clave RG06 amplificaron el marcador.

Una vez que se obtuvo el total de chinches positivas, incluyendo datos previamente publicados de los linajes de *T. cruzi* en 2016-2018 (Flores-López *et al.*, 2022) se logró reconstruir una filogenia para cada marcador amplificado (Figuras 5-10).

Para el marcador mitocondrial COII-ND1, el alineamiento final contaba con la cantidad de 218 SNPs (polimorfismos de nucleótido único) dentro de las 1,103 pares de bases alineadas, representando un 19.76% del marcador. En la Figura 5 se muestra el árbol filogenético de consenso reconstruido a partir de los análisis bayesianos. En dicha reconstrucción se puede observar que la mayoría de las muestras aisladas de *D. maxima* pertenecen al DTU TcI, mientras que una sola muestra queda anidada con una muestra diagnosticada como TcIV.

En el caso del marcador TcCLB.508213.20 se contó con un total de 46 SNPs dentro de las 594 pares de bases utilizadas para los análisis filogenéticos, lo que representa un 7.74% del marcador molecular. En la Figura 6 se muestra la filogenia obtenida a partir

de las muestras utilizadas con este marcador, en donde la mayoría de muestras son del DTU TcI, mientras que tres muestras anidan dentro del DTU recién clasificado como nuevo (TcIV-USA).

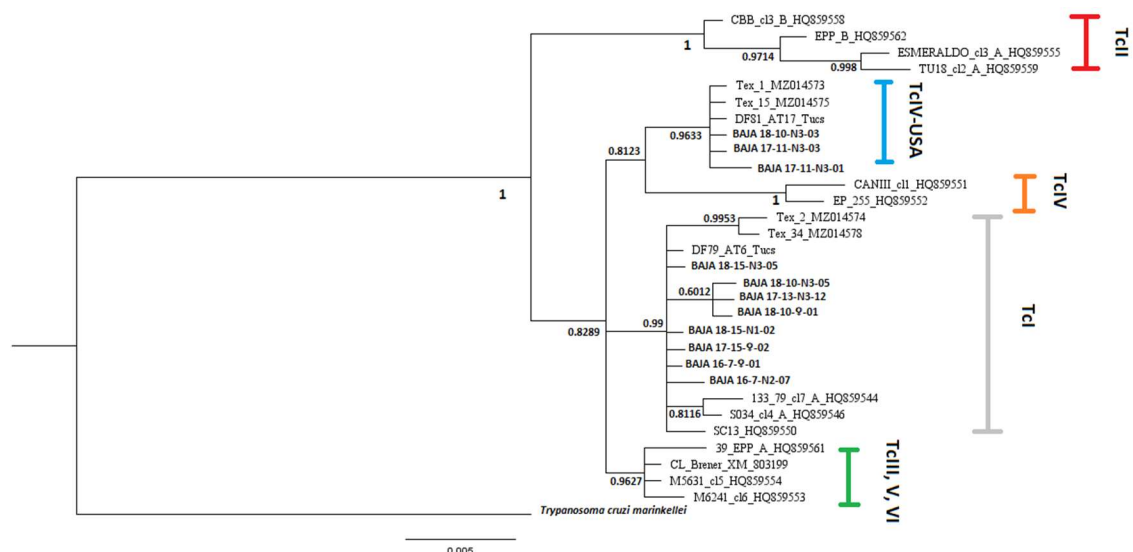


Figura 6. Árbol filogenético de consenso reconstruido a partir de inferencia Bayesiana asociada al marcador TcCLB.508213.20 (578 pb) para las distintas muestras obtenidas en Baja California y los DTU's de referencia. Los valores de los nodos internos representan la probabilidad posterior de ser un grupo monofilético.

Para el marcador TRY2 se contaron un total de 57 SNPs en las 1,185 pares de bases, lo que representa un 4.81% de los datos entre todas las secuencias homólogas utilizadas para este marcador. En la Figura 7 se observa la filogenia obtenida a partir del uso de muestras con un positivo para TcIV-USA y en la Figura 8 la filogenia adecuada para el diagnóstico de *T. rangeli* debido a que en una de las muestras previamente colectadas obtuvo un diagnóstico positivo dentro del área en donde las demás chinches diagnosticaron TcI.

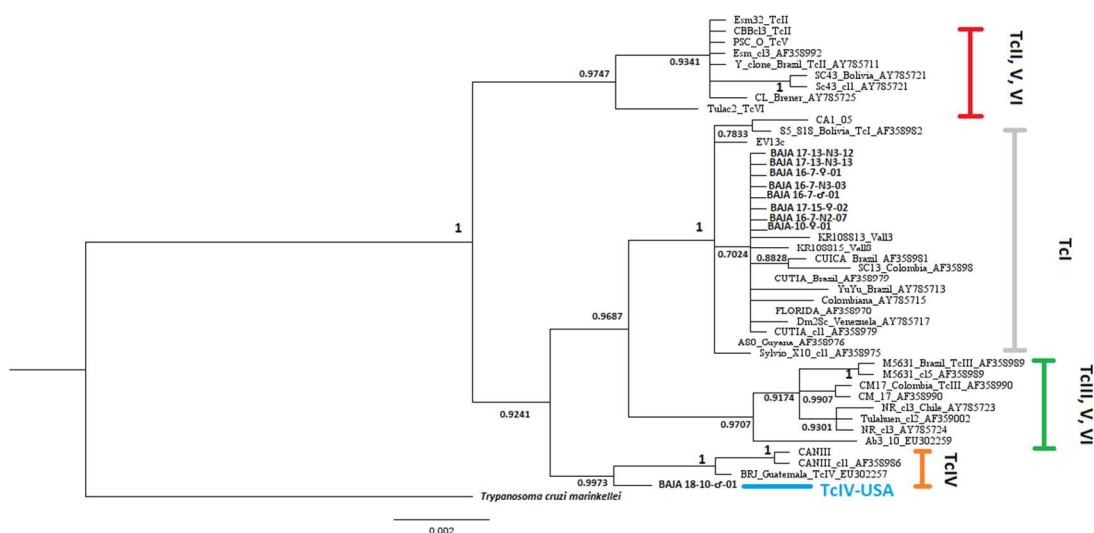


Figura 7. Árbol filogenético de consenso reconstruido a partir de inferencia Bayesiana asociada al marcador TRY2 (1,335 pb) para las distintas muestras obtenidas en Baja California y los DTU's de referencia. Los valores de los nodos internos representan la probabilidad posterior de ser un grupo monofilético.

Con el marcador DHFR-TS se encontraron 87 SNPs dentro de los 1,145 sitios totales, indicando que tan solo el 7.59% del gen cuenta como datos informativos a lo largo de las diversas secuencias de *T. cruzi*. En la Figura 9 se muestra la filogenia obtenida a partir de las secuencias y el marcador utilizado, obteniendo diversas muestras dentro del DTU TcI y una única dentro del TcIV-USA.

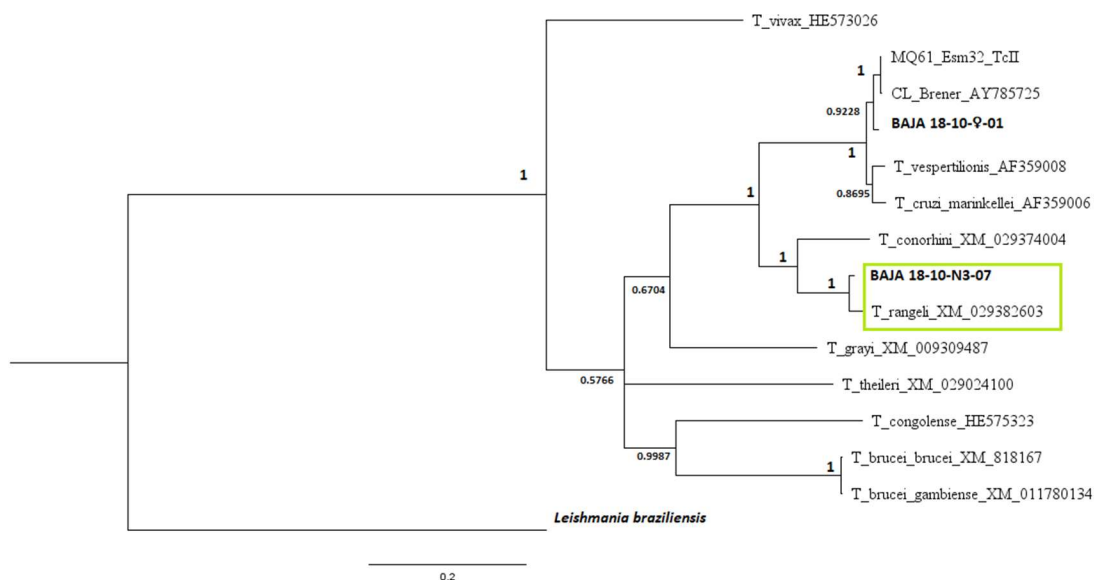


Figura 8. Árbol filogenético de consenso reconstruido a partir de inferencia Bayesiana con la muestra BAJA 18-10-N3-07 asociada a *T. rangeli* y otras secuencias de *Trypanosoma*. Los valores de los nodos internos representan la probabilidad posterior de ser un grupo monofilético.

Y para el marcador RB19 se encontraron 26 SNPs dentro de 340 sitios totales, indicando que un 7.64% del alineamiento cuenta con datos polimórficos. En la Figura 10 se muestra la filogenia obtenida a partir de las secuencias y el marcador utilizado, obteniendo bastantes politomías, asociando muestras dentro del DTU TcI y dos muestras en TcIV-USA.



Figura 9. Árbol filogenético de consenso reconstruido a partir de inferencia Bayesiana asociada al marcador DHFR-TS (1,200 pb) para las distintas muestras obtenidas en Baja California y los DTU's de referencia. Los valores de los nodos internos representan la probabilidad posterior de ser un grupo monofilético.

La mayoría de los marcadores resultaron en el DTU TcI, pero también se encontró una posible infección múltiple con *T. cruzi* y *T. rangeli* y la presencia del TcIV-USA que es un DTU distinto al TcIV encontrado en la región sureña de EUA.

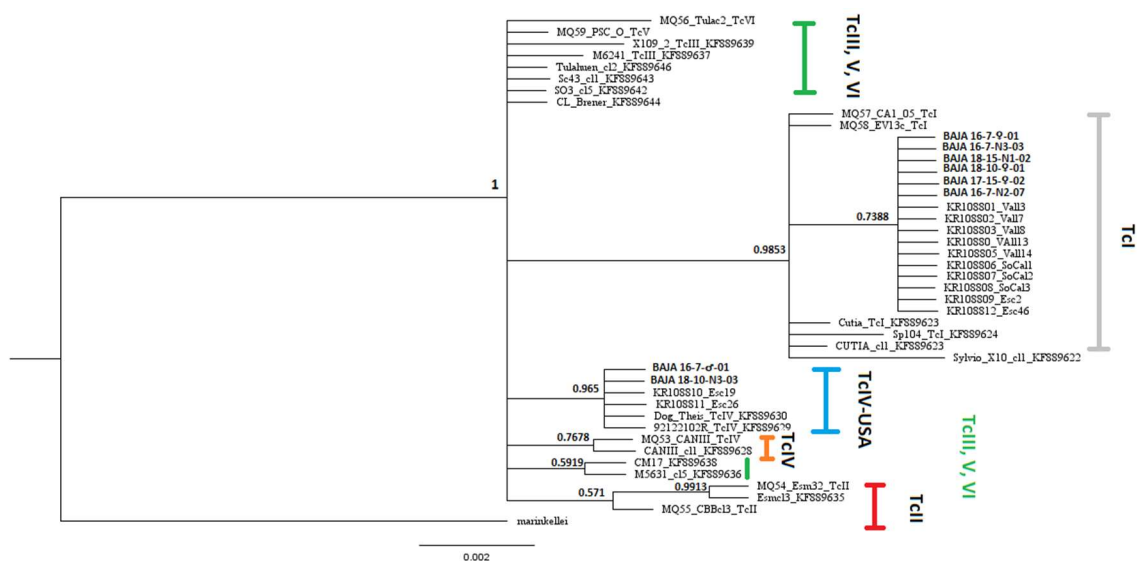


Figura 10. Árbol filogenético de consenso reconstruido a partir de inferencia Bayesiana asociada al marcador RB19 (408 pb) para las distintas muestras obtenidas en Baja California y los DTU's de referencia. Los valores de los nodos internos representan la probabilidad posterior de ser un grupo monofilético.

DISCUSIÓN

Descripción de DTU's en *D. maxima*

La interpretación de la historia evolutiva de *T. cruzi* a partir de marcadores moleculares con una apropiada cantidad de sitios filogenéticamente informativos ha sido crucial para determinar aspectos vitales de la biología de este parásito humano. Por ejemplo, están los estudios que demostraron que *T. cruzi* llegó a formar nuevos DTU's a partir de la hibridación de dos DTU's distintos (Machado & Ayala 2001). Eventos que aunque se especula sean inusuales en la naturaleza, demuestran la importancia de realizar filogenias a partir de varios marcadores moleculares distintos o bien con marcadores que tengan la resolución filogenética necesaria para describir la historia evolutiva de organismos con estilos de vida similares (*i.e.*, asexuales, diploides, unicelulares, pero con la capacidad de tener eventos de hibridación).

En este estudio se amplificó un total de cinco marcadores moleculares: RB19, DHFR-TS, COII-ND1, TRY2 y TcCLB.508213.20. Amplificación que se realizó casi en todas las muestras positivas a *T. cruzi* (ver Tabla V). A pesar de que el marcador TcZ es preciso para la identificación de la infección de *T. cruzi* en muestras de ADN, este no se utiliza para realizar análisis filogenéticos debido a que su función es la detección del parásito sin importar el DTU en el que se encuentre. Así, el TcZ ofrece una viabilidad de amplio espectro al usar TcZ, pero poca exactitud para identificar linajes evolutivos. Al analizar los marcadores amplificados y sus topologías filogenéticas, se observa cómo los marcadores con mejor resolución filogenética fueron: COII-ND1, DHFR-TS y TRY2.

Los marcadores moleculares TcCLB.508213.20 y RB19 generaron árboles filogenéticos con demasiadas politomías en los distintos nodos internos, otorgando una baja confianza (probabilidad posterior de la inferencia bayesiana) al momento de analizar los linajes obtenidos (Figuras 6 y 10, respectivamente). Razón por la cual no se lograron obtener árboles filogenéticos resueltos con estos dos marcadores, seguramente a consecuencia de la baja cantidad de sitios filogenéticamente informativos obtenidos con ambos marcadores (Roman *et al.*, 2018; Shender *et al.*, 2016)

En conjunto, los cinco marcadores sumaron un total de 4,793 pb para los análisis filogenéticos, de los cuales 434 pb eran sitios polimórficos siendo el equivalente al 9.05% de la cantidad de pb totales. Sin embargo, los datos no fueron concatenados debido a que no se logró amplificar el total de los cinco marcadores en el total de las muestras positivas (ver Tabla V). Algo que no es inusual en estudios de esta naturaleza (Bosseno *et al.*, 2002; Flores-López *et al.*, 2022).

Con respecto a los DTU's encontrados en este trabajo, se encontró que la mayoría de muestras positivas se agrupan con el linaje TcI. En concordancia con otros estudios como el de Bosseno *et al.*, (2002), donde se presentó el predominio del linaje TcI a comparación de los demás DTU para México. De igual forma el trabajo de Shender *et al.*, (2016), se reporta la presencia de TcI en California (EUA), en un vector (*Triatoma protracta*) de Latinoamérica. Al igual que los estudios de Ramos-Ligonio *et al.*, (2012), Ibáñez-Cervantes *et al.*, (2013) y Dorn *et al.*, (2017), donde se describe la presencia de TcI en diferentes estados de México. La muestra (18-10-♂-01) de nuestro estudio también se agrupa con TcIV (ver Figura 5) el cual es un DTU que también ha sido frecuentemente

reportado en estudios realizados en Norteamérica (incluido México), indicando su presencia en los trabajos de Ramos-Ligonio *et al.*, (2012), Ibáñez-Cervantes *et al.*, (2013) y Meyers, Meinders & Hamer, (2017). Los DTU's TcIII, V, VI y TcIV en esta filogenia no son monofiléticos, posiblemente debido a la resolución en las muestras y el hecho de que TcV y TcVI son híbridos del cruzamiento de TcII y TcIII (Sturm *et al.*, 2003; Sturm & Campbell, 2010). No es seguro que la muestra sea TcIV, aunque demuestra una similitud casi del 100% con la muestra llamada CANIII, siendo catalogada como TcIV y sirviendo de referencia para esta agrupación.

De particular interés fue la descripción del linaje TcIV-USA. Este particular linaje fue reportado en el trabajo de Flores-López *et al.*, (2022) donde se registra la presencia de un nuevo DTU distinto al TcIV presente en la región sureña de EUA (*i.e.*, Texas y Arizona). Linaje que anteriormente había sido erróneamente clasificado como TcIV, pero con una mayor cantidad de marcadores moleculares utilizados se logró esclarecer que no era TcIV y que realmente podría merecer su propio DTU. Por lo que por el momento se le designó TcIV-USA. No obstante, el hecho de estar presente en México, sugiere que su distribución geográfica no está limitada a la región sureña de EUA

En este estudio no se reportaron la presencia de híbridos, no obstante una muestra (16-7-♂-01) se agrupó con clados distintos de acuerdo al marcador utilizado. Lo cual no descarta la opción de la presencia de un híbrido (Schwabl *et al.*, 2019; Kay *et al.*, 2022). Sin embargo, es más probable que la chinche de la cual fue aislada esa muestra de *T. cruzi*, realmente representa una doble infección por *T. cruzi* de dos DTU's distintos. Algo común

en estudios de esta naturaleza como lo presentado en los trabajos de Monje-Rumi *et al.*, (2015), Campos-Soto *et al.*, (2020) y Dumonteil *et al.*, (2020).

Descripción de *T. rangeli*

El parásito *Trypanosoma rangeli* se caracteriza por habitar las áreas de América Central y América del Sur, exponiendo su presencia y registros en los trabajos de Grisard *et al.*, (1999), Vallejo *et al.*, (2002) y Salazar-Antón *et al.*, (2009) para los países de Brasil, Colombia, Honduras, Panamá, El Salvador, Costa Rica y Venezuela. Hasta el momento no se ha reportado su presencia en algún triatomino de México. Sin embargo, esto no significa que no puedan ser vector ya que en el trabajo de Cuba Cuba (1998) y Díaz-Garrido, Martínez-Martínez & Gutiérrez (2019), se sugiere que los triatominos del género *Dipetalogaster*, *Panstrongylus*, y *Triatoma* que habitan en México pueden ser portadores de *T. rangeli* de forma experimental a partir de una infección intrahemocélica del patógeno, y de forma natural en donde este parásito se transmite por medio de la ingestión de la sangre de un vertebrado infectado (no hay registros hasta el momento). Esta especie de *Trypanosoma* se caracteriza por contar con un ciclo de vida distinto a *T. cruzi*, ya que en vez de solo tener ciclos de desarrollo en el tracto digestivo, este viaja del tracto digestivo a la hemolinfa y de aquí a las glándulas salivales, infectando diferentes tipos de células (Vallejo *et al.*, 2015).

El estudio de Vallejo *et al.*, (2015) sugiere que *T. rangeli* puede encontrarse en diversas células dentro del triatomino, habiendo la posibilidad de encontrarse en el tracto

digestivo y contar con un diagnóstico no solo para *T. cruzi*, si no para *T. rangeli* al mismo tiempo. Esta doble infección puede suponer un problema al momento de realizar diagnósticos para la presencia de parásitos ya que a nivel morfológico no representan una diferencia visible ante neófitos en el área (Kreier & Baker, 1987), suponiendo una infección errónea o una prevalencia distinta a la real.

En este estudio al observar la amplificación de los diversos marcadores moleculares, solo se logró observar la presencia de *T. rangeli* para el gen TRY2, indicando la presencia de regiones similares en donde este par de primers logran amplificar, encontrando una similitud en esta secuencia de nucleótidos, a diferencia de los otros marcadores moleculares en donde pueden representar una ausencia o una divergencia de nucleótidos o incluso de las regiones completas entre *T. cruzi* y *T. rangeli* (Guhl *et al.*, 2002; Murty, Dibbern & Campbell, 1992).

A pesar de la gran cantidad de investigaciones y estudios con respecto al parásito *T. rangeli* en Latinoamérica, estos solo se han enfocado en la región de América Central y América del Sur (Guhl & Vallejo, 2003), exceptuando a México, ya que hasta este momento no se ha registrado algún vector con la presencia de *T. rangeli* de forma natural. Esto expone el gran desconocimiento de la presencia del patógeno en los diversos vectores triatominos y en las diversas presas de vertebrados. Aunado a lo anterior, este primer registro de *T. rangeli* en el triatomo 18-10-N3-07, indica la posibilidad de que haya una prevalencia mayor del parásito, ya que al buscar en los tractos digestivos se logró encontrar a *T. rangeli* significando que si se realiza una búsqueda exhaustiva en las

glándulas salivales (Vallejo *et al.*, 2015), pueda existir un aumento de vectores con diagnóstico positivo.

Baja prevalencia de *T. cruzi* en *D. maxima*

La tasa de infección (2.63%) obtenida para *D. maxima* a partir de los últimos dos años de colecta (2020-2021) es congruente con el resultado obtenido previamente por el trabajo de Jiménez, Llinas & Palacios (2003) y Flores-López *et al.*, (2022), demostrando la escasa presencia del parásito *T. cruzi* en *D. maxima* y una congruencia con la tasa de infección descrita para la región del Cabo y los sitios de colecta. Aunado a esto, el efecto de dilución se presenta, pues *D. maxima* (a comparación de otras chinches) logra alimentarse de diversos organismos; prefiriendo “reptiles” y ocasionalmente algunos mamíferos (Marsden *et al.*, 1979). Esta diversa dieta provoca una reducción en la presencia de *T. cruzi* en estas comunidades debido al amplio número de posibles presas que no son hospederos naturales, que no suelen contar con el parásito y de especies que no son mamífero, otorgando bajas tasas de infección (de Noya & González, 2015). En comparación con las tasas de infección para la región californiana que oscilan entre 28% al 55% en la especie de chinche *Triatoma protracta* (Shender *et al.*, 2016) concordando con lo mencionado con respecto a la presencia del DTU TcI en mayor concentración, después los TcIV y en menor proporción el DTU TcIV-USA. La tasa de infección obtenida en este estudio, se puede ver afectada debido a que el total de chinches a las cuales se les extrajo el tracto digestivo no es el mismo al total de tractos digestivos a los que se realizaron la PCR, ya que no todos cumplieron con el criterio de calidad de ADN.

Dentro del diagnóstico y la amplificación del gen se presenta el problema al comparar entre las muestras la existencia de diferentes cepas y DTU's debido a que los primers fueron creados con base en una o varias cepas en específico y al momento de existir polimorfismos, estos obstruyen el diagnóstico, indicando como negativo a una muestra positiva que posee distintos nucleótidos o variantes de una posición del gen/secuencia. Esto se refiere a la presencia de una diferencia de nucleótidos en la secuencia entre individuos pertenecientes a diferentes cepas, DTU's o incluso dentro de la misma especie, abarcando cambios genéticos de delección e inserción que modifica una secuencia de ADN en específico (Ramírez-Bello *et al.*, 2013). Por otro lado, existe el problema en donde la baja concentración de ADN encontrada en los tractos digestivos es menor en comparación de la concentración de ADN ubicadas en las cepas (control positivo), existiendo un posible sesgo ante el diagnóstico de *T. cruzi* debido a que la concentración no es suficiente para que se de forma correcta la PCR y logre amplificar el gen de interés.

Alto índice de DTU's en *D. maxima*

Nuestra hipótesis original predecía que la diversidad genética de *T. cruzi* dentro del vector endémico *Dipetalogaster maxima* iba a ser baja (*e.g.*, presencia de un solo DTU), debido a la distribución geográfica limitada que tiene el vector. Sin embargo, nuestros resultados no concordaron con dicha predicción. Los análisis filogenéticos detectaron la presencia de tres DTU's (TcI, TcIV y TcIV-USA) de los siete que se han descrito. Por lo que la certeza de la determinación de cada DTU tiene un alto nivel de

confianza, debido a la alta resolución filogenética con la que se contó (ie., usando cinco marcadores moleculares: COII-ND1, RB19, TRY2, DHFR-TS y TcCLB.508213.20). Incluso se logró identificar fortuitamente a *Trypanosoma rangeli*, el cual es un parásito que también ha sido reportado como infectivo para humanos, no obstante no causa patología en humanos (Basso *et al.*, 2007). Solamente se ha reportado como patogénico para los vectores Triatominos en los que se ha reportado (principalmente en Sudamérica). Haciendo de este estudio el primer reporte de *T. rangeli* en México (Guhl & Vallejo, 2003).

Faltan análisis ecológicos y evolutivos para estimar el tiempo que han estado circulando estos linajes en la región de Baja California Sur y determinar qué especies están sirviendo de alimento para *Dipetalogaster maxima*, así como a los otros vectores de la zona. Estos estudios ayudarán a explicar la historia evolutiva y divergente de los linajes existentes en la Península de Baja California, lo cual permitirá responder la razón por la cual la limitación geográfica del vector no representa una limitante para la diversidad del parásito.

Con respecto al posible riesgo de infección por *T. cruzi* en la zona donde habita *D. maxima*, se requieren de una mayor cantidad de datos ecológicos que permitan evaluar la capacidad de dispersión de *Dipetalogaster maxima*. Aunque los adultos tienen alas, no hay estudios que se hayan enfocado en evaluar la capacidad de vuelo de esta especie. Aunado a esto, también falta mucha información con respecto a los otros vectores latentes que existen en la región (Ryckman & Ryckman, 1967), con el fin de determinar la prevalencia de *T. cruzi*, fuentes de alimentación y otros aspectos ecológicos que permitan

evaluar el riesgo de la transmisión de la enfermedad de Chagas a partir de la zoonosis en comunidades aledañas.

Los linajes y filogenias obtenidas cuentan con una importancia significativa en diversas áreas; por un lado abre el parteaguas de iniciar más investigaciones a nivel ecológico para observar las presas de las cuales se alimenta *D. maxima* y extender la conclusión de cómo diversos DTU's o incluso diversos patógenos pueden encontrarse dentro de las poblaciones de hospederos triatominos en la región del Cabo. Por otro lado se extiende la investigación con respecto a la presencia de *T. rangeli*, TcIV-USA, y posibilidad de zoonosis y la patología asociada al DTU que se encuentre fluyendo dentro de las poblaciones y comunidades de triatominos para la región del Cabo y la península de Baja California. Esclareciendo a la enfermedad de Chagas y los problemas que conlleva el tener vectores positivos de *T. cruzi* en la península de Baja California, suponiendo un riesgo para la población.

CONCLUSIONES

En este estudio se logró reportar un total de tres DTU's (TcI, TcIV y TcIV-USA) en *D. maxima*, aun cuando el área geográfica en la que se distribuyen es relativamente pequeña en comparación a otras especies de triatominos. Se resalta la presencia de TcIV-USA, confirmando la falta de información sobre la diversidad genética del parásito circulando en la naturaleza. Aunado a esto, se establece el primer reporte oficial del patógeno *Trypanosoma rangeli* en México a partir de la caracterización genética al buscar en los tractos digestivos de *D. maxima* a *T. cruzi*. Esta presencia tiene implicaciones en el diagnóstico de la prevalencia de *T. cruzi* en México, ya que es difícil llevar a cabo una distinción morfológica entre ambas especies (Kreier & Baker, 1987) y fomenta el interés por seguir estudiando las poblaciones de chinches de México, debido a la importancia que tiene el patógeno en los vectores.

Como trabajos futuros se recomienda estudiar las fuentes de alimentación de *D. maxima* y el papel de los hospederos de *T. cruzi* en su hábitat. Las cuales son piezas de información claves para comprender el ciclo de *T. cruzi* en la región sureña de Baja California Sur.

REFERENCIAS

- Basso, B., Castro, I., Introini, V., Gil, P., Truyens, C., & Moretti, E. (2007). Vaccination with *Trypanosoma rangeli* reduces the infectiousness of dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Vaccine*, 25(19), 3855-3858.
- Benson, D., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D., Ostell, J., & Sayers, E. (2013). GenBank. *Nucleic acids research*, 41(D1), D36-D42.
- Bern, C. (2015). Chagas' Disease. *New England Journal of Medicine*, 373(5), 456–466.
- Borja, L., & Espinosa, R. (2004). *Trypanosoma cruzi*: Historia natural y diagnóstico de la enfermedad de Chagas Derechos. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, 51(4), 205–219.
- Bosseno, M., Barnabé, C., Magallón Gastélum, E., Lozano Kasten, F., Ramsey, J., Espinoza, B., & Brenière, S. (2002). Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Mexico. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(2), 627-632.
- Campos-Soto, R., Díaz-Campusano, G., Quiroga, N., Muñoz-San Martín, C., Rives-Blanchard, N., & Torres-Pérez, F. (2020). *Trypanosoma cruzi*-infected triatomines and rodents co-occur in a coastal island of northern Chile. *PeerJ*, 8, e9967.
- Cosentino, R., & Agüero, F. (2012). A simple strain typing assay for *Trypanosoma cruzi*: discrimination of major evolutionary lineages from a single amplification product. *PloS Neglected Tropical Diseases*, 6(7), e1777.
- Coura, J., & Dias, J. (2009). Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(SUPPL. 1), 31–40.
- Cuba Cuba, C. (1998). Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos del *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 31, 207-220
- Díaz-Garrido, P., Martínez-Martínez, I., & Gutiérrez, B. (2019). Presencia de péptidos en la hemolinfa de *Triatoma* (*Meccus pallidipennis* (Hemíptera: reduviidae) infectado con *Trypanosoma Cruzi*, *Trypanosoma rangeli* y bacterias). *Entomología mexicana*, 6: 543, 547.
- Dorn, P., McClure, A., Gallaspy, M., Waleckx, E., Woods, A., Monroy, M., & Stevens, L. (2017). The diversity of the Chagas parasite, *Trypanosoma cruzi*, infecting the main Central American vector, *Triatoma dimidiata*, from Mexico to Colombia. *PloS Neglected Tropical Diseases*, 11(9), e0005878.

- Dumonteil, E., Pronovost, H., Bierman, E., Sanford, A., Majeau, A., Moore, R., & Herrera, C. (2020). Interactions among *Triatoma sanguisuga* blood feeding sources, gut microbiota and *Trypanosoma cruzi* diversity in southern Louisiana. *Molecular ecology*, 29(19), 3747-3761.
- Edgar, R. (2004), MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Research* 32(5), 1792-97.
- Flores-López, C., & Machado, C. (2011). Analyses of 32 loci clarify phylogenetic relationships among *Trypanosoma cruzi* lineages and support a single hybridization prior to human contact. *PloS Neglected Tropical Diseases*, 5(8), e1272.
- Flores-López, C., Mitchell, E., Reisenman, C., Sarkar, S., Williamson, P., & Machado, C. (2022). Phylogenetic diversity of two common *Trypanosoma cruzi* lineages in the Southwestern United States. *Infection, Genetics and Evolution*, 99, 105251.
- Flores-López, C., Rivas-García, L., Romero-Figueroa, G., Guevara-Carrizales, A., Peiro-Nuño, H., López-Ordoñez, T., & Bello-Bedoy, R. (2022). Infection Rate of *Trypanosoma cruzi* (Trypanosomatida: Trypanosomatidae) in *Dipetalogaster maxima* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology*, 59(1), 394-399.
- Garrido, R., Campos-Soto, R., Quiroga, N., & Botto-Mahan, C. (2021). Bloodmeal-stealing in wild-caught *Mepraia spinolai* (Hemiptera: Reduviidae), a sylvatic vector of *Trypanosoma cruzi*. *Ecological Entomology*, 46(3), 681-683.
- Gaunt, M., Yeo, M., Frame, I., Stothard, J., Carrasco, H., Taylor, M., & Miles, M. (2003). Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature*, 421(6926), 936-939.
- Gouy M., Guindon S., & Gascuel O. (2010) SeaView version 4 : a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27(2):221-224.
- Grisard, E., Steindel, M., Guarneri, A., Eger-Mangrich, I., Campbell, D., & Romanha, A. (1999). Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated in Central and South America: an overview. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94, 203-209.
- Guhl, F., & Vallejo, G. (2003). *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: an updated review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98, 435-442.
- Guhl, F., Jaramillo, C., Carranza, J., & Vallejo, G. (2002). Molecular characterization and diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*. *Archives of Medical Research*, 33(4), 362-370.
- Guhl, F. (2013). Epidemiología molecular de *Trypanosoma cruzi*. *Revista Española de Salud Pública*, 2013(1), 1–8.
- Ibáñez-Cervantes, G., Martínez-Ibarra, A., Noguera-Torres, B., López-Orduña, E., Alonso, A., Perea, C., & León-Avila, G. (2013). Identification by Q-PCR of

- Trypanosoma cruzi* lineage and determination of blood meal sources in triatomine gut samples in Mexico. *Parasitology international*, 62(1), 36-43.
- Izeta-Alberdi, A., Ibarra-Cerdeña, C., Moo-Llanes, D., & Ramsey, J. (2016). Geographical, landscape and host associations of *Trypanosoma cruzi* DTUs and lineages. *Parasites & Vectors*, 9(1), 1-20.
- Jiménez, M., Llinas, J., & Palacios, C. (2003). Infection rates in *Dipetalogaster maximus* (Reduviidae: Triatominae) by *Trypanosoma cruzi* in the Cape Region, Baja California Sur, Mexico. *Journal of Medical Entomology*, 40(1), 18-21.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.
- Kay, C., Peacock, L., Williams, T., & Gibson, W. (2022). Signatures of hybridization in *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathogens*, 18(2), e1010300.
- Kollien, A., & Schaub, G. (2000). The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitology today*, 16(9), 381-387.
- Kreier, J., & Baker, J. (1987). Trypanosomes and related organisms. In *Parasitic Protozoa*. Springer, Dordrecht, 43-89.
- Lee, B., Bacon, K., Connor, D., Willig, A., & Bailey, R. (2010). The potential economic value of a *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease) vaccine in Latin America. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(12), 1-8.
- Lent, H., & Wygodzinsky, P. (1979). Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bulletin of the American museum of Natural History*, 163(3), 123-520.
- Martínez-Hernández, F., Oria-Martínez, B., Rendón-Franco, E., Villalobos, G., & Muñoz-García, C. (2022). *Trypanosoma cruzi*, beyond the dogma of non-infection in birds. *Infection, Genetics and Evolution*, 99, 105239.
- Machado, C., & Ayala, F. (2001). Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(13), 7396-7401.
- Machado, C., & Ayala, F. (2002). Sequence variation in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) and trypanothione reductase (TR) genes of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and biochemical parasitology*, 121(1), 33-47.
- Marsden, P., Cuba, C., Alvarenga, N., & Barreto, A. (1979). Report on a field collection of *Dipetalogaster maximus* (Hemiptera Triatominae)(Uhler, 1894). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 21(4), 202-206.

- Martínez-Ibarra, J., Noguera-Torres, B., Cárdenas-Barón, A., Montañez-Valdez, O., Bustos-Saldaña, R., & Meillón-Isáis, K. (2018). Life history of two abundant populations of *Dipetalogaster maximus* (Uhler, 1894)(Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in Northwestern Mexico. *Journal of Vector Ecology*, 43(1), 104-109.
- Meraz-Medina, T., Noguera-Torres, B., & Martínez-Ibarra, J. (2022). Life History Data of *Dipetalogaster maxima* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology*, 59(5), 1519-1524.
- Meyers, A., Meinders, M., & Hamer, S. (2017). Widespread *Trypanosoma cruzi* infection in government working dogs along the Texas-Mexico border: Discordant serology, parasite genotyping and associated vectors. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(8), e0005819.
- Mills, R. (2020). Chagas Disease: Epidemiology and Barriers to Treatment. *American Journal of Medicine*, 133(11), 1262–1265.
- Monje-Rumi, M., Brandán, C., Ragone, P., Tomasini, N., Lauthier, J., D'Amato, A., & Diosque, P. (2015). *Trypanosoma cruzi* diversity in the Gran Chaco: mixed infections and differential host distribution of TcV and TcVI. *Infection, Genetics and Evolution*, 29, 53-59.
- Monje-Rumi, M., Floridia-Yapur, N., Zago, M., Ragone, P., Brandán, C., Nuñez, S., Barrientos, N., Tomasini, N., & Diosque, P. (2020). Potential association of *Trypanosoma cruzi* DTU's TcV and TcVI with the digestive form of Chagas disease. *Infection, Genetics and Evolution*, 84, 104329.
- Moser, D., Kirchhoff, L., & Donelson, J. (1989). Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology*, 27(7), 1477-1482.
- Muñoz-Calderón, A., Santaniello, A., Pereira, A., Yannuzzi, J., Díaz-Bello, Z., & Alarcón de Noya, B. (2012). Susceptibilidad in vitro a Nifurtimox y Benznidazol de aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos de pacientes venezolanos con enfermedad de Chagas infectados por mecanismos de transmisión oral y vectorial. *Rev Ibero-Latinoam Parasitol*, 71(1), 14-22.
- Murthy, V., Dibbern, K., & Campbell, D. (1992). PCR amplification of mini-exon genes differentiates *Trypanosoma cruzi* from *Trypanosoma rangeli*. *Molecular and cellular probes*, 6(3), 237-243.
- de Noya, B., & González, O. (2015). An ecological overview on the factors that drives to *Trypanosoma cruzi* oral transmission. *Acta Tropica*, 151, 94-102.
- Organización Panamericana de la Salud & Organización Mundial de la Salud (OPS & OMS). Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas.
- by Jean, J Roberto, S. 2006;OPS: Montevideo, Uruguay. OPS/HDM/CD/425-06

- Padilla, C., Alvarado, U., Ventura, G., Luna-Caiipo, D., Suárez, M., Tuñoque, J., & Cáceres, A. (2017). Identifying *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in triatomines collected in different natural regions of Perú. *Biomedica : Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 37, 167–179.
- Pinto, C., Kalko, E., Cottontail, I., Wellingshausen, N., & Cottontail, V. (2012). TcBat a bat-exclusive lineage of *Trypanosoma cruzi* in the Panama Canal Zone, with comments on its classification and the use of the 18S rRNA gene for lineage identification. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(6), 1328-1332.
- Posada, D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular biology and evolution*, 25(7), 1253-1256.
- Rambaut, A. (2016) FigTree v1.4.3. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh.
- Ramírez-Bello, J., Vargas-Alarcón, G., Tovilla-Zárate, C., & Fragoso, J. (2013). Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. *Gaceta Medica de Mexico*, 149(2), 220-228.
- Ramos-Ligonio, A., Torres-Montero, J., López-Monteón, A., & Dumonteil, E. (2012). Extensive diversity of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units circulating in *Triatoma dimidiata* from central Veracruz, Mexico. *Infection, genetics and evolution*, 12(7), 1341-1343.
- Ramsey, J., Gutiérrez-Cabrera, A., Salgado-Ramírez, L., Peterson, A., Sánchez-Cordero, V., & Ibarra-Cerdeña, C. (2012). Ecological connectivity of *Trypanosoma cruzi* reservoirs and *Triatoma pallidipennis* hosts in an anthropogenic landscape with endemic Chagas disease. *PLoS ONE* 7(9): e46013.
- Ramsey, J., Peterson, A., Carmona-Castro, O., Moo-Llanes, D., Nakazawa, Y., Butrick, M., & Ibarra-Cerdeña, C. (2015). Atlas of Mexican Triatominae (Reduviidae: Hemiptera) and vector transmission of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110, 339-352.
- Roellig, D., Savage, M., Fujita, A., Barnabé, C., Tibayrenc, M., Steurer, F., & Yabsley, M. (2013). Genetic variation and exchange in *Trypanosoma cruzi* isolates from the United States. *PloS ONE*, 8(2), e56198.
- Roman, F., das Chagas Xavier, S., Messenger, L., Pavan, M., Miles, M., Jansen, A., & Yeo, M. (2018). Dissecting the phyloepidemiology of *Trypanosoma cruzi* I (TcI) in Brazil by the use of high resolution genetic markers. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(5), e0006466.
- Ronquist, F., & Huelsenbeck, J. (2003). MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572-1574.

- Ryckman, R., & Ryckman, A. (1967). Epizootiology of *Trypanosoma cruzi* in Southwestern North America Part X: The biosystematics of *Dipetalogaster maximus* in Mexico (Hemiptera: Reduviidae)(Kinetoplastida: Trypanosomidae). *Journal of Medical Entomology*, 4(2), 180-188.
- Sánchez-Guillén, M., López-Colombo, A., Ordóñez-Toquero, G., Gomez-Albino, I., Ramos-Jimenez, J., Torres-Rasgado, E., & Pérez-Fuentes, R. (2006). Clinical forms of *Trypanosoma cruzi* infected individuals in the chronic phase of Chagas disease in Puebla, Mexico. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101, 733-740.
- Schwabl, P., Imamura, H., Van den Broeck, F., Costales, J., Maiguashca-Sánchez, J., Miles, M., & Llewellyn, M. (2019). Meiotic sex in Chagas disease parasite *Trypanosoma cruzi*. *Nature communications*, 10(1), 1-14.
- Shender, L., Lewis, M., Rejmanek, D., & Mazet, J. (2016). Molecular diversity of *Trypanosoma cruzi* detected in the vector *Triatoma protracta* from California, USA. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(1), e0004291.
- Sturm, N., Vargas, N., Westenberger, S., Zingales, B., & Campbell, D. (2003). Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *International Journal for Parasitology*, 33(3), 269-279.
- Sturm, N., & Campbell, D. (2010). Alternative lifestyles: the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, 115(1-2), 35-43.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8), 1596–1599.
- Tanowitz, H., Weiss, L., & Montgomery, S. (2011). Chagas disease has now gone global. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(4), 4–5.
- Tibayrenc, M. (1998). Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *International Journal for Parasitology*, 28(1), 85-104.
- Vallejo, G., Guhl, F., Carranza, J., Lozano, L., Sánchez, J., Jaramillo, J., & Steindel, M. (2002). kDNA markers define two major *Trypanosoma rangeli* lineages in Latin-America. *Acta Tropica*, 81(1), 77-82.
- Vallejo, G., Suárez, J., Olaya, J., Gutiérrez, S., & Carranza, J. (2015). *Trypanosoma rangeli*: un protozoo infectivo y no patógeno para el humano que contribuye al entendimiento de la transmisión vectorial y la infección por *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 111-122.
- Waleckx, E., Verdugo, J., Amblard-Rambert, A., Basulto, G., López-Valencia, G., & Haro, A. (2022). In search of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) using mice-

baited traps along the peninsula of Baja California, Mexico. Research Square.

Yeo, M., Mauricio, I., Messenger, L., Lewis, M., Llewellyn, M., Acosta, N., & Miles, M. (2011). Multilocus sequence typing (MLST) for lineage assignment and high resolution diversity studies in *Trypanosoma cruzi*. PLoS Neglected Tropical Diseases 5(6), e1049.

Zingales, B., Andrade, S., Briones, M., Campbell, D., Chiari, E., Fernandes, O., & Schijman, A. G. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 104(7), 1051-1054.

Zingales, B. (2018). *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. Acta Tropica, 184, 38-52.