

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y TECNOLOGÍAS
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

COEXISTENCIA DE *LEISHMANIA* SPP. Y ENDOSIMBIONTES
EN POBLACIONES SILVESTRES DE *LUTZOMYIA* SP. EN LA PROVINCIA DE
DARIÉN.

AUTORA

LUISA GLORIBEL COLLADO MARISCAL

ASESORA

DRA. ANAYANSI VALDERRAMA

TESIS PRESENTADA COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OPTAR POR
EL TÍTULO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS CON ORIENTACIÓN
EN BIOLOGÍA MOLECULAR

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2022



Título de la Tesis:

"Coexistencia de *Leishmania* spp. y endosimbiontes en poblaciones silvestres de *Lutzomyia* sp. en la provincia de Darién"

TESIS

Sometida para optar al título de Maestría en Ciencias Biológicas con orientación en Biología Molecular

Vicerrectoría de Investigación y Postgrado

Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnologías

APROBADO POR:

Dra. Anayansi Valderrama

Presidente

Dra. Magaly Sánchez de Chial

Miembro

Dra. Edna Amada González

Miembro

REFRENDADO POR:

REPRESENTANTE DE LA VICERRECTORÍA DE
INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

FECHA: _____

05 OCT 2022

Obsequio Autor

57

DEDICATORIA

A mis padres, Rodolfo Collado y Gloria Mariscal de Collado, por su amor, por creer en mí, apoyarme incondicionalmente, motivarme y enseñarme que no debo rendirme hasta alcanzar mis metas, hasta que mis sueños se hagan realidad.

AGRADECIMIENTOS

A Dios todopoderoso por el don de la vida, la salud, la sabiduría y por no dejarme caer en los momentos de debilidad.

A la Doctora Anayansi Valderrama, asesora principal de este estudio, por creer en mi potencial, compartirme sus conocimientos, por su paciencia y todo el apoyo brindado durante el desarrollo de la investigación.

A la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT) por financiar mis estudios.

Al Sistema Nacional de Investigación (SNI) y la Convocatoria Universitaria a Fondos de Investigación 2019 de la Universidad de Panamá, por su contribución en el financiamiento del estudio.

A todo el cuerpo docente del Programa de Maestría en Ciencias Biológicas, de la Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnologías de la Universidad de Panamá, por su tiempo y dedicación.

A los miembros del comité asesor, la Dra. Magaly Sánchez de Chial y la Dra. Edna Amada González, por su colaboración en la revisión del manuscrito final de la tesis.

Al Departamento de Investigaciones en Entomología Médica del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud por brindarme sus instalaciones y equipos durante el desarrollo experimental de la investigación.

A mis compañeros del Departamento de Investigaciones en Entomología Médica del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, Madelaine Hernández, Mileyka Santos y Damaris Bernal, por su apoyo y motivación. También a los licenciados Eddier Rivera, Brigitte Henríquez y Angélica Castro, por apoyarme en algunos procesos en el laboratorio.

A todos los que de una u otra forma me brindaron su respaldo, apoyo y motivación y contribuyeron a que esta investigación hoy sea una realidad.

ÍNDICE GENERAL

	Página
HOJA DE APROBACIÓN.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE GENERAL.....	vi
ÍNDICE DE CUADROS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMEN.....	1
SUMARY.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
OBJETIVOS.....	7
Objetivo General.....	7
Objetivos Específicos.....	7
CAPÍTULO I	
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	8

1. Interacción huésped-parásito.....	8
2. Asociaciones simbióticas en insectos.....	11
3. Competencia vectorial y el papel de la microbiota.....	12
4. La microbiota intestinal de los flebótomos como determinante en la transmisión del parásito <i>Leishmania</i> spp.....	16
5. El papel de <i>Wolbachia</i> en los insectos.....	18
6. Los endosimbiontes como control biológico de insectos vectores.....	21
 CAPITULO II	
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
1. Muestreo.....	25
1.1. Descripción de los sitios de colecta.....	25
1.2. Método de captura.....	28
1.3. Temporalidad del muestreo.....	29
2. Procesamiento de muestras.....	29
2.1. Preparación de la muestra.....	29
2.2. Identificación taxonómica.....	30
2.3. Aislamiento de ADN.....	30
2.3. Amplificación por PCR.....	31
2.3.1 <i>Leishmania</i> ITS-1.....	31

2.3.2 <i>Wolbachia</i> 16S.....	32
2.3.3 16S bacteriano.....	32
2.4 Visualización de los productos de PCR.....	33
2.5 Reamplificación de los productos de PCR.....	34
2.6 Purificación del producto de PCR.....	34
2.7. Secuenciación Sanger.....	34
2.8. Análisis de resultados.....	35
CAPITULO III	
RESULTADOS.....	38
1. Riqueza y abundancia de flebótomos capturados en distintos ambientes ecológicos de la comunidad de Aruza, provincia de Darién.....	38
2. Proporción de <i>Leishmania</i> spp., <i>Wolbachia</i> sp. y otras bacterias en flebótomos capturados en la comunidad de Aruza, provincia de Darién.....	40
3. Identificación de las especies de <i>Leishmania</i> spp. presentes en los flebótomos capturados en la comunidad de Aruza, provincia de Darién.....	42
4. Caracterización de la microbiota presente en flebótomos capturados en la comunidad de Aruza, provincia de Darién.....	44
CAPITULO IV	
DISCUSIÓN.....	48

CONCLUSIONES.....	57
RECOMENDACIONES.....	59
BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	60
ANEXOS.....	73

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1.....	33
Oligonucleótidos utilizados para la identificar la presencia de <i>Leishmania</i> spp., <i>Wolbachia</i> y otras bacterias endosimbiontes en flebótomos.	
CUADRO 2.....	39
Riqueza y abundancia relativa de flebótomos capturados en Aruza, Provincia de Darién, Panamá.	
CUADRO 3.....	41
Proporción de <i>Leishmania</i> spp., <i>Wolbachia</i> sp. y otras bacterias en flebótomos capturados en Aruza, Provincia de Darién, Panamá.	

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.....	10
Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp. en el vector.	
FIGURA 2.....	13
Barreras que determinan la carga parasitaria en flebótomos.	
FIGURA 3.....	15
Mecanismos utilizados por los simbiontes microbianos para inhibir la colonización de patógenos y determinar la competencia vectorial de los flebótomos.	
FIGURA 4.....	19
Filogenia y evolución de <i>Wolbachia</i> .	
FIGURA 5.....	26
Ubicación geográfica del área de muestreo.	
FIGURA 6.....	27
Características de la vegetación de la comunidad de Aruza.	
FIGURA 7.....	28
Trampa de Luz tipo CDC, utilizada para la captura de flebótomos.	

FIGURA 8.....	43
Análisis filogenético realizado por el método de Máxima Verosimilitud para inferir la relación filogenética de las especies de <i>Leishmania</i> presentes en los flebótomos colectados en la comunidad de Aruza, provincia de Darién.	
FIGURA 9.....	45
Riqueza de la microbiota en flebótomos capturados en Aruza, provincia de Darién, Panamá.	
FIGURA 10.....	47
Análisis filogenético realizado por el método de Máxima Parsimonia para inferir en la relación filogenética entre las distintas especies de <i>Paracoccus</i> reportadas en los flebótomos colectados en la comunidad de Aruza, provincia de Darién.	
FIGURA 11.....	73
Micropreparado para la identificación taxonómica de flebótomos.	
FIGURA 12.....	74
Vista al microscopio de genitalia de flebótomos vectores incriminados en la transmisión de leishmaniasis en Panamá.	
FIGURA 13.....	74
Aislamiento de ADN de flebótomos.	

FIGURA 14.....75

Proceso de preparación de la mezcla de reacción para PCR.

FIGURA 15.....75

Proceso de electroforesis.

FIGURA 16.....76

Electroforesis de productos amplificados por PCR para *Leishmania* spp. amplificados mediante el gen ITS-1.

FIGURA 17.....77

Electroforesis de productos amplificados por PCR para *Wolbachia* sp. amplificados mediante el gen 16S.

FIGURA 18.....78

Electroforesis de productos amplificados por PCR para bacterias amplificados mediante el gen 16S ARNr.

ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico o ribosomal
AMP	Péptidos antimicrobianos
BG	Bosque de galería
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (Herramienta de búsqueda de alineación local básica)
BM	Bosque maduro
ITS-1	Espaciador interno transcrito 1
M1	Macrófagos M1
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SSUrRNA	Ácido ribonucleico ribosómico de subunidad pequeña
SPR	Subárbol-Poda-Reinjerto
Th1	Linfocitos Th1
WSP	Proteína de superficie de <i>Wolbachia</i>

ZI	Zona inundada
ZP	Zona de pastoreo

RESUMEN

Los parásitos del género *Leishmania* se transmiten a los humanos por la picadura de flebótomos infectados. En la naturaleza los flebótomos se alimentan de diferentes tipos de azúcares provenientes de plantas para adquirir hidratos de carbono, en su etapa larval suelen alimentarse de heces de animales y materia orgánica en estado de descomposición por lo que tienen la posibilidad de adquirir microorganismos como bacterias y hongos. Los microorganismos que forman parte de la microbiota intestinal de los flebótomos pueden tener un efecto negativo en la colonización de patógenos ya sea por una interacción microbiana directa, por la activación de mediadores inmunitarios o por la competencia por nutrientes esenciales, lo que ha llevado al descubrimiento de nuevas herramientas de bloqueo basadas en la paratrasgénesis. En ese sentido, la finalidad de este estudio fue determinar, mediante marcadores moleculares, la coexistencia de *Leishmania* spp. y endosimbiontes presentes en los individuos de las especies del género *Lutzomyia*. Utilizando trampas de luz tipo CDC se colectaron flebótomos en cuatro sitios ubicados en la comunidad de Aruza, Provincia de Darién y se obtuvieron 552 individuos representados en 21 especies de flebótomos. A través de la amplificación por PCR, 57 individuos resultaron positivos para el gen ITS-1 de *Leishmania* spp., 37 para el gen 16S de *Wolbachia* sp. y 299 para el gen 16S bacteriano. Se detectó infección por *Leishmania* spp. en 12 de las 21 especies de flebótomos analizados, aunque la proporción de *Wolbachia* sp. fue relativamente baja, se encontró en 11 especies de flebótomos. El filo bacteriano predominante fue Proteobacteria y encontramos 22 géneros bacterianos de los cuales 7 se reportan por primera vez en flebótomos. Estos resultados nos proporcionan evidencia científica que permitirá desarrollar nuevas estrategias de intervención para el control de los flebótomos y así romper las barreras de transmisión de la leishmaniasis.

SUMARY

Parasites of the genus *Leishmania* are transmitted to humans by the bite of infected sandflies. In nature, sandflies feed on different types of sugars from plants to acquire carbohydrates; in their larval stage they usually feed on animal feces and decaying organic matter, so they have the possibility of acquiring microorganisms such as bacteria and fungi. The microorganisms that are part of the intestinal microbiota of sandflies can have a negative effect on the colonization of pathogens either by direct microbial interaction, by activation of immune mediators, or by competition for essential nutrients, which has led to the discovery of new blocking tools based on paratransgenesis. In this sense, the purpose of this study was to determine by means of molecular markers the coexistence of *Leishmania* spp. and endosymbionts present in the individuals of the species of the genus *Lutzomyia*. Using CDC type light traps, phlebotomine sandflies were collected in four sites located in the community of Aruza, Darien Province, and 552 individuals divided into 21 species of sandflies were obtained. Through PCR amplification, 57 individuals were positive for the ITS-1 gene of *Leishmania* spp., 37 for the 16S gene of *Wolbachia* sp., and 299 for the bacterial 16S gene. *Leishmania* spp. infection was detected in 12 of the 21 sandflies species analyzed, although the proportion of *Wolbachia* sp. was relatively low, it was found in 11 species of sandflies. The predominant bacterial phylum was Proteobacteria and we found 22 bacterial genera of which 7 are reported for the first time in sandflies. These results provide us with scientific evidence that will allow us to develop new intervention strategies for the control of sandflies and thus break the barriers of leishmaniasis transmission.

INTRODUCCIÓN

Los parásitos del género *Leishmania* pertenecen al Orden *Trypanosomatida*, Familia *Trypanosomatidae* y varias especies producen la enfermedad leishmaniasis en los humanos (Bruschi & Gradoni, 2018). Se han descrito aproximadamente 53 especies de *Leishmania* incluyendo los cinco subgéneros y complejos: *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania*, complejo *Leishmania enriettii* y *Paraleishmania*; de estas, se sabe que 31 especies son parásitos de los mamíferos y 22 especies son patógenas para los seres humanos (Steverding, 2017).

La *Leishmania* se transmite a los humanos por la picadura de flebótomos infectados, de los cuales han sido incriminados como transmisores 98 especies de los géneros *Phlebotomus* (Viejo Mundo) y *Lutzomyia* (Nuevo Mundo) (Maroli *et al.*, 2013). En Panamá, se han reportado 76 especies de flebótomos (Feliciangeli, 1989), de los cuales cinco han sido incriminados como vectores de la leishmaniasis, incluyendo a *Lutzomyia ylephiletor* (Fairchild & Hertig), *Lutzomyia sanguinaria* (Fairchild & Hertig), *Lutzomyia panamensis* (Shannon), *Lutzomyia trapidoi* (Fairchild & Hertig) y *Lutzomyia gomezi* (Nitzulescu) (Valderrama *et al.*, 2008; Christensen & Herrer 1973).

En la naturaleza, la alimentación de los flebótomos es importante para ingerir macrófagos infectados que se transforman en formas de amastigote de *Leishmania* en el intestino medio. Una vez emergen los adultos se alimentan de

diferentes tipos de azúcares provenientes de plantas, para adquirir hidratos de carbono. En su etapa larval suelen alimentarse de heces de animales y materia orgánica en estado de descomposición, por lo que tienen la posibilidad de adquirir microorganismos como bacterias y hongos (Sant 'Anna *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2000). Las hembras se alimentan hasta dos veces de sangre para completar su ciclo gonadotrófico (Moraes *et al.*, 2018). Algunos flebótomos tienen una amplia variedad de huéspedes vertebrados para alimentarse; los cánidos, roedores y marsupiales son de mayor preferencia. Sin embargo, algunas especies se han adaptado a alimentarse de humanos. Por lo que, la transmisión de la *Leishmania* puede tener una dinámica de transmisión zoonótica o antroponótica (Steverding, 2017).

Las comunidades bacterianas adquiridas por los insectos a través de su alimentación están involucradas en el proceso de digestión de material orgánico, absorción de hierro en los eritrocitos, aminoácidos y vitaminas del complejo B (Vivero *et al.*, 2016). Adler & Theodor (1929), fueron los primeros en sugerir que la presencia de estos microorganismos podría intervenir en el desarrollo de *Leishmania* spp. en el intestino de los flebótomos (Dillon *et al.*, 1996).

Los microorganismos que forman parte de la microbiota intestinal de los flebótomos pueden tener un efecto negativo en la colonización de patógenos, ya sea por una interacción microbiana directa, por la activación de mediadores inmunitarios o por la competencia por nutrientes esenciales (Sant'Anna *et al.*, 2012). Por otro lado, las bacterias también pueden interrumpir las interacciones

necesarias entre el patógeno y el epitelio del vector y producir moléculas antiparasitarias (Telleria *et al.*, 2018; Azambuja *et al.*, 2005).

Existe evidencia de que el intestino medio de los insectos vectores es un órgano inmunorreactivo, que puede responder tanto a las bacterias como a los parásitos y producir una variedad de péptidos antimicrobianos (AMP) (Azambuja *et al.*, 2005). Los péptidos antimicrobianos son componentes multifuncionales del sistema inmune innato de organismos eucariotas y procariotas, cumplen funciones antibacterianas, antifúngicas y antivirales. Además, regulan la actividad simbiótica limitando su producción o eliminándolas (Mergaert, 2018). Por lo que, tienen una actividad prometedora en aplicaciones terapéuticas y profilácticas (Wu *et al.*, 2018).

En los últimos años se han llevado a cabo estudios demostrando que la microbiota intestinal, tiene un papel fundamental en la inducción, maduración y función del sistema inmunitario del huésped, que puede modular la resistencia a la colonización, reduciendo las poblaciones de parásitos en el intestino del insecto e interfiriendo con la transmisión de la enfermedad (Louradour *et al.*, 2017; Kelly *et al.*, 2017).

Muchas simbiosis son indispensables para la fisiología del huésped, por este motivo, una comprensión detallada de cómo los patógenos interactúan con los vectores y su microbiota residente puede conducir al desarrollo de nuevos métodos de control para bloquear la transmisión de enfermedades. Esto ha llevado al descubrimiento de nuevas herramientas de bloqueo basadas en la

paratransgénesis, donde las bacterias se modifican para interferir con la transmisión de patógenos. En ese sentido, el primer paso es la caracterización de la microbiota intestinal presente en los insectos vectores, lo que nos ayudará a crear evidencia científica para la elaboración de nuevas estrategias de intervención y control de los vectores que puedan bloquear la transmisión del agente patógeno y así romper las barreras de transmisión de la leishmaniasis.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Determinar mediante marcadores moleculares la coexistencia de *Leishmania* spp. y endosimbiontes presentes en los individuos de las especies del género *Lutzomyia*.

Objetivos Específicos:

1. Identificar las especies de *Lutzomyia* capturadas en distintos ambientes ecológicos en la comunidad de Aruza en la provincia de Darién.
2. Determinar las especies de endosimbiontes presentes o no en relación a los individuos infectados con *Leishmania*.
3. Caracterizar molecularmente las bacterias y especies de *Leishmania* presentes en los individuos del género *Lutzomyia*.

CAPÍTULO I

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

1. Interacción huésped-parásito

En la naturaleza, vivir en simpatía no es sinónimo de competencia vectorial, ya que los vectores pueden ser específicos (transmiten especies particulares de *Leishmania*) o no específicos (pueden albergar varias especies de *Leishmania*) (Sacks & Kamhawi, 2001). Esta especificidad es impulsada por varios factores moleculares que permiten que el parásito infecte, sobreviva, se multiplique dentro del intestino medio del vector y se transmita a un huésped vertebrado durante la ingesta de sangre (Ramalho-Ortigao *et al.*, 2010).

En consecuencia, la competencia vectorial de los flebótomos depende de la preferencia del vector por alimentarse de humanos, estar infectado con las especies de *Leishmania* que se encuentran en humanos y poder completar su desarrollo dentro del intestino medio después de la digestión de la sangre (Telleria *et al.*, 2018).

Las hembras de flebótomos adquieren el parásito al alimentarse de un huésped infectado, a partir de ahí los parásitos de *Leishmania* se diferencian en varias etapas de desarrollo a medida que migran del intestino medio posterior a la válvula estomodal, esto trae como resultado de la disminución de la temperatura y el

aumento del pH en el intestino medio del flebótomo (Dostálová & Volf, 2012; Sacks *et al.*, 2008).

En primer lugar, los amastigotes (forma pequeña de 3–5 μm , inmóvil y redondeada del parásito) se diferencian en promastigotes procíclicos (formas débilmente móviles con flagelo corto). Estas son las primeras formas replicativas que proliferan y están separadas del intestino medio por una matriz peritrófica. Pasadas unas 48 a 72 horas, los parásitos comienzan a ralentizar su replicación y se diferencian en nectomonas (largos y muy móviles), cuya función es escapar de la matriz peritrófica, para anclarse al revestimiento de las células epiteliales del intestino medio y migrar hacia la parte anterior del intestino torácico.

Posteriormente las leptomonas surgen de las nectomonas y finalmente, se observan dos etapas en la válvula estomodeal, haptomonas y promastigotes metacíclicos infecciosos, que migran a las glándulas salivales y esperan el inicio de la alimentación (Figura 1) (Ramalho-Ortigao *et al.*, 2010; Sacks *et al.*, 2008; Kamhawi, 2006). El tiempo aproximado que necesitan los parásitos para completar su desarrollo en los flebótomos es de 6 a 9 días, dependiendo de la especie (Bates & Rogers, 2004).

La ingesta de sangre por los flebótomos induce respuestas fisiológicas en su intestino medio, que incluyen la secreción de orina y secreción de enzimas digestivas. El primer determinante de la competencia vectorial es la capacidad de los parásitos para sobrevivir al ataque de las proteasas del intestino medio, que alcanzan su punto máximo entre 18 a 48 horas después de la alimentación con

sangre (Sacks & Kamhawi, 2001). Por el contrario, los flebótomos probablemente reconocen la presencia de *Leishmania* y desarrollan una respuesta inmune a la infección (Pitaluga *et al.*, 2009).

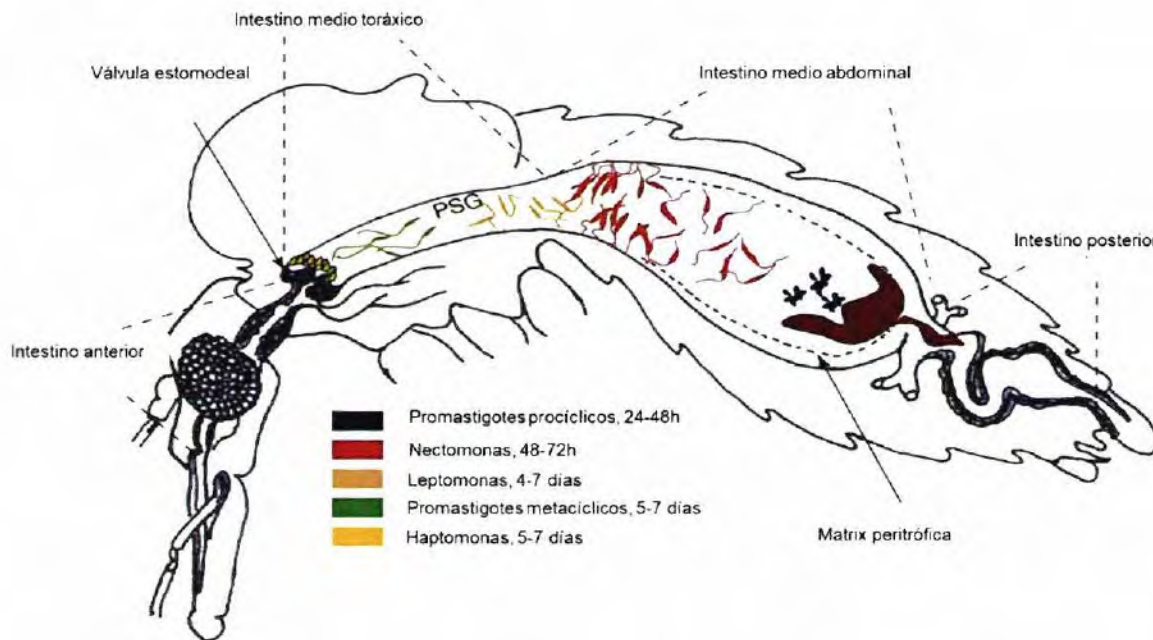


Figura 1. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. en el vector (Kamhawi, 2006).

El éxito de la colonización de *Leishmania* en el intestino medio de los flebótomos está determinado por varios factores moleculares, donde el parásito resiste el proceso digestivo, interfiriendo y modulando la transcripción de varios genes de enzimas digestivas (Telleria *et al.*, 2018; Dostálová *et al.*, 2011; Sant'anna *et al.*, 2009). *Leishmania* secreta un péptido mioinhibidor que interfiere en el peristaltismo intestinal, lo que retrasa la eliminación fecal, impidiendo que los parásitos sean excretados después de la ingestión de sangre (Vaidyanathan,

2004). Además, el parásito daña la válvula estomodal del insecto, dificultando así el proceso de ingestión de sangre. Ambas estrategias, facilitan la colonización de *Leishmania* en el intestino medio, permiten el desarrollo de los parásitos y su posterior transmisión (Telleria *et al.*, 2018; Volf *et al.*, 2004).

2. Asociaciones simbióticas en insectos

Todos los mamíferos posterior a su nacimiento, desarrollan una asociación microbiana compleja, mutuamente beneficiosa y diversa que reside en distintas áreas de sus organismos como la piel, la boca, la mucosa vaginal y el tracto gastrointestinal (Weiss & Aksoy, 2011).

A diferencia de los eucariotas superiores, los insectos albergan una comunidad microbiana menos diversa. Estas asociaciones simbióticas dependen de sus dietas nutricionalmente limitadas como sangre de vertebrados, materia orgánica en descomposición, floema de plantas o madera (Weiss & Aksoy, 2011).

La microbiota intestinal de los insectos está implicada en la protección contra depredadores, patógenos y parásitos; en la compensación de la dieta pobre en nutrientes; en la mediación de la comunicación interespecífica e intraespecífica; en el apareamiento y el éxito reproductivo y además ayuda a la digestión y suministro de aminoácidos esenciales y compuestos metabólicos (Jing *et al.*, 2020).

Los insectos con dietas restringidas y de poco valor nutricional presentan asociaciones simbióticas mutualistas que involucran bacterias que son

transmitidas verticalmente y que son indispensables para que sus anfitriones sobrevivan en entornos únicos o con recursos limitados (Weiss & Aksoy, 2011). Por el contrario, los insectos con dietas múltiples pueden albergar una amplia gama de microbios comensales que se pueden adquirir verticalmente, horizontalmente o desde el entorno (Gupta & Nair, 2020; Telleria *et al.*, 2018).

3. Competencia vectorial y el papel de la microbiota

Existen múltiples vías de inmunidad implicadas en la competencia vectorial, lo que da como resultado la resistencia del huésped del insecto a la infección por patógenos. La microbiota intestinal puede influir en la competencia vectorial de sus huéspedes mediante la interacción directa con los parásitos (Sant'Anna *et al.*, 2012) y esto puede ocurrir a través de la bioactividad inhibitoria de las enzimas o toxinas secretadas. Además, la microbiota puede interferir en el desarrollo de patógenos indirectamente al inducir la actividad del sistema inmunitario del huésped que, a su vez, puede eliminar los microbios patógenos (Weiss & Aksoy, 2011).

Estudios recientes en varios insectos demostraron que los fenotipos inducidos por la microbiota, tanto directos como indirectos, pueden afectar la capacidad de un huésped insecto para transmitir patógenos (Weiss & Aksoy, 2011).

La producción de moléculas relacionadas con la inmunidad innata, proteasas digestivas, membrana peritrófica impermeable al parásito y la microbiota intestinal

residente, son barreras que determinan la carga parasitaria transmitida (Figura 2) (Omondi *et al.*, 2022).

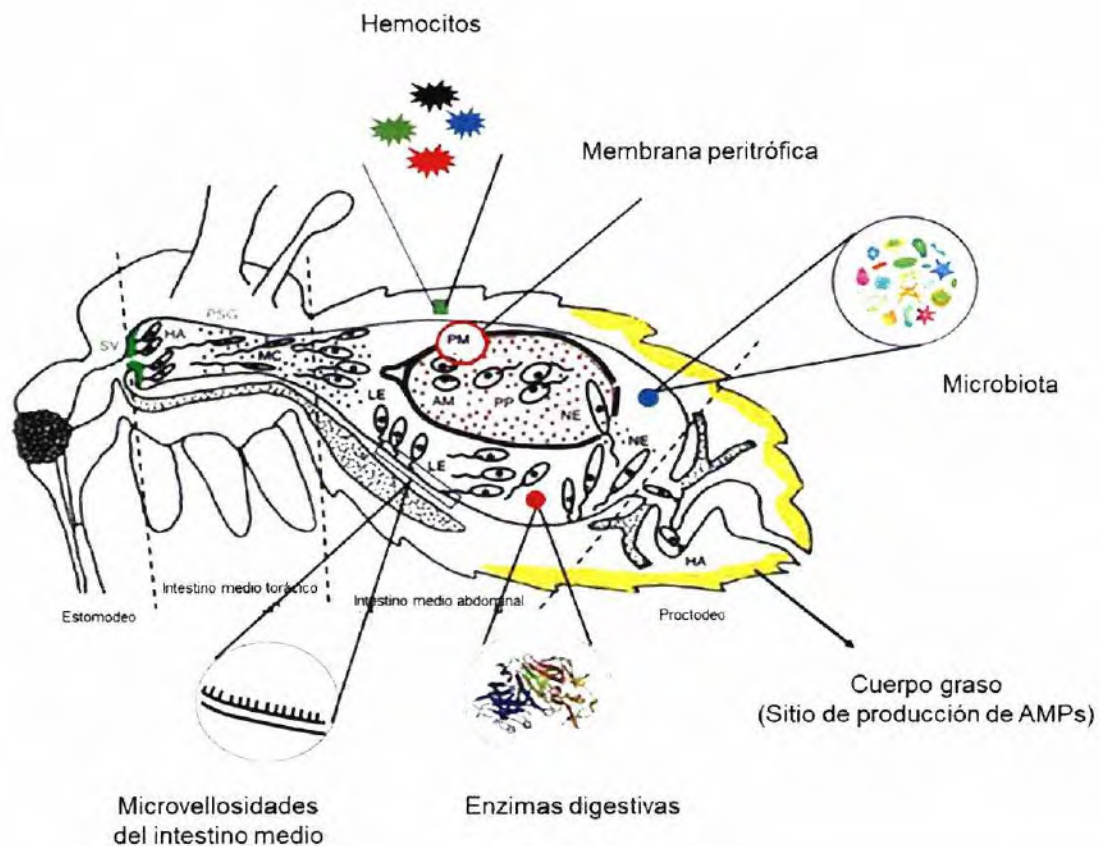


Figura 2. Barreras que determinan la carga parasitaria en flebótomos (Omondi *et al.*, 2022).

Los insectos tienen la capacidad de activar su sistema inmune para mantener la homeostasis intestinal y eliminar patógenos. La respuesta celular se da a través de la activación de la cascada de fenoloxidasa, con la que se produce la fagocitosis y la encapsulación de los microorganismos patógenos (Azambuja *et al.*, 2005). Mientras que las respuestas humorales conducen a la síntesis de

moléculas efectoras, incluidos los péptidos antimicrobianos (AMP), los cuales han sido descritos en muchos insectos por su rol en las respuestas inmunitarias innatas contra infecciones bacterianas y parasitarias (Telleria *et al.*, 2013).

La microbiota parece tener un papel esencial para el desarrollo de infecciones transmisibles al promover el estrés nutricional apropiado y las condiciones osmóticas requeridas para la diferenciación y supervivencia de los promastigotes metacíclicos en etapa infecciosa (Louradour *et al.*, 2017).

Estudios previos han comprobado el papel de la microbiota en la competencia vectorial de los flebótomos, donde la alimentación previa con ciertos hongos y bacterias redujeron la capacidad de *Leishmania* spp. para colonizar el intestino medio (Sant'Anna *et al.*, 2014).

Durante la interacción entre la microbiota y el intestino de los flebótomos, se pueden generar sustancias biológicamente activas como: enzimas proteolíticas, citotoxinas, péptidos antimicrobianos, tioésteres, galectinas y factores de señalización (Vivero *et al.*, 2020). Por su parte, los flebótomos también poseen un sistema de defensa inmune innato contra patógenos que incluye: defensinas, enzimas antioxidantes, caspasas y peroxidasas, que se encargan de mantener el equilibrio (Dostálová & Volf, 2012).

Las bacterias simbióticas utilizan varios mecanismos para inhibir la colonización de patógenos: 1) promoviendo la resistencia a la colonización a través de la mortalidad, 2) mediante metabolitos inhibidores, 3) la competencia por espacio, nutrientes y los nichos físicos. Se ha demostrado que algunas especies

bacterianas prefieren vivir en el lumen, la capa externa de la mucosidad o en la superficie epitelial (Figura 3) (Tabbabi *et al.*, 2022).

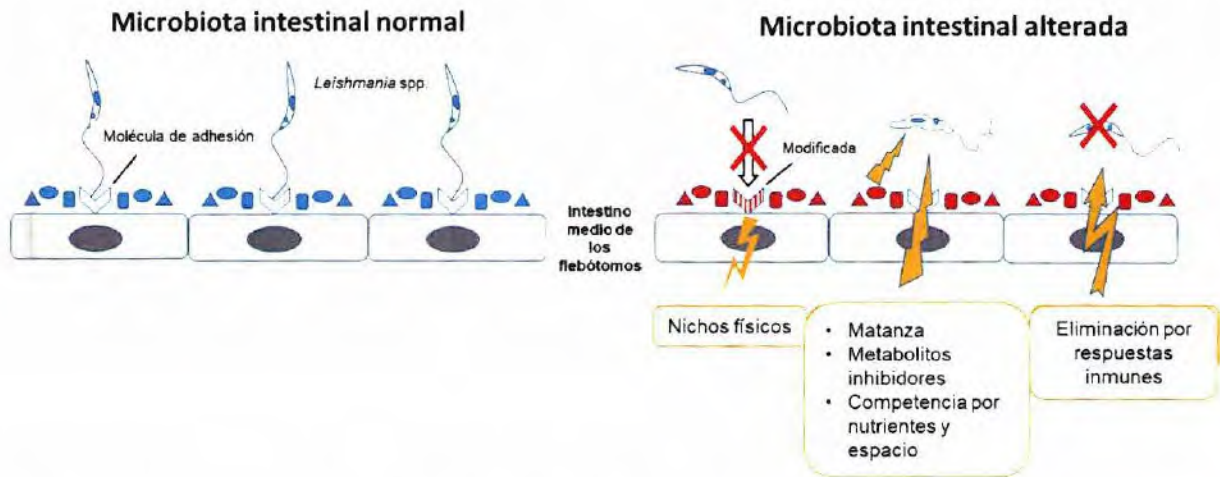


Figura 3. Mecanismos utilizados por los simbioses microbianos para inhibir la colonización de patógenos y determinar la competencia vectorial de los flebotomos (Tabbabi *et al.*, 2022).

Además de la competencia directa, la microbiota puede competir indirectamente con los patógenos al actuar sobre el huésped, lo que implica la activación del sistema inmune innato. Sin embargo, hay otras defensas no inmunitarias como las defensas conductuales que incluyen la fiebre conductual y la automedicación para tolerar mejor los parásitos que también pueden tener participación en la regulación de las condiciones osmóticas del huésped (Louradour *et al.*, 2017; De Roode & Lefèvre, 2012).

4. La microbiota intestinal de los flebótomos como determinante en la transmisión del parásito *Leishmania* spp.

El tracto digestivo de los flebótomos, no sólo se encuentra colonizado por *Leishmania*, en él también se encuentra una microbiota intestinal diversa, rica en microorganismos comensales; principalmente bacterias que colonizan naturalmente el intestino medio de los insectos vectores (Telleria *et al.*, 2018).

Estos microorganismos que habitan el intestino medio de los flebótomos proporcionan a sus huéspedes micronutrientes que faltan en sus dietas restringidas y están involucrados en procesos fisiológicos, de nutrición y reproducción (Aksoy, 2018; Vivero *et al.*, 2016).

Se ha demostrado que esta microbiota diversa tiene un rol preponderante en la modulación de infecciones virales y parasitarias, activando respuestas inmunitarias o inhibiendo directamente el desarrollo de los patógenos (Ramirez *et al.*, 2014) y esto puede influir en la susceptibilidad de los insectos a los virus o parásitos, aumentando su capacidad para una transmisión más eficaz a los humanos (Kelly *et al.*, 2017).

Otras investigaciones sugieren que la microbiota intestinal de los flebótomos es esencial para el desarrollo y supervivencia de *Leishmania* spp. (Louradour *et al.*, 2017), ya que la eliminación de bacterias mediada por antibióticos del intestino medio de los flebótomos tiene un impacto negativo en la replicación y desarrollo de la forma metacíclica infecciosa de *Leishmania* spp. (Kelly *et al.*, 2017).

En flebótomos se han encontrado varios géneros de bacterias entre Gram negativos y Gram positivos, de los que podemos mencionar: *Acinetobacter*, *Asaia*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Brevibacterium*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Lysinibacillus*, *Lysobacter*, *Micobacterium*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Paenibacillus*, *Pseudocitrobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Shinella*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*, *Solibacillus* y *Wolbachia*; la mayoría dentro de la familia de las Enterobacteriaceae (Oliveira *et al.*, 2000; Vivero *et al.*, 2016; Monteiro *et al.*, 2016; Kelly *et al.*, 2017).

En la mayoría de los casos, los insectos viven en armonía con su microbiota residente; sin embargo, esta coexistencia pacífica es el resultado de un complejo equilibrio entre la adaptación y el rechazo. La composición de la microbiota intestinal de los flebótomos es dinámica, varía en las distintas etapas de su desarrollo y está influenciada por el entorno y las fuentes alimenticias (Hassan *et al.*, 2014), pero no sólo responde al tipo de comida que ingieren, sino también a la ausencia o presencia de infección por especies de *Leishmania* (Kelly *et al.*, 2017).

Es importante mencionar que, aunque la diversidad bacteriana disminuye después de la ingesta de sangre por parte de los flebótomos, el número de bacterias aumenta (Kelly *et al.*, 2017). Estos hallazgos proporcionan nuevos datos sobre la dinámica de la microbiota en el intestino del flebótomo, donde la nutrición podría afectar la composición del microbioma y en consecuencia, el desarrollo y susceptibilidad a *Leishmania* spp. (Tabbabi *et al.*, 2022).

Factores ambientales como la temperatura, precipitación, humedad y sustancias tóxicas inorgánicas; la distribución geográfica y las interacciones con organismos endosimbiontes también pueden influir en la diversidad y composición de la microbiota intestinal en las poblaciones de flebótomos (Vivero *et al.*, 2021; Kelly *et al.*, 2017).

5. El papel de *Wolbachia* en los insectos

Wolbachia es una alphaproteobacteria que pertenece a la familia Anaplasmataceae dentro del orden de los Rickettsiales, el único miembro conocido dentro de su género es *Wolbachia pipiens* (Kaur *et al.*, 2021). Es el endosimbionte más prevalente en el mundo animal y está presente en el 40% de los artrópodos terrestres, por lo que se estima que son las bacterias intracelulares más abundantes en los artrópodos (Da Rocha *et al.*, 2018; Zug & Hammerstein, 2012).

Filogenéticamente *Wolbachia* se subdivide en al menos 17 supergrupos filogenéticos nombrados con las letras A-F, H-Q y S (Figura 4). La gran mayoría de las secuencias del genoma identificadas pertenecen a cepas de los supergrupos A y B y algunos supergrupos están representados por una sola cepa (Kaur *et al.*, 2021).

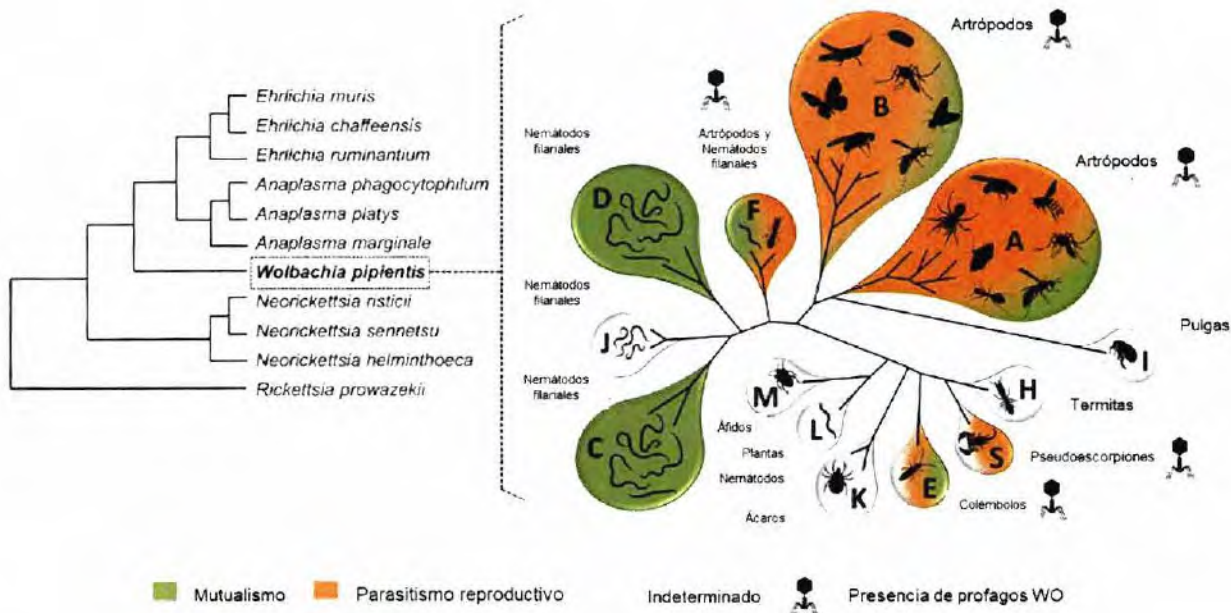


Figura 4. Filogenia y evolución de *Wolbachia* (Kaur et al., 2021).

Wolbachia puede transmitirse a sus huéspedes de manera vertical a través de la madre, pero también de forma horizontal como ocurre en el laboratorio o a través del canibalismo, la depredación, parasitismo, introgresión híbrida y nichos ecológicos compartidos; por esta razón, se ha utilizado como una alternativa en el control de enfermedades transmitidas por vectores (Kaur et al., 2021).

Algunas cepas de *Wolbachia* pueden interferir en la transmisión de patógenos (Ye et al., 2015), reducir significativamente la longevidad de los vectores (McMeniman et al., 2009) e inhibir la replicación de patógenos en algunas especies de vectores (Moreira et al., 2009).

Para que *Wolbachia* se establezca en las especies hospedadoras debe ser adquirida horizontalmente, la infección debe mantenerse y transmitirse

verticalmente. En los flebótomos la transmisión de *Wolbachia* se da de manera horizontal, lo que puede atribuirse a los hábitos alimenticios de las larvas (Hughes *et al.*, 2014).

Wolbachia es capaz de sobrevivir extracelularmente hasta una semana sin disminución de la viabilidad, lo que permite su posible transferencia a través de las células (Rasgon *et al.*, 2006).

Después de que la bacteria ha entrado en el hospedero, debe evitar la respuesta inmune, competir con la microbiota presente en el hospedero e infectar la línea germinal para ser transferida verticalmente a las generaciones posteriores (Hughes & Rasgon, 2014).

Wolbachia es un parásito reproductivo facultativo en los artrópodos e invade a su huésped mediante manipulaciones reproductivas que incluyen la mortalidad de machos, la feminización, inducción de partenogénesis y la incompatibilidad citoplasmática (Zug & Hammerstein, 2012).

La incompatibilidad citoplasmática es la más frecuente, puede darse de forma unidireccional y bidireccional (Shropshire *et al.*, 2020). Cuando es unidireccional, ocurre en los machos infectados que se aparean con hembras no infectadas, dando como resultado una alta tasa de mortalidad en la descendencia; mientras que la incompatibilidad bidireccional da como resultado la muerte embrionaria entre machos y hembras que albergan cepas de *Wolbachia* recíprocamente incompatibles (Zug & Hammerstein, 2012).

En la mortalidad de machos, *Wolbachia* mata selectivamente a los machos infectados en desarrollo; dando como resultado un número sesgado de hembras en los huéspedes artrópodos (Hurst *et al.*, 1999). La feminización se da cuando los machos genéticos se desarrollan morfológicamente en hembras (Rigaud *et al.*, 1991).

La feminización y la mortalidad de machos reducen la capacidad del huésped para eliminar la infección por *Wolbachia*, y en consecuencia, se da una disminución de la respuesta inmunológica. Se han identificado alelos supresores del huésped que confieren resistencia a la *Wolbachia* cuando feminiza y mata a los machos (Hornett *et al.*, 2006). Mientras que, en la partenogénesis inducida, las poblaciones infectadas no cuentan con machos y las hembras dependen de la bacteria para la reproducción asexual. La partenogénesis inducida se da en organismos haplodiploides (Zug & Hammerstein, 2015).

6. Los endosimbiontes como control biológico de insectos vectores

En la actualidad existen varias alternativas de control biológico de insectos vectores que incluyen avances en la genómica de insectos, el uso de la microbiota (que consiste en usar taxones bacterianos que demostraron tener impactos fisiológicos en el huésped o mostrar efectos antivectoriales y antipatógenos) y tecnologías de transformación o modificación genética con genes que bloquean el desarrollo de los patógenos (Tabbabi *et al.*, 2022). Otra estrategia consiste en suprimir las poblaciones de insectos liberando machos estériles o portadores de

genes letales dominantes al medio ambiente (Vivero *et al.*, 2019a; Kelly *et al.*, 2017).

El primer paso en la paratransgénesis es la identificación de las bacterias en el vector. Para que una bacteria sea considerada como candidata para la paratransgénesis debe ser un organismo no patógeno para humanos y animales no objetivos, ser predominante dentro de la microbiota asociada al vector, cultivable en medios libres de células, maleable a la transformación con DNA extraño y presentar una amplia distribución (Karimian *et al.*, 2019).

Wolbachia es usada ampliamente en la paratransgénesis ya que puede ser utilizada para suprimir indirectamente la incidencia de enfermedades transmitidas por vectores, controlando las poblaciones de insectos y su capacidad vectorial, a través de la liberación de machos infectados que son incompatibles con las hembras. La invasión de una cepa de *Wolbachia* produce efectos deletéreos y una cepa que bloquea directamente la transmisión de la enfermedad (Vivero *et al.*, 2019a; Bourtzis *et al.*, 2014).

Se ha demostrado que *Wolbachia* es un potente activador de la inmunidad innata en insectos y que es capaz de determinar la regulación positiva de efectores inmunes como péptidos antimicrobianos, proteínas relacionadas con la autofagia y especies reactivas del oxígeno (ROS); y que su proteína de superficie (WSP) activa macrófagos mediante la estimulación de receptores de inmunidad innata, activando la inmunidad mediada por células tipo M1 / Th1 (Zug & Hammerstein, 2015).

En aquellas asociaciones en la que se espera una evolución de resistencias, *Wolbachia* debería activar el sistema inmunitario del huésped y apuntar a la eliminación de bacterias sin importar que sean nuevas o nativas (Zug & Hammerstein, 2012).

Se ha demostrado que el endosimbionte *Wolbachia* sp. bloquea la transmisión del virus Dengue y Chikungunya en mosquitos *Aedes aegypti* y la transmisión del parásito *Plasmodium*, causante de la malaria y transmitido por mosquitos del género *Anopheles* (Moreira *et al.*, 2009). Existe evidencia de que las bacterias tienen un impacto importante en diferentes aspectos de los rasgos de la historia de vida de estos insectos, comenzando con las primeras etapas de desarrollo (Peterkova-Koci *et al.*, 2012).

En flebótomos, se han reportado algunas especies de bacterias como candidatas para un enfoque paratransgénico para bloquear la transmisión de *Leishmania* en vectores, incluidos *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Brevibacterium linens* y *Enterobacter cloacae* (Karimian *et al.*, 2019; Tabbabi *et al.*, 2022).

Larvas de *Lutzomyia intermedia* y *Lutzomyia longipalpis* alimentadas con heces de conejos presentan un mejor desarrollo (Wermelinger & Zanuncio, 2001). Los estadios inmaduros de *Lutzomyia longipalpis* alimentados con heces de conejo tienen mayor probabilidad de poner huevos, mientras que los que se alimentan con heces estériles, presentan un retraso en la eclosión de sus huevos y menores tasas de supervivencia. Esto demuestra la importancia de la presencia

de bacterias para el desarrollo de los insectos, lo que podría revelar posibles candidatos para ser explorados como control biológico para el manejo de las población de flebótomos (Perterkova-Koci *et al.*, 2012).

Serratia marcescens, un bacilo Gram negativo patógeno perteneciente a la familia enterobacteriaceae, induce la lisis de la membrana celular de *Leishmania chagasi* y *Leishmania braziliensis* (Moraes *et al.*, 2008) y disminuye la colonización con *Leishmania mexicana*, a través de la generación de ROS, asimismo la presencia del parásito disminuye en los flebótomos la mortalidad inducida por la bacteria (Sant'anna *et al.*, 2014). Por otra parte, *Asaia* sp., *Pseudozyma* sp. y *Ochrobactrum intermedium* reducen las tasas de infección con *Leishmania mexicana* (Sant'anna *et al.*, 2014). Mientras que *Lysinibacillus*, *Serratia* y *Pseudocitrobacter* causan la muerte de los parásitos dentro del intestino medio del insecto vector (Campolina *et al.*, 2020).

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestreo

Los flebotomos analizados en este estudio fueron obtenidos de las colectas de campo realizadas por el proyecto: "Estudio comparativo del ciclo de transmisión y de la infección en humanos de los virus de Madariaga y del virus de la encefalitis equina venezolana en Panamá y Perú- (FID16-201)", financiado por la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT) y ejecutado por el Departamento de Investigación en Entomología Médica (DIEM) del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES).

1.1. Descripción de los sitios de colecta

Los flebotomos se colectaron en cuatro (4) sitios de muestreo localizados en la comunidad de Aruza (N8°21'10.3'' W77°55'57.2''), poblado rural ubicado en el corregimiento de Río Iglesias, provincia de Darién (Figura 5). Esta comunidad se encuentra delimitada por la Reserva Hidrológica Filo del Tallo, está compuesta por una población estimada de 200 habitantes, dedicados principalmente a la ganadería, el cultivo de maíz y arroz. El clima predominante en la región es tropical húmedo y la temperatura varía entre los 17°C y 35°C.

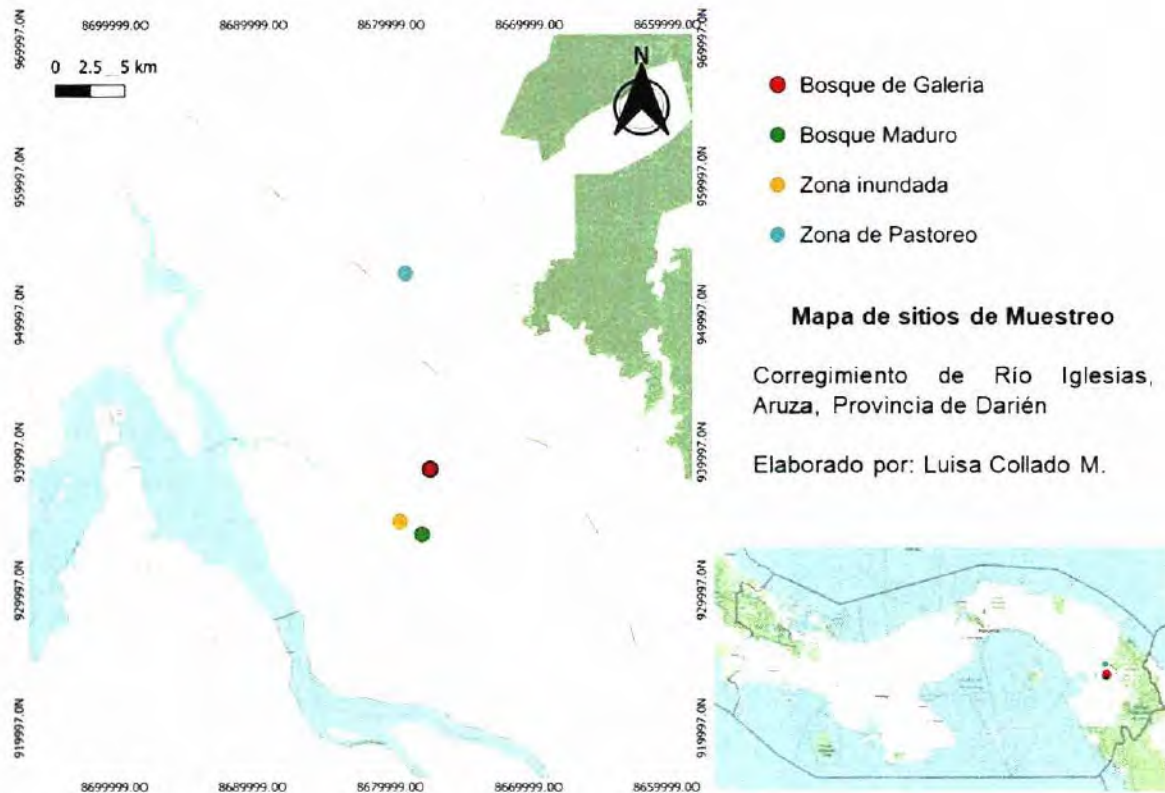


Figura 5. Ubicación geográfica del área de muestreo

A continuación, se detallan las características de los sitios de muestreo:

- a. Bosque maduro (BM) ($N8^{\circ}21' 39.3229'' W77^{\circ} 57' 12.3918''$): constituido por un bosque secundario de 10.000 m².
- b. Bosque de galería (BG) ($N8^{\circ}24' 09.5800'' W77^{\circ} 56' 53.5826''$): pequeño bosque de galería, rodeado de potrero con pasto mejorado.
- c. Zona inundada (ZI) ($N8^{\circ}22' 08.7877'' W77^{\circ} 58' 04.4097''$): zona de canales inundados alimentados por el Humedal Laguna de Matusagaratí que cuenta con una superficie de 25 mil hectáreas. Es el humedal más grande de Panamá y uno de los cinco más importantes de Centroamérica.

- d. Zona de pastoreo (ZP) ($N8^{\circ}31' 44.5800''$ $W77^{\circ} 57' 52.9200''$): es un área con disponibilidad de pasto mejorado para alimentación de ganado bovino y equino (Figura 6).



Figura 6. Características de la vegetación de la comunidad de Aruza (a. Zona de pastoreo, b y c. Bosque de galería, d. Bosque Maduro). Fotos por: Eddier Rivera.

1.2. Método de captura

Para la captura de flebotomos se utilizaron trampas de luz UV LED CDC Light Trap, (BioQuip, Estados Unidos) (Sudia & Chamberlain, 1962) (Figura 7). Se colocaron diez (10) trampas separadas por un mínimo de 25 metros en cada sitio de muestreo y se ubicaron a una altura de entre uno (1) a dos (2) metros en la vegetación, durante 12 horas consecutivas de 18:00 a 6:00. Cada recipiente de colecta de estas trampas fueron rotulados con una codificación dependiendo de la localidad, sitio de colecta y fecha de muestreo.



Figura 7. Trampa de Luz tipo CDC, utilizada para la captura de flebotomos. Foto por: Luisa Collado

Las trampas de luz tipo CDC funcionan con una batería de 6V/ 10 amp, cuentan además con un ventilador que aspira los flebótomos que son atraídos por la luz desde la parte superior y se mantienen en una cámara de recogida en la parte inferior (Figura 7), a cada una de las trampas se les colocó un algodón impregnado de octanol para optimizar la captura.

1.3. Temporalidad del muestreo

Los muestreos fueron realizados en los meses de octubre 2018 y junio-julio 2019, durante diez (10) días consecutivos.

2. Procesamiento de muestras

2.1. Preparación de la muestra

Los flebótomos se colocaron individualmente en crioviales de 1.5mL con 200µL DNA/RNA Shield™ (Zymo Research, Estados Unidos) y fueron colocados en un tanque de nitrógeno líquido para su transporte hasta los laboratorios de óptica del Departamento de Investigaciones en Entomología Médica (DIEM) del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES).

Una vez en el laboratorio, los flebótomos se pasaron por una batería de esterilización que consiste en colocar los individuos: 10 segundos en etanol al

70%, 1 minuto en hipoclorito de sodio 1% y 1 minuto en tampón fosfato salino (PBS) (Lacey & Brooks, 1997).

Posteriormente, las hembras de flebótomos se clasificaron según su condición fisiológica en: ingurgitadas, no ingurgitadas, grávidas, no grávidas, longevas, juveniles y en depleción; los machos se descartaron para el estudio.

2.1. Identificación taxonómica

Los individuos fueron disectados entre el cuarto y sexto segmento abdominal con ayuda de una jeringa y pinzas entomológicas estériles, se colocaron en un portaobjetos al que previamente se le añadió una gota de solución de montaje (Hoyer) y una pequeña gota de mercurio cromo (para teñir la genitalia); por último, se les colocó un cubreobjetos y las placas se llevaron al horno a 40°C por 24 horas. La parte restante del cuerpo se guardó a -80°C, hasta su posterior procesamiento.

Luego de transcurridas las 24 horas en el horno, las placas fueron observadas en un microscopio óptico (Nikon, Eclipse E100, Japón) y mediante sus características morfológicas (genitalia, antena y cibarium), y se identificaron hasta especie utilizando las claves taxonómicas de Young & Duncan (1994).

2.2. Aislamiento de DNA

El DNA de los flebotomos fue aislado utilizando el kit de extracción SR Viral DNA/RNA Kit™ (Zymo Research, Estados Unidos) conforme a las instrucciones especificadas por el fabricante, excepto por una pequeña modificación: se agregaron 200µL de buffer Viral DNA/RNA (Zymo Research, Estados Unidos) y una perla de tungsteno, al tubo que contenía los flebotomos para facilitar la homogeneización en un lisador de tejidos (TissueLyser II™ de QIAGEN, Alemania) durante 10 minutos a 20HZ. Una vez homogeneizada la muestra se centrifugó a máxima velocidad (14000 rpm) durante 15 minutos.

La calidad y concentración del DNA aislado se evaluó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000c (ThermoFisher Scientific, Estados Unidos). Finalmente, las muestras debidamente rotuladas se almacenaron a -80 °C.

2.3. Amplificación por PCR

La mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se preparó con PCR Master Mix 2x (Promega, Estados Unidos), siguiendo las especificaciones del fabricante. Los procesos de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Veriti™ (Applied Biosystems™, Estados Unidos).

2.3.1 *Leishmania* ITS-1

Con el objetivo de identificar la presencia de *Leishmania* en los flebotomos se amplifica la región parcial del espaciador interno transcrito (ITS-1); una región no

codificante situada en el SSUrRNA, delimitada por los genes 18S y 5.8S, utilizando los cebadores LITSR y L5.8S (Kuhls *et al.*, 2005), cuyas secuencias se detallan en el cuadro 1. El protocolo de ciclo térmico consistió en un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, 33 ciclos sucesivos de desnaturalización a 95°C durante 20 segundos, una hibridación a 53°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 1 minuto, así como un ciclo de extensión final a 72°C durante 6 minutos (Schönian *et al.*, 2003).

2.3.2 *Wolbachia* 16S

Con la finalidad de detectar la presencia del endosimbionte *Wolbachia* se amplifica la región completa del 16S, utilizando los cebadores W-Specf y W-Specr (Cuadro 1) propuestos por (Werren & Windsor, 2000). El protocolo de ciclo térmico se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos, 37 ciclos consecutivos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, una hibridación a 55°C durante 45 segundos y una extensión 72°C durante 1 minuto 30 segundos y un ciclo de extensión final de 72°C durante 6 minutos (Azpurua *et al.*, 2010).

2.3.3 16S bacteriano

Para la detección de DNA de bacterias endosimbiontes se amplificó la región 16S ARNr, utilizando los cebadores 27F y 1492R (Cuadro 1), propuestos por Weisburg *et al.*, (1991). El protocolo de ciclo térmico consistió en un ciclo inicial

de desnaturalización a 95°C durante 2 minutos, 30 ciclos consecutivos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, una hibridación a 52°C durante 30 segundos, una extensión a 72°C durante 90 segundos y un ciclo de extensión final a 72°C durante 5 minutos (Weisburg et al., 1991).

Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados para la identificar la presencia de *Leishmania* spp., *Wolbachia* y otras bacterias endosimbiontes en flebótomos.

Código	Secuencia	Sitios identificados	Tamaño del producto (pb)	Referencias
LITSR	5' CTGGATCATTTCGGATG 3'	ITS-1	300-350 pb	Kuhls <i>et al.</i> , 2005
L5.8S	5' TGATACCACTTATCGCACTT 3'	ITS-1	300-350 pb	Kuhls <i>et al.</i> , 2005
W-Specf	5' CATACTATTCGAAGGGATAG 3'	16S	438 pb	Werren & Windsor, 2000
W-Specr	5' AGCTTCGAGTGAAACCAATTC 3'	16S	438 pb	Werren & Windsor, 2000
27F	5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3'	16S ARNr	1500 pb	Weisburg <i>et al.</i> , 1991
1492R	5' GGTTACCTGTTACGACTT 3'	16S ARNr	1500pb	Weisburg <i>et al.</i> , 1991

2.4 Visualización de los productos de PCR

La calidad e integridad de los productos PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa (AMRESCO, Estados Unidos), preparado al 1.5% y teñido con Gelred™ (Biotium, Estados Unidos). Los geles se observaron y fotografiaron en un transiluminador de luz ultravioleta (UVP BioDoc-It System, ThermoFisher Scientific, Estados Unidos). Las muestras amplificadas mediante PCR, se almacenaron a -20°C.

2.5 Reamplificación de los productos de PCR

Los productos de PCR amplificados mediante el gen ITS-1 de *Leishmania* spp., fueron reamplificados en una reacción de PCR de 50 µL para obtener una mayor calidad y concentración de DNA para secuenciación.

2.6 Purificación del producto de PCR

La purificación de los productos de PCR de las muestras en las que fueron visualizadas bandas únicas se realizó utilizando el kit de purificación de QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Alemania), mientras que los productos de PCR en los que se visualizaron más de una banda se purificaron utilizando el kit de purificación QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Alemania); en ambos casos se siguieron las especificaciones dadas por el fabricante.

2.7. Secuenciación Sanger

Las reacciones de secuenciación de las muestras que presentaron DNA de *Leishmania* spp. al ser analizadas por el gen ITS-1 se realizaron a partir de los productos de PCR, empleando los oligonucleótidos LITSR y L5.8S (Eurofins Genomics, Alemania) (Cuadro 1) y el BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™, Estados Unidos), siguiendo las especificaciones del fabricante. Los procesos de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Veriti™ (Applied Biosystems™, Estados Unidos). El protocolo de ciclo térmico se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización inicial

a 96°C durante 1 minuto, 30 ciclos consecutivos de desnaturalización a 96°C durante 10 segundos, hibridación a 53°C durante 10 segundos y elongación a 60°C durante 4 minutos.

La purificación del plato para secuenciación se realizó mediante el protocolo BigDye® X Terminator™ (Applied Biosystems™, Estados Unidos). La secuenciación directa de las muestras se realizó en un analizador genético ABI 3730XL (Applied Biosystems™, Estados Unidos).

Las reacciones de secuenciación de las muestras que tuvieron presencia de DNA bacteriano al ser analizadas con el gen 16S bacteriano se realizaron a partir de los productos de PCR, empleando los oligonucleótidos 27F y 1492R (Eurofins Genomics, Alemania) (Cuadro 1). Los ciclos y temperaturas aplicados sobre las muestras fueron ejecutados por la compañía MacroGen (Korea, <http://foreign.macrogen.co.kr/>) y la secuenciación directa de las muestras se realizó en un analizador genético ABI 3730XL (Applied Biosystems™, Estados Unidos).

2.8. Análisis de resultados

La riqueza de especies de *Lutzomyia* se determinó en base al número de individuos de cada especie colectada y la abundancia relativa se obtuvo al dividir el número de individuos colectados de cada especie entre el número total de individuos capturados.



Se realizó una inferencia estadística de la varianza no paramétrica de Kruskal-Wallis para determinar si existen diferencias significativas entre el número de especies capturadas en cada uno de los sitios muestreados y para determinar si existen diferencias significativas en la proporción de *Leishmania* spp., *Wolbachia* sp. y otras bacterias encontradas en las especies de flebótomos capturados.

Para determinar si existen diferencias significativas entre las distintas especies de bacterias encontradas en los flebótomos, se realizó una inferencia estadística de la varianza no paramétrica de Kruskal-Wallis. Todos los análisis fueron desarrollados con el Software IBM SPSS Statistics.

Los cromatogramas generados fueron visualizados y analizados con el software CodonCode Aligner 10.0 (CodonCode Corporation, Estados Unidos). La información obtenida en formato ABI se transformó a formato FASTA para el análisis pertinente. La autenticidad de las secuencias fue corroborada a través del programa BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) considerando un porcentaje de identidad mayor al 95%. Las secuencias se alinearon con el software MEGA 11.0 (Tamura *et al.*, 2021) y se generaron dendogramas por los métodos de máxima verosimilitud y máxima parsimonia para determinar el parentesco entre los diferentes grupos.

Cuando se realizó el análisis de las secuencias generadas a partir del gen ITS-1 se observaron algunas secuencias con ambigüedades, probablemente por la presencia de dos especies de *Leishmania*. Para distinguir entre ambas especies, se analizaron las secuencias como si fueran individuos diploides y se separaron

realizando un análisis de algoritmo, utilizando el software DNA Sequence Polymorphism (DnaSP) (Rozas *et al.*, 2017). Por lo tanto, de las catorce secuencias analizadas obtuvimos en total veintiocho que para distinguirlas se identificaron como 1 y 0.

CAPÍTULO III RESULTADOS

1. Riqueza y abundancia de flebótomos capturados en distintos ambientes ecológicos de la comunidad de Aruza, provincia de Darién

Se colectaron un total de 918 individuos de flebótomos en los cuatro sitios de muestro ubicados en la comunidad de Aruza, provincia de Darién. Representados en 21 especies del género *Lutzomyia* y 2 especies del género *Brumptomyia*. Los machos y los individuos del género *Brumptomyia* fueron descartados para este estudio y solo se tomaron en cuenta para los análisis 552 individuos correspondientes a las 21 especies del género *Lutzomyia*.

Dentro de las 21 especies capturadas se incluye a *Lutzomyia gomezi*, *Lutzomyia panamensis*, *Lutzomyia sanguinaria* y *Lutzomyia trapidoi*; especies antropofílicas que han sido incriminadas como vectores de la leishmaniasis en Panamá.

Las especies más abundantes fueron *Lutzomyia panamensis* (190 = 34.42%) y *Lutzomyia dysponeta* (138 = 25%), el resto de las especies capturadas representan menos del 10% del total de los individuos (Cuadro 2).

El bosque de galería y el bosque maduro fueron los sitios que presentaron mayor riqueza de especies con 50.5% y 41.8%, respectivamente. En la zona

inundada y la zona de pastoreo la riqueza de especies corresponde a menos del 5% (Cuadro 2).

Cuadro 2. Riqueza y abundancia relativa de flebótomos capturados en Aruza, Provincia de Darién, Panamá

Especie	Sitio de Muestreo				N	Abundancia relativa
	BM	BG	ZI	ZP		
<i>Lutzomyia ayrosai</i>	0	0	1	0	1	0.002
<i>Lutzomyia camposi</i>	16	11	1	0	28	0.051
<i>Lutzomyia carpenteri</i>	17	11	2	5	35	0.063
<i>Lutzomyia carrerai thula</i>	6	10	0	0	16	0.029
<i>Lutzomyia cayannensis</i>	2	0	1	0	3	0.005
<i>Lutzomyia cruciata</i>	2	0	2	1	5	0.009
<i>Lutzomyia dysponeta</i>	59	64	9	6	138	0.250
<i>Lutzomyia gomezi</i>	9	9	0	2	20	0.036
<i>Lutzomyia hartmani</i>	1	0	0	0	1	0.002
<i>Lutzomyia hirsuta nicaraguensis</i>	10	17	1	4	32	0.058
<i>Lutzomyia nordestina</i>	1	4	0	0	5	0.009
<i>Lutzomyia odax</i>	1	1	0	0	2	0.004
<i>Lutzomyia olmeca bicolor</i>	3	1	0	1	5	0.009
<i>Lutzomyia ovallesi</i>	0	2	0	0	2	0.004
<i>Lutzomyia panamesis</i>	71	114	0	5	190	0.344
<i>Lutzomyia runoides</i>	4	0	0	0	4	0.007
<i>Lutzomyia sanguinaria</i>	0	1	0	0	1	0.002
<i>Lutzomyia sp.</i>	3	13	0	0	16	0.029
<i>Lutzomyia trapidoi</i>	2	0	0	0	2	0.004
<i>Lutzomyia trinidadensis</i>	1	4	1	0	6	0.011
<i>Lutzomyia triramula</i>	23	17	0	0	40	0.072
Total	231	279	18	24	552	1.000

Abreviaturas: BM-bosque maduro, BG-bosque de galería, ZI-zona inundada, ZP-zona de pastoreo.

La inferencia estadística de la varianza no paramétrica de Kruskal-Wallis muestra que la distribución de las especies de *Lutzomyia sp.* varía entre los sitios

de muestreo ($p=0.001$, $p < 0.05$), el valor de H para 3 grados de libertad fue de $H=16.800$.

2. Proporción de *Leishmania* spp., *Wolbachia* sp. y otras bacterias en flebótomos capturados en la comunidad de Aruza, provincia de Darién

Para identificar la presencia de *Leishmania* spp., *Wolbachia* sp. y otras bacterias, se analizaron 552 individuos mediante la técnica de amplificación por PCR de los cuales 57 (10.32%) resultaron positivos para el gen ITS-1 de *Leishmania* spp., 37 (6.70%) para el gen 16S de *Wolbachia* sp. y 299 (54.16%) para el gen 16S bacteriano (Cuadro 3).

Las especies con mayor proporción de infección por distintas especie de *Leishmania*, fueron *Lutzomyia panamensis* (2.53%), *Lutzomyia dysponeta* (1.99%), *Lutzomyia carpenteri* (1.81%) y *Lutzomyia triramula* (1.44%). Mientras que los individuos de *Lutzomyia panamensis* y *Lutzomyia dysponeta*, representaron las especies con mayor proporción de *Wolbachia* sp. y otras bacterias (Cuadro 3).

De los 57 individuos que mostraron estar infectados por *Leishmania* spp. mediante la amplificación por PCR del gen ITS-1, sólo 6 individuos de *Lutzomyia carpenteri*, *Lutzomyia dysponeta*, *Lutzomyia hirsuta nicaraguensis* y *Lutzomyia triramula* fueron también positivos para *Wolbachia* sp. amplificando el gen 16S. Y 18 individuos de *Lutzomyia gomezi*, *Lutzomyia dysponeta*, *Lutzomyia carrerai*

thula, *Lutzomyia triramula*, *Lutzomyia carpenteri*, *Lutzomyia gomezi*, *Lutzomyia panamensis*, *Lutzomyia hirsuta nicaraguensis*, *Lutzomyia ovallesi* y *Lutzomyia camposi* mostraron positividad al amplificar el gen 16S bacteriano.

Cuadro 3. Proporción de *Leishmania* spp., *Wolbachia* sp. y otras bacterias en flebótomos capturados en Aruza, Provincia de Darién, Panamá

Especie	n	Organismo		
		<i>Leishmania</i> spp.	<i>Wolbachia</i> sp.	Otras bacterias
<i>Lutzomyia ayrosai</i>	1	0	0	0
<i>Lutzomyia camposi</i>	28	0.18	0.18	3.07
<i>Lutzomyia carpenteri</i>	35	1.81	0.72	2.53
<i>Lutzomyia carrerai thula</i>	16	0.36	0.18	1.44
<i>Lutzomyia cayannensis</i>	3	0	0.18	0.18
<i>Lutzomyia cruciata</i>	5	0.18	0	0.36
<i>Lutzomyia dysponeta</i>	138	1.99	1.08	13.94
<i>Lutzomyia gomezi</i>	20	0.54	0	2.17
<i>Lutzomyia hartmani</i>	1	0	0	0.18
<i>Lutzomyia hirsuta nicaraguensis</i>	32	0.90	0.72	3.07
<i>Lutzomyia nordestina</i>	5	0	0	0
<i>Lutzomyia odax</i>	2	0.18	0	0
<i>Lutzomyia olmeca bicolor</i>	5	0	0.54	0.72
<i>Lutzomyia ovallesi</i>	2	0.18	0	0.18
<i>Lutzomyia panamensis</i>	190	2.35	1.99	17.57
<i>Lutzomyia runoides</i>	4	0	0	0.72
<i>Lutzomyia sanguinaria</i>	1	0	0	0.18
<i>Lutzomyia</i> sp.	16	0.18	0	2.17
<i>Lutzomyia trapidoi</i>	2	0	0.18	0.36
<i>Lutzomyia trinidadensis</i>	6	0	0.36	0.54
<i>Lutzomyia triramula</i>	40	1.44	0.54	4.71
Total	552	10.32	6.70	54.16

La inferencia estadística de la varianza no paramétrica de Kruskal-Wallis reveló diferencias estadísticamente significativas en las proporciones de microorganismos que se encuentran en cada una de las especies de flebótomos ($p= 0.006$, $p < 0.05$), el valor de H para 2 grados de libertad fue de $H=10.078$.

3. Identificación de las especies de *Leishmania* spp. presentes en los flebótomos capturados en la comunidad de Aruza, provincia de Darién

De las 57 muestras que resultaron positivas para *Leishmania* spp. y fueron analizadas, se obtuvieron 14 secuencias de buena calidad que fueron incluidas en el estudio.

El análisis BLAST de las secuencias ITS-1 sugirió la presencia de *Leishmania braziliensis* en un individuo de *Lutzomyia dysponeta*; *Leishmania guyanensis* se encontró en *Lutzomyia dysponeta*, *Lutzomyia hirsuta nicaraguensis* y *Lutzomyia panamensis*. En *Lutzomyia carrerai thula*, *Lutzomyia dysponeta*, *Lutzomyia hirsuta nicaraguensis* y *Lutzomyia panamensis*, se sugirió la presencia de *Leishmania panamensis*. Mientras que la presencia de *Leishmania* spp. se reportó en poblaciones de *Lutzomyia hirsuta nicaraguensis*, *Lutzomyia odax*, *Lutzomyia ovallesi*, *Lutzomyia panamensis* y *Lutzomyia* sp.

El análisis filogenético fue realizado por el método de máxima verosimilitud, se basó en el modelo de 3 parámetros de Tamura, soportado por un Bootstraps de 500 repeticiones e infiriendo la presencia de varios clados en las muestras analizadas. Se pudo observar que la mayoría de las *Leishmania* spp. se agrupan en la parte superior del árbol estando relacionadas unas con otras. En la parte inferior del árbol podemos observar otro clado que agrupa otras *Leishmania* spp. que probablemente estén más relacionadas con *Leishmania guyanensis* y *Leishmania braziliensis*.

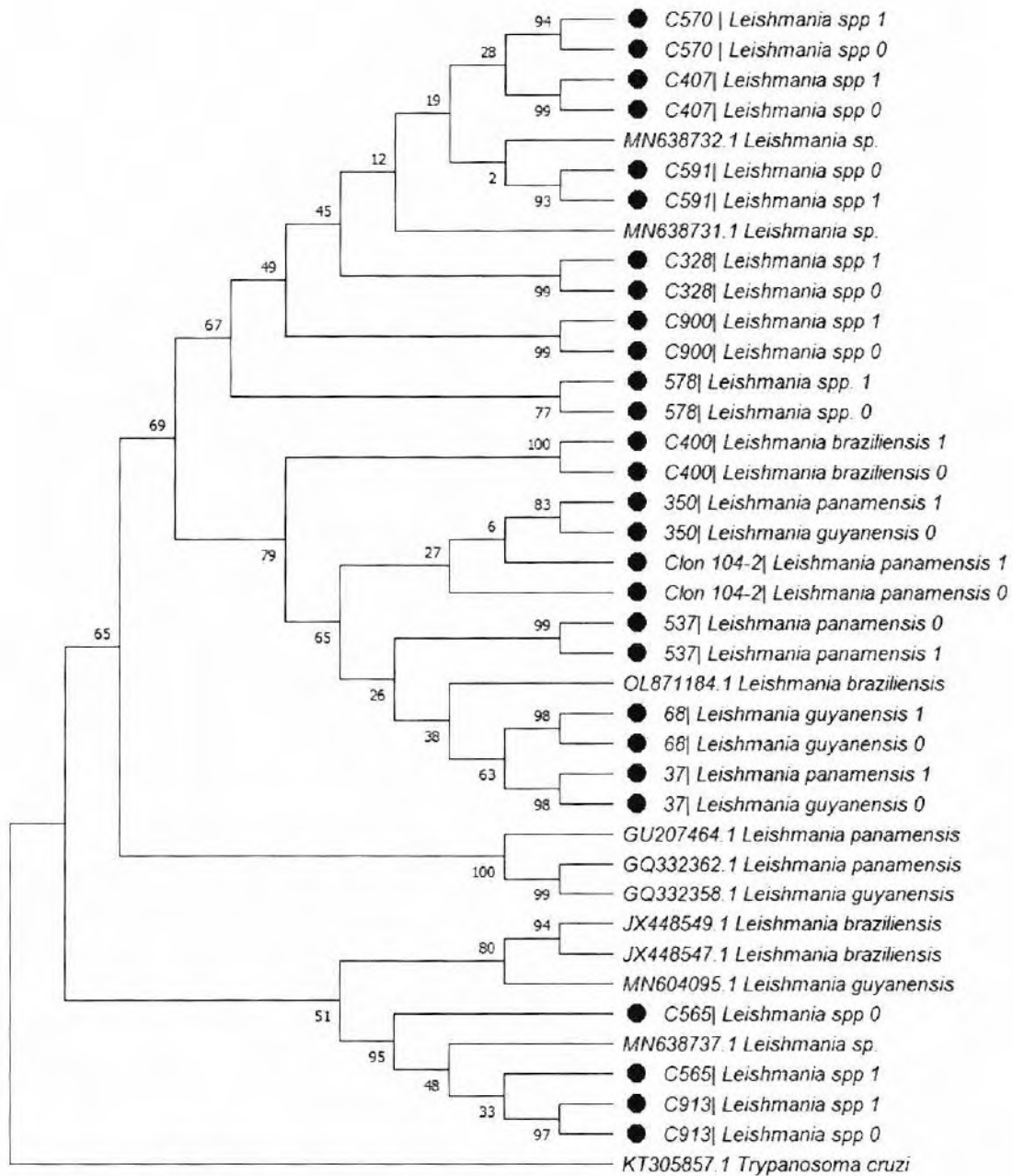


Figura 8. Análisis filogenético realizado por el método de Máxima Verosimilitud para inferir la relación filogenética de las especies de *Leishmania* presentes en los flebótomos capturados en la comunidad de Aruza, provincia de Darién.

4. Caracterización de la microbiota presente en flebótomos capturados en la comunidad de Aruza, provincia de Darién

De las 299 muestras que resultaron positivas para bacterias endosimbiontes se analizaron 200 muestras y se obtuvieron 71 secuencias de buena calidad que fueron incluidas en el estudio.

La composición microbiana estaba constituida por los filos Proteobacteria (59.87%), Bacillota (24.69%), Firmicutes (11.11%), Actinobacteria y Pseudomonadota (1.23%), Actinomycetota, Bacteroides y Nitrospirota (0.61%).

Se obtuvieron 22 géneros y 39 especies bacterianas distribuidas en 18 familias en 14 de las 21 especies de flebótomos analizadas (Figura 9).

Lutzomyia panamensis presentó la mayor riqueza bacteriana albergando 19 especies, *Lutzomyia dysponeta* y *Lutzomyia triramula* albergaron 13 y 9 especies de bacterias, respectivamente (Figura 9).

La especie bacteriana más abundante fue *Paracoccus* sp. (41.25%) y estuvo presente en 10 especies de flebótomos. *Staphylococcus* sp. (9.37%) y *Paracoccus marcusii* (8.43%) se encontraron en 7 especies (Figura 9).

Solo *Wolbachia* sp., *Bacillus safensis*, *Paracoccus* sp., *Paracoccus marcusii* y *Sporosarcina* sp. estuvieron presentes en los individuos infectados por *Leishmania* spp.

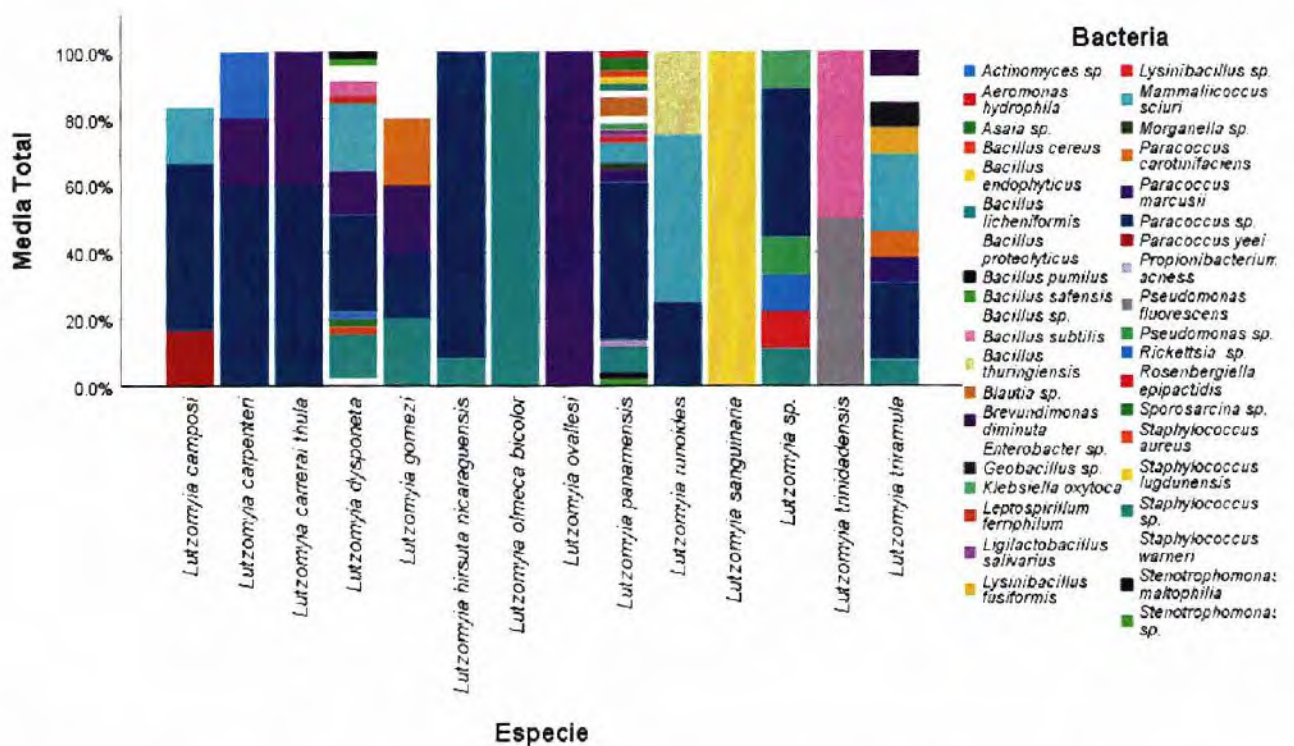


Figura 9. Riqueza de la microbiota en flebótomos capturados en Aruza, provincia de Darién, Panamá.

Bacillus sp. fue compartida por *Lutzomyia camposi*, *Lutzomyia dysponeta*, *Lutzomyia panamensis*; *Bacillus subtilis* estuvo presente en *Lutzomyia dysponeta* y *Lutzomyia trinidadensis*. *Enterobacter* sp. se encontró en *Lutzomyia panamensis* y *Lutzomyia triramula*. *Mammaliicoccus sciuri* se halló en *Lutzomyia camposi*, *Lutzomyia dysponeta*, *Lutzomyia panamensis*, *Lutzomyia runoides* y *Lutzomyia triramula*. *Paracoccus carotinifaciens* fue compartida por *Lutzomyia gomezi* y *Lutzomyia triramula*, *Paracoccus marcusii* estuvo presente en *Lutzomyia carpenteri*, *Lutzomyia carrerai thula*, *Lutzomyia dysponeta*, *Lutzomyia gomezi*, *Lutzomyia ovallesi*, *Lutzomyia panamensis*, *Lutzomyia triramula*. *Paracoccus* sp.

fue identificada en *Lutzomyia camposi*, *Lutzomyia carpenteri*, *Lutzomyia carrerai thula*, *Lutzomyia dysponeta*, *Lutzomyia gomezi*, *Lutzomyia hirsuta nicaraguensis*, *Lutzomyia panamensis*, *Lutzomyia runoides*, *Lutzomyia triramula*. *Staphylococcus sp.* estuvo presente en *Lutzomyia dysponeta*, *Lutzomyia gomezi*, *Lutzomyia hirsuta nicaraguensis*, *Lutzomyia olmeca bicolor*, *Lutzomyia panamensis*, *Lutzomyia sp.* y *Lutzomyia triramula*.

Como se mencionó anteriormente *Paracoccus sp.* fue la especie bacteriana más abundante en las poblaciones de flebótomos analizados. Por lo tanto, se realizó un análisis filogenético por el método de máxima parsimonia para dilucidar el parentesco entre los distintos individuos de *Paracoccus sp.* El árbol se obtuvo utilizando el algoritmo subárbol-poda-reinjerto (SPR), infiriendo la presencia de varios clados relacionados con la especie *Paracoccus marcusii*. Los resultados revelaron que *Paracoccus marcusii* es la especie bacteriana más prevalente en los flebótomos. Se observan además clados individuales que parecen estar relacionados con otros *Paracoccus* (Figura 10).

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

Las relaciones simbióticas intracelulares entre los microorganismos toma importancia en la actualidad para determinar moduladores claves de los diversos estilos de vida (tanto en términos de dieta como de nichos ecológicos) de su huésped (Gupta & Nair 2020), pero también el efecto que puedan tener en la transmisión de patógenos por aquellas especies de importancia médica, agrícola o veterinaria. En relación con este tema, las especies de flebótomos de América han sido poco estudiadas, en la actualidad solo se ha analizado la microbiota de *Lutzomyia longipalpis* (Sant'anna *et al.*, 2012; Mc Carthy *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2000), *Lutzomyia cruzi* (Sant' Anna *et al.*, 2012), *Lutzomyia neivai* (Machado *et al.*, 2014), *Lutzomyia evansi* (Vivero *et al.*, 2016), *Lutzomyia intermedia* (Monteiro *et al.*, 2016), *Lutzomyia ayacuchensis* (Tabbabi *et al.*, 2020) y *Lutzomyia evansi* (Vivero *et al.*, 2021) debido a su importancia en la transmisión de leishmaniasis cutánea o visceral. Considerando la poca información referente a otras especies de flebótomos que también tienen importancia médica, hemos realizado el análisis del contenido intestinal de 21 especies de flebótomos reportados para Panamá, donde las especies más abundantes fueron *Lutzomyia dysponeta* y *Lutzomyia panamensis*.

Estas especies identificadas se capturaron en su mayoría en sitios de vegetación correspondiente a los bosques maduros y bosque de galería donde también se registró la mayor abundancia, que en su efecto está relacionado con la composición del suelo, disponibilidad de fuentes alimenticias, sitios de reposo y oviposición, fuera de los factores abióticos que influyen directamente en las tasa de oviposición y la supervivencia de los individuos presentes en estos sitios de muestreo (Alencar *et al.* 2011). La abundancia registrada en estos hábitats resultó ser la esperada, ya que la mayoría de las especies de flebótomos están asociadas con hábitats de estructura vegetativa heterogénea (Rigg *et al.*, 2021; Chagas *et al.*, 2018).

En cuanto a la detección y los valores de proporción de infección por *Leishmania guyanensis*, *Leishmania panamensis* y *Leishmania* spp. en la especie antropofílica *Lutzomyia panamensis*, es importante resaltar el papel que juega esta especie de flebótomo en la transmisión de los diferentes tipos de *Leishmania* y la estrecha asociación con las infecciones clínicas observadas en las consultas médicas de pacientes provenientes de zonas endémicas donde se han reportado estas especies como las más abundantes (Rigg *et al.*, 2019; Valderrama *et al.*, 2008; Christensen y Herrer 1973).

Por otro lado, *Lutzomyia dysponeta* resultó infectada con *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis* y *Leishmania panamensis*. Esta especie era considerada zoofílica, hasta algunos años atrás, por encontrarse presente en los muestreos realizados en los bosques primarios y secundarios (Christensen y

Herrer 1973). Sin embargo, recientemente se ha capturado en ambientes peridomiciliares y domiciliarios e infectada con *Leishmania* spp., lo que representa un factor de riesgo, pero también es un ejemplo de la adaptación y cambios de hábitos de especies zoofílicas a entornos antroponóticos (Rigg *et al.*, 2019).

En *Lutzomyia ovallesi* se reportó la presencia de *Leishmania* spp. y desde muchos años atrás en Panamá esta especie es considerada como un vector potencial, ya que fue encontrada infectada con flagelados no identificados (Christensen *et al.*, 1983).

Lutzomyia hirsuta nicaraguensis se encontró infectada por *Leishmania guyanensis*, *Leishmania panamensis* y *Leishmania* spp. y de esta especie hasta el momento, no hay estudios que la incriminen como vector de la leishmaniasis. Lo mismo sucede con *Lutzomyia carrerai thula* donde se sugirió la presencia de *Leishmania panamensis* y *Lutzomyia odax* que se encontró infectada con *Leishmania* spp.

En el análisis de los endosimbiontes se detectó *Wolbachia* en 9 de las 21 especies evaluadas. Sin embargo, la proporción de infección fue relativamente baja (Cuadro3). En América, se ha detectado *Wolbachia* en distintas especies tales como: *Lutzomyia cruciata*, *Lutzomyia shannoni*, *Lutzomyia vespertilionis*, *Lutzomyia trapidoi*, *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia evansi*, *Lutzomyia intermedio* y *Lutzomyia ayacuchensis* (Tabbabi *et al.*, 2020; Vivero *et al.*, 2019a; Vivero *et al.*, 2017; Kelly *et al.*, 2017; Ono *et al.*, 2001) y nuestros resultados amplían la lista de su presencia en otras especies tales

como: *Lutzomyia camposi*, *Lutzomyia carpenteri*, *Lutzomyia carrerae thula*, *Lutzomyia cayannensis*, *Lutzomyia dysponeta*, *Lutzomyia hirsuta nicaraguensis*, *Lutzomyia olmeca bicolor*, *Lutzomyia panamensis*, *Lutzomyia trinidadensis* y *Lutzomyia triramula*. La detección de *Wolbachia* en este estudio resulta interesante si se quiere ir más allá en el control biológico de especies importantes; sin embargo, como parte de un enfoque paratransgénico, se necesitan más estudios para evaluar su capacidad de colonización en el intestino; ya que, hasta el momento, se desconoce la relación entre *Wolbachia* spp. y los flebótomos (Tabbabi *et al.*, 2020; Monteiro *et al.*, 2016).

En la determinación de la composición del microbioma bacteriano del intestino de los flebótomos, los cebadores utilizados amplificaron un fragmento de aproximadamente 1450 pb, que está cerca de la longitud total del gen del ARNr; lo que proporciona una secuencia casi completa para compararla con las referencias en las bases de datos. Además, nos proporciona información filogenética de comunidades bacterianas que incluyen organismos que aún no han sido cultivados (Hou *et al.*, 2018). La precisión de la clasificación taxonómica presentada en estas secuencias es mucho mayor que las lecturas cortas generadas por métodos de secuenciación de alto rendimiento, como la pirosecuenciación y la secuenciación Illumina (Li *et al.*, 2016). Sin embargo, debido al bajo rendimiento, es posible que el número de secuencias no sea suficiente para proporcionar una estimación completa de la composición microbiana de los flebótomos, por lo que se podría desconocer la presencia de taxones poco abundantes.

Entre los 22 géneros bacterianos identificados en los flebótomos, 7 se detectaron por primera vez *Actinomyces*, *Blautia*, *Leptospirillum*, *Ligilactobacillus*, *Mammaliicoccus*, *Paracoccus* y *Rosenbergiella*. Estos nuevos reportes podrían deberse a la limitada información actualmente disponible sobre la diversidad microbiana en los flebótomos. Además, la diversidad de la comunidad bacteriana intestinal puede estar relacionada con la distribución geográfica de los flebótomos, por lo que cada población geográficamente distinta puede tener estructuras bacterianas diferentes, lo que quiere decir que estos reportes se deben al tipo de hábitats donde viven estos individuos (Maleki-Ravasan *et al.*, 2013).

En ese sentido, nuestros resultados mostraron que la microbiota intestinal de los flebótomos estaba compuesta principalmente por Proteobacteria (59.87%). Estudios previos en los que se han realizado métodos independientes o dependientes del cultivo mostraron que este filo era el predominante (Papadopoulos *et al.*, 2020; Karimian *et al.*, 2019; Fraihi *et al.*, 2017; Sant' Anna *et al.*, 2012). Previo a este estudio, se realizó un análisis sobre la perturbación del hábitat y las comunidades bacterianas en artrópodos hematófagos neotropicales donde se incluyó a las especies *Lutzomyia gomezi*, *Lutzomyia panamensis* y *Lutzomyia trapidoi* y, al igual que nuestros resultados, determinaron que las comunidades bacterianas asociadas a estas tres especies analizadas estaban dominadas por el filo Proteobacteria (Bennett *et al.*, 2019).

Cabe resaltar que se ha demostrado que las bacterias pertenecientes al filo Proteobacteria contribuyen a la nutrición del huésped mediante la fijación de

nitrógeno atmosférico (Gurung *et al.*, 2019). Debido al predominio de varios taxones de proteobacterias en los flebótomos, sugerimos realizar más estudios relacionados a dilucidar el papel que desempeñan y su funcionalidad en la aptitud (fitness) coevolutiva de los microorganismos patógenos y su competencia vectorial.

Si comparamos la diversidad microbiana de los flebótomos analizados con los datos que se han reportado hasta el momento, la mayoría de las bacterias encontradas son comunes en flebótomos tanto del Nuevo Mundo como del Viejo Mundo; de las cuales se destacan *Aeromonas*, *Asaia*, *Bacillus*, *Brevundimonas*, *Enterobacter*, *Geobacillus*, *Klebsiella*, *Sysinibacillus*, *Morganella*, *Propionibacterium*, *Pseudomonas*, *Rickettsia*, *Sporosarcina*, *Staphylococcus* y *Stenotrophomonas* (Karimian *et al.*, 2019; Sant' Anna *et al.*, 2012; McCarthy *et al.*, 2011).

Destacamos nuevamente que los siguientes géneros bacterianos se presentan en alta proporción en la microbiota de los flebótomos analizados en nuestro estudio:

- *Paracoccus* fue el género bacteriano más abundante, no ha sido reportado anteriormente en flebótomos, comprende bacterias metabólicamente versátiles, de vida libre acuáticos, terrestres o en asociación con otros organismos como plantas, humanos e invertebrados, incluidos los insectos (Machado-Ferreira *et al.*, 2012). Actualmente se está estudiando la influencia de *Paracoccus*, junto con

otras bacterias en la capacidad vectorial de las moscas *Glossina pallidipes*, vectores de la enfermedad del sueño (Geiger *et al.*, 2018).

Es importante tener en cuenta que *Paracoccus yeeii* es un patógeno infeccioso para los humanos que no solo está estrechamente relacionado con el grupo de *Paracoccus marcusii* asociado a insectos (Machado-Ferreira *et al.*, 2012), sino que a menudo se detecta en pacientes con heridas en piernas o pies y recientemente fue el causante de un caso de peritonitis (Sastre *et al.*, 2016).

- *Bacillus thuringiensis*, detectado en *Lutzomyia runoides* se ha aislado en diversos hábitats de nuestro planeta desde su descubrimiento en 1901 (Ibrahim *et al.*, 2010). Esta bacteria, cumple diversas funciones en los ecosistemas. Se ha utilizado como promotora del crecimiento vegetal, biorremediación de diferentes metales pesados y contaminantes, biosíntesis de nanopartículas metálicas, producción de biopolímeros (Jouzani *et al.*, 2017). En la agricultura es la bacteria más utilizada por su función como agente de control biológico de plagas y como fuente de genes insecticidas para la construcción de plantas transgénicas resistentes a algunos de las plagas agrícolas y forestales más importantes. Además, es un agente de control biológico eficiente para insectos vectores principalmente mosquitos (De Valtierra *et al.*, 2020). En flebótomos se ha demostrado la susceptibilidad de larvas y adultos a *Bacillus thuringiensis* (Wemelinger *et al.*, 2000; Yuval y Warburg, 1989).

- *Rickettsia*, detectada en *Lutzomyia dysponeta* y *Lutzomyia* sp. es un

género dentro de las α -proteobacteria considerado un parásito reproductivo. Se encontró en una amplia gama de insectos. Algunas de las especies pertenecientes a este género tienen efectos negativos en artrópodos porque se ha reportado letalidad embrionaria, aumento de la susceptibilidad a los insecticidas y reducción de la fecundidad, entre otros (Giorgini *et al.*, 2010). Son varios los estudios en los que se han encontrado agentes rickettsiales en flebótomos. Recientemente se identificó un nuevo linaje a nivel mundial que está presente en flebótomos de México, aunque aún queda por analizar si estas bacterias posiblemente juegan un papel como agentes de control, capaces de reducir las poblaciones de flebótomos (Lozano-Sardaneta *et al.*, 2021).

- *Staphylococcus* tiene una consistencia variable entre huéspedes y está principalmente relacionado con las plantas y la savia, lo que sugiere que se adquieren a través de la alimentación con azúcar (Engel & Moran, 2013).

- El género *Stenotrophomonas*, ha sido encontrado anteriormente en *Lutzomyia longipalpis* y *Phlebotomus duboscqi* (Pires *et al.*, 2017). *Stenotrophomonas maltophilia* es un importante patógeno oportunista que habita en el intestino de la mayoría de las especies de flebótomos estudiadas hasta ahora. Esta especie bacteriana se encuentra fácilmente en hábitats acuosos, rizosfera de plantas, alimentos para animales y fuentes de agua (Brooke, 2012). Por lo tanto, es importante estudiar el origen de la colonización del intestino medio por *Stenotrophomonas maltophilia* y evaluar si cumple algún papel en la biología y fisiología de los flebótomos.

La mayoría de los géneros bacterianos encontrados en los flebótomos incluyen bacterias que están comúnmente asociadas con el suelo, el agua y las plantas; así que pueden adquirirse mediante los hábitos de alimentación de los flebótomos; es decir, el suelo durante la etapa larval y la savia de las plantas durante la fase adulta (Karimian *et al.*, 2019). Es importante mencionar que todas las especies de *Lutzomyia* se desarrollan en el suelo dentro de lugares oscuros y húmedos, con abundante hojarasca o materia orgánica en descomposición como madrigueras y grietas (Vivero *et al.*, 2015). Algunos de los géneros identificados, incluidos *Bacillus*, *Enterobacter* y *Staphylococcus*, también están relacionados con plantas comunes en los entornos donde se desarrollan los flebótomos del género *Phlebotomus* (Karimian *et al.*, 2019)

Se encontraron filos abundantes compartidos en todas las muestras, pero también se observaron muestras con una composición distinta y variable, lo que podría explicarse por la influencia de los distintos microhábitats en los que se desarrollan los flebótomos, el tipo de suelo, el desarrollo de actividades agrícolas, especies de plantas y animales presentes (Vivero *et al.*, 2019b). También podría relacionarse con la morfología intestinal y condiciones fisicoquímicas como el pH, la disponibilidad de oxígeno en el intestino del insecto y el tipo de dieta (Engel & Moran, 2013). Estas condiciones pueden causar variaciones en la microbiota intestinal, que a su vez influye en su estado nutricional, sistema inmunitario y aptitud reproductiva (Aksoy, 2018).

CONCLUSIONES

En este estudio se determinó la coexistencia de *Leishmania* spp., el endosimbionte *Wolbachia* sp. y otras bacterias. Se realizó la detección molecular de las comunidades bacterianas en las especies de flebótomos colectados para proporcionar evidencia científica que nos permita desarrollar nuevas estrategias de intervención para el control de los flebótomos y así romper las barreras de transmisión de la leishmaniasis.

La comunidad de Aruza provincia de Darién, presenta una amplia diversidad de especies de flebótomos del género *Lutzomyia* y se identificaron varias especies que poseen importantes antecedentes vectoriales en diferentes países de Latinoamérica, incluyendo a Panamá.

Se logró detectar infección por *Leishmania* spp. en 12 de las 21 especies de flebótomos analizados. Las especies con mayor proporción de infección por *Leishmania* spp. fueron *Lutzomyia panamensis* y *Lutzomyia dysponeta*.

Aunque la proporción de *Wolbachia* sp. en los flebótomos fue relativamente baja, se encontró en 11 de las 21 especies analizadas.

El filo bacteriano predominante fue Proteobacteria, al igual que en otros estudios de microbiota de flebótomos realizados en la región.

Se encontraron 22 géneros bacterianos, de los cuales 7 se reportan por primera vez en flebótomos.

La bacteria más abundante fue *Paracoccus* sp. y este sería el primer reporte de este género bacteriano en flebótomos.

RECOMENDACIONES

Se recomienda la realización de métodos de secuenciación de alto rendimiento que genere un gran número de secuencias cortas que proporcione una estimación más completa de la composición microbiana de los flebótomos, pues se obtendrían incluso los taxones que sean menos abundantes.

Se necesitan más estudios para identificar bacterias candidatas que puedan usarse en paratrasgénesis como una alternativa biológica para controlar las poblaciones de flebótomos y la transmisión de *Leishmania* spp.

Sería interesante analizar las características del suelo en el que se desarrollan las etapas inmaduras de los flebótomos y realizar una comparación de la microbiota presente en los flebótomos en las etapas inmaduras y adultas.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- ADLER, S. & THEODOR, O. (1929). Attempts to transmit *Leishmania tropica* by bite: the transmission of *Leishmania tropica* by *Phlebotomus sergenti*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitologie*, 23: 1-18. doi: 10.1080/00034983.1929.11684589
- AKSOY, S. (2018). Insect gut microbiota: accessories to the bite. *Cell host & microbe*, 23(1), 8–9. doi: 10.1016/j.chom.2017.12.016
- ALENCAR, R. B., DE QUEIROZ, R. G., & BARRETT, T. V. (2011). Breeding sites of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) and efficiency of extraction techniques for immature stages in terra-firme forest in Amazonas State, Brazil. *ActaTropica*, 118(3), 204–208. doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.10.012
- AZAMBUJA, P., GARCIA, E.S., & RATCLIFFE, N.A. (2005). Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. *Trends in parasitology*, 21(12), 568–572. doi:10.1016/j.pt.2005.09.011
- AZPURUA, J., DE LA CRUZ, D., VALDERAMA, A., & WINDSOR, D. (2010). *Lutzomyia* sand fly diversity and rates of infection by *Wolbachia* and an exotic *Leishmania* species on Barro Colorado Island, Panama. *PLoS neglected tropical diseases*, 4(3), e627. doi:10.1371/journal.pntd.0000627
- BATES, P.A., & ROGERS, M.E. (2004). New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Current Molecular Medicine*, 4(6), 601–609. doi:10.2174/1566524043360285
- BENNETT, KL, ALMANZA, A., MCMILLAN, WO, SALTONSTALL, K., VDOVENKO, EL, VINDA, JS, MEJIA, L., DRIESSE, K., DE LEÓN, LF, & LOAIZA, JR (2019). Perturbación del hábitat y organización de comunidades bacterianas en artrópodos hematófagos neotropicales. *PloS One*, 14 (9), e0222145. doi:10.1371/journal.pone.0222145
- BOURTZIS, K., DOBSON, S. L., XI, Z., RASGON, J. L., CALVITTI, M., MOREIRA, L. A., BOSSIN, H. C., MORETTI, R., BATON, L. A., HUGHES, G. L., MAVINGUI, P., & GILLES, J. R. (2014). Harnessing mosquito-*Wolbachia* symbiosis for vector and disease control. *Acta tropica*, 132 Suppl, S150–S163. doi:10.1016/j.actatropica.2013.11.004

BROOKE J. S. (2012). *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clinical microbiology reviews*, 25(1), 2–41. doi:10.1128/CMR.00019-11

BRUSCHI, F., & GRADONI, L., (2018). *The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases*, Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-72386-0_5

CAMPOLINA, TB, VILLEGAS, L., MONTEIRO, CC, PIMENTA, P., & SECUNDINO, N. (2020). Interacciones tripartitas: Leishmaniasis, microbiota y *Lutzomyia longipalpis*. *PLoS enfermedades tropicales desatendidas*, 14 (10), e0008666. doi:10.1371/journal.pntd.0008666

CHAGAS, E., SILVA, A. S., FÉ, N. F., FERREIRA, L. S., SAMPAIO, V. S., TERRAZAS, W., GUERRA, J., SOUZA, R., SILVEIRA, H., & GUERRA, M. (2018). Composition of sand fly fauna (Diptera: Psychodidae) and detection of *Leishmania* DNA (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in different ecotopes from a rural settlement in the central Amazon, Brazil. *Parasites & vectors*, 11(1), 180. doi:10.1186/s13071-018-2743-6

CHRISTENSEN, H. A., FAIRCHILD, G. B., HERRER, A., JOHNSON, C. M., YOUNG, D. G., & DE VÁSQUEZ, A. M. (1983). The ecology of cutaneous leishmaniasis in the Republic of Panama. *Journal of medical entomology*, 20(5), 463–484. doi:10.1093/jmedent/20.5.463

CHRISTENSEN, H.A. & HERRER, A. (1973). Attractiveness of sentinel animals to vectors of leishmaniasis in Panama. *Diario Americano de Medicina Tropical e Higiene*, 22 (5), 578-84.

DA ROCHA, N. O., LAMBERT, S. M., DIAS-LIMA, A. G., JULIÃO, F. S., & SOUZA, B. (2018). Molecular detection of *Wolbachia pipientis* in natural populations of sandfly vectors of *Leishmania infantum* in endemic areas: first detection in *Lutzomyia longipalpis*. *Medical and veterinary entomology*, 32(1), 111–114. <https://doi.org/10.1111/mve.12255>

DE ROODE, J.C & LEFÈVRE, T. (2012). Inmunidad conductual en insectos. *Insectos*, 3 (3), 789-820. doi: doi.org/10.3390/insects3030789

DE VALTIERRA L, D., VILLANUEVA, M., BERRY, C., & CABALLERO, P. (2020). Potencial de *Bacillus thuringiensis* y otras toxinas bacterianas como agentes de control biológico para combatir plagas de dípteros de importancia médica y agronómica. *Toxinas*, 12 (12), 773. doi:10.3390/toxins12120773

DILLON, R.J., EL KORDY, E., SHEHATA, M., & Lane, R.P. (1996). The prevalence of a microbiota in the digestive tract of *Phlebotomus papatasi*. *Annals of tropical medicine and parasitology*, 90(6), 669–673. doi:10.1080/00034983.1996.11813102

DOSTÁLOVÁ, A., VOTYPKA, J., FAVREAU, A.J., BARBIAN, K.D., VOLF, P., VALENZUELA, J.G. & JOCHIM, R.C. (2011) The midgut transcriptome of *Phlebotomus (Larrousius) perniciosus*, a vector of *Leishmania infantum*: comparison of sugar fed and blood fed sand flies. *BMC Genomics* 12, 223. doi: 10.1186/1471-2164-12-223

DOSTÁLOVÁ, A., & VOLF, P. (2012). *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites & vectors*, 5, 276. doi:10.1186/1756-3305-5-276

ENGEL, P., & MORAN, N. A. (2013). The gut microbiota of insects—diversity in structure and function. *FEMS microbiology reviews*, 37(5), 699-735. doi:10.1111/1574-6976.12025

FELICIANGELI, M. D. (1989). Taxonomy y Distribution of phlebotomine sandflies in Venezuela. I. The Oswaldoi species group of the genus *Lutzomyia* (Diptera:Psychodidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol.84:333-341. doi: 10.1590/S0074-02761989000300007

FRAIHI, W., FARES, W., PERRIN, P., DORKELD, F., SERENO, D., BARHOUMI, W., SBISSI, I., CHERNI, S., CHELBI, I., DURVASULA, R., RAMALHO-ORTIGAO, M., GTARI, M., & ZHIOUA, E. (2017). An integrated overview of the midgut bacterial flora composition of *Phlebotomus perniciosus*, a vector of zoonotic visceral leishmaniasis in the Western Mediterranean Basin. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(3), e0005484. doi:10.1371/journal.pntd.0005484

GEIGER, A., MALELE, I., ABD-ALLA, AM & NJIOKOU, F. (2018). Moscas tsetsé que se alimentan de sangre como huéspedes y vectores de *Trypanosoma africano* preadaptado a mamíferos: direcciones de investigación actuales y esperadas. *Microbiología BMC*, 18 (Suplemento 1), 162. doi:10.1186/s12866-018-1281-x

GIORGINI, M., BERNARDO, U., MONTI, MM, NAPPO, AG & GEBIOLA, M. (2010). Los simbioses de *Rickettsia* causan reproducción partenogenética en la avispa parasitoide *Pnigalio soemius* (Hymenoptera: Eulophidae). *Microbiología ambiental y aplicada*. 76 (8), 2589–2599. doi:10.1128/AEM.03154-09

GUPTA, A., & NAIR, S. (2020). Dynamics of insect–microbiome interaction influence host and microbial symbiont. *Frontiers in microbiology*, 1357. doi: 10.3389/fmicb.2020.01357

GURUNG, K., WERTHEIM, B., & FALCAO SALLES, J. (2019). The microbiome of pest insects: it is not just bacteria. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 167(3), 156-170. doi:10.1111/eea.12768

HASSAN, M.I., AL-SAWAF, B.M., FOUUDA, M.A., AL-HOSRY, S. & HAMMAD, KM (2014). Una evaluación reciente del efecto de la bacteria simbiótica del intestino medio del flebótomo, *Phlebotomus papatasi*, sobre la supervivencia de *Leshmania major*. *J Anc Dis Prev Rem*, 2 (Suplemento 1), 110.

HORNETT, E. A., CHARLAT, S., DUPLOUY, A. M., DAVIES, N., RODERICK, G. K., WEDELL, N., & HURST, G. D. (2006). Evolution of male-killer suppression in a natural population. *PLoS biology*, 4(9), e283. doi:10.1371/journal.pbio.0040283

HOU, Q., BAI, X., LI, W., GAO, X., ZHANG, F., SUN, Z. & ZHANG, H. (2018). Diseño de primers para evaluación de poblaciones de bacterias ácido lácticas en muestras biológicas complejas. *Fronteras en microbiología*, 9, 2045. doi:10.3389/fmicb.2018.02045

HUGHES, G. L., DODSON, B. L., JOHNSON, R. M., MURDOCK, C. C., TSUJIMOTO, H., SUZUKI, Y., PATT, A. A., CUI, L., NOSSA, C. W., BARRY, R. M., SAKAMOTO, J. M., HORNETT, E. A., & RASGON, J. L. (2014). Native microbiome impedes vertical transmission of *Wolbachia* in *Anopheles* mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(34), 12498–12503. doi:10.1073/pnas.1408888111

HUGHES, G. L., & RASGON, J. L. (2014). Transinfection: a method to investigate *Wolbachia*-host interactions and control arthropod-borne disease. *Insect molecular biology*, 23(2), 141–151. doi:10.1111/imb.12066

HURST, G., JIGGINS, F. M., SCHULENBURG, J., BERTRAND, D., WEST, S. A., GORIACHEVA, I. I., ZAKHAROV, I. A., WERREN, J. H., STOUTHAMER, R., & MAJERUS, M. (1999). Male-killing *Wolbachia* in two species of insect. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 266(1420), 735. doi:10.1098/rspb.1999.0698

IBRAHIM, MA, GRIKO, N., JUNKER, M. & BULLA, LA (2010). *Bacillus thuringiensis*: una perspectiva genómica y proteómica. *Bichos creados con bioingeniería*, 1 (1), 31–50. doi:10.4161/bbug.1.1.10519

JING, TZ, QI, FH & WANG, ZY (2020). Las funciones más dominantes de las bacterias intestinales de los insectos: ¿digestión, desintoxicación o suministro de nutrientes esenciales?. *Microbioma*, 8 (1), 38. doi:10.1186/s40168-020-00823-y

JOUZANI, G. S., VALIJANIAN, E., & SHARAFI, R. (2017). *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(7), 2691–2711. doi:10.1007/s00253-017-8175-y

KAMHAWI, S. (2006). Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes?. *Trends in parasitology*, 22(9), 439–445. doi: 10.1016/j.pt.2006.06.012

KARIMIAN, F., VATANDOOST, H., RASSI, Y., MALEKI-RAVASAN, N., MOHEBALI, M., SHIRAZI, MH, KOOSHA, M., CHOUBDAR, N. & OSHAGHI, MA (2019). Microbiota aeróbica del intestino medio de vectores de moscas de arena de leishmaniasis visceral zoonótica del norte de Irán, un paso hacia la búsqueda de posibles candidatos paratransgénicos. *Parásitos y vectores*, 12 (1), 10. doi:10.1186/s13071-018-3273-y

KAUR, R., SHROPSHIRE, J. D., CROSS, K. L., LEIGH, B., MANSUETO, A. J., STEWART, V., BORDENSTEIN, S. R., & BORDENSTEIN, S. R. (2021). Living in the endosymbiotic world of *Wolbachia*: A centennial review. *Cell host & microbe*, 29(6), 879–893. doi:10.1016/j.chom.2021.03.006

KELLY, P.H., BAHR, S.M., SERAFIM, T.D., AJAMI, N.J., PETROSINO, J.F., MENESES, C., KIRBY, J.R., VALENZUELA, J.G., KAMHAWI, S., & WILSON, M.E. (2017). The Gut Microbiome of the Vector *Lutzomyia longipalpis* Is Essential for Survival of *Leishmania infantum*. *mBio*, 8(1), e01121-16. doi:10.1128/mBio.01121-16

KUHLS, K., MAURICIO, I. L., PRATLONG, F., PRESBER, W., & SCHÖNIAN, G. (2005). Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. *Microbes and infection*, 7(11-12), 1224–1234. doi:10.1016/j.micinf.2005.04.009

LACEY LA, & BROOKS, W. (1997). *Manual of Techniques in Insect Pathology*. doi:10.1016/b978-0-12-432555-5.x5000-3

LI, K., CHEN, H., JIANG, J., LI, X., XU, J., & MA, Y. (2016). Diversity of bacteriome associated with *Phlebotomus chinensis* (Diptera: Psychodidae) sand flies in two wild populations from China. *Scientific reports*, 6, 36406. doi:10.1038/srep36406

LOURADOUR, I., MONTEIRO, CC., INBAR, E., GHOSH, K., MERKHOFFER, R., LAWYER, P., PAUN, A., SMELKINSON, M., SECUNDINO, N., LEWIS, M., ERRAM, D., ZUREK, L., & SACKS, D. (2017). The midgut microbiota plays an essential role in sand fly vector competence for *Leishmania major*. *Cellular microbiology*, 19(10), 10.1111/cmi.12755. doi:10.1111/cmi.12755

LOZANO-SARDANETA, Y. N., VALDERRAMA, A., SÁNCHEZ-MONTES, S., GROSTIETA, E., COLUNGA-SALAS, P., SÁNCHEZ-CORDERO, V., & BECKER, I. (2021). Rickettsial agents detected in the genus *Psathyromyia* (Diptera:Phlebotominae) from a Biosphere Reserve of Veracruz, Mexico. *Parasitology international*, 82, 102286. doi:10.1016/j.parint.2021.102286

MACHADO, V. E., MARTINS, P. M., FERREIRA, H., FERRO, M., BACCI, M., & PINTO, M. C. (2014). Bacterial groups associated with *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) sandflies. *Journal of vector borne diseases*, 51(2), 137–139.

MACHADO-FERREIRA, E., PIESMAN, J., ZEIDNER, NS & SOARES, CA (2012). Una proteobacteria alfa prevalente *Paracoccus* sp. en una población de garrapatas de Cayena (*Amblyomma cajennense*) de Río de Janeiro, Brasil. *Genética y biología molecular*, 35 (4), 862–867. doi:10.1590/S1415-47572012005000067

MALEKI-RAVASAN, N., OSHAGHI, M. A., HAJIKHANI, S., SAEIDI, Z., AKHAVAN, A. A., GERAMI-SHOAR, M., SHIRAZI, M. H., YAKHCHALI, B., RASSI, Y., & AFSHAR, D. (2013). Aerobic Microbial Community of Insectary Population of *Phlebotomus papatasi*. *Journal of arthropod-borne diseases*, 8(1), 69–81.

MAROLI, M., FELICIANGELI, M.D., BICHAUD, L., CHARREL, R.N. & GRADONI L. (2013). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol*, 27 :123–47. doi: 10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x.

MCCARTHY, C. B., DIAMBRA, L. A., & RIVERA-POMAR, R. V. (2011). Metagenomic analysis of taxa associated with *Lutzomyia longipalpis*, vector of visceral leishmaniasis, using an unbiased high-throughput approach. *PLoS neglected tropical diseases*, 5(9), e1304. doi:10.1371/journal.pntd.0001304

MCMENIMAN, C. J., LANE, R. V., CASS, B. N., FONG, A. W., SIDHU, M., WANG, Y. F., & O'NEILL, S. L. (2009). Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science (New York, N.Y.)*, 323(5910), 141–144. doi:10.1126/science.1165326

- MERGAERT P. (2018). Papel de los péptidos antimicrobianos en el control de las poblaciones bacterianas simbióticas. Nat. Pinchar. Rep. doi:35 336–356. 10.1039/c7np00056a
- MONTEIRO, C. C., VILLEGAS, L. E., CAMPOLINA, T. B., PIRES, A. C., MIRANDA, J. C., PIMENTA, P. F., & SECUNDINO, N. F. (2016). Bacterial diversity of the American sand fly *Lutzomyia intermedia* using high-throughput metagenomic sequencing. Parasites & vectors, 9(1), 480. doi:10.1186/s13071-016-1767-z
- MORAES, C. S., SEABRA, S. H., CASTRO, D. P., BRAZIL, R. P., DE SOUZA, W., GARCIA, E. S., & AZAMBUJA, P. (2008). *Leishmania (Leishmania) chagasi* interactions with *Serratia marcescens*: ultrastructural studies, lysis and carbohydrate effects. Experimental parasitology, 118(4), 561–568. doi:10.1016/j.exppara.2007.11.015
- MORAES, C. S., AGUIAR-MARTINS, K., COSTA, S. G., BATES, P. A., DILLON, R. J., & GENTA, F. A. (2018). Second Blood Meal by Female *Lutzomyia longipalpis*: Enhancement by Oviposition and Its Effects on Digestion, Longevity, and *Leishmania* Infection. BioMed Research International, 2018, 2472508. <https://doi.org/10.1155/2018/2472508>
- MOREIRA, L. A., ITURBE-ORMAETXE, I., JEFFERY, J. A., LU, G., PYKE, A. T., HEDGES, L. M., ROCHA, B. C., HALL-MENDELIN, S., DAY, A., RIEGLER, M., HUGO, L. E., JOHNSON, K. N., KAY, B. H., MCGRAW, E. A., VAN DEN HURK, A. F., RYAN, P. A., & O'NEILL, S. L. (2009). A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. Cell, 139(7), 1268–1278. doi:10.1016/j.cell.2009.11.042
- OLIVEIRA, S.M., MORAES, B.A., GONÇALVES, C.A., GIORDANO-DIAS, C.M., D'ALMEIDA, J.M., ASENSI, M.D., MELLO, R.P. & BRAZIL, R.P. (2000). Prevalence of microbiota in the digestive tract of wild females of *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera: Psychodidae)]. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 33(3), 319–322. doi:10.1590/s0037-86822000000300012
- OMONDI, Z. N., ARSERIM, S. K., TÖZ, S., & ÖZBEL, Y. (2022). Host-Parasite Interactions: Regulation of *Leishmania* Infection in Sand Fly. Acta parasitologica, 10.1007/s11686-022-00519-3. Advance online publication. Ddoi:10.1007/s11686-022-00519-3

- ONO, M., BRAIG, H. R., MUNSTERMANN, L. E., FERRO, C., & O'NEILL, S. L. (2001). *Wolbachia* infections of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *Journal of medical entomology*, 38(2), 237–241. doi:10.1603/0022-2585-38.2.237
- PAPADOPOULOS, C., KARAS, PA, VASILEIADIS, S., LIGDA, P., SARATSI, A., SOTIRAKI, S. & KARPOUZAS, DG (2020). La especie huésped determina la composición de la microbiota procariótica en los flebótomos. *Patógenos* (Basilea, Suiza), 9 (6), 428. doi:10.3390/pathogens9060428
- PETERKOVA-KOCI, K., ROBLES-MURGUIA, M., RAMALHO-ORTIGAO, M., & ZUREK, L. (2012). Significance of bacteria in oviposition and larval development of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasites & vectors*, 5, 145. doi:10.1186/1756-3305-5-145
- PIRES, A.C., VILLEGAS, L.E., CAMPOLINA, T.B., SILVA, A., PAOLUCCI, P.F., & COSTA, N. (2017). Diversidad bacteriana de *Lutzomyia longipalpis* capturada en la naturaleza (un vector de leishmaniasis visceral zoonótica en Brasil) bajo distintas condiciones fisiológicas mediante análisis metagenómico. *Vectores de parásitos* 10, 627 doi:10.1186/s13071-017-2593-7
- PITALUGA, A.N., BETEILLE, V., LOBO, A.R., ORTIGÃO-FARIAS, J.R., DÁVILA, A.M., SOUZA, A.A., Ramalho-Ortigão, J.M. & Traub-Cseko, Y.M. (2009). EST sequencing of blood-fed and *Leishmania*-infected midgut of *Lutzomyia longipalpis*, the principal visceral leishmaniasis vector in the Americas. *Molecular Genetics and Genomics*, 282(3), 307-317.
- RAMALHO-ORTIGAO, M., SARAIVA, E.M., & TRAUB-CSEKÖ, Y.M. (2010). Sand fly-*Leishmania* interactions: long relationships are not necessarily easy. *The open parasitology journal*, 4, 195–204. doi:10.2174/1874421401004010195
- RAMIREZ, J. L., SHORT, S. M., BAHIA, A. C., SARAIVA, R. G., DONG, Y., KANG, S., TRIPATHI, A., MLAMBO, G., & DIMOPOULOS, G. (2014). *Chromobacterium* Csp_P reduces malaria and dengue infection in vector mosquitoes and has entomopathogenic and in vitro anti-pathogen activities. *PLoS pathogens*, 10(10), e1004398. doi:10.1371/journal.ppat.1004398
- RASGON, J. L., GAMSTON, C. E., & REN, X. (2006). Survival of *Wolbachia pipientis* in cell-free medium. *Applied and environmental microbiology*, 72(11), 6934–6937. doi:10.1128/AEM.01673-06
- RIGAUD, T., SOUTYGROSSET, C., RAIMOND, R., MOCQUARD, J.P., & JUCHAULT, P. (1991). Feminizing endocytobiosis in the terrestrial crustacean

Armadidium vulgare Latr. (Isopoda) - recent acquisitions. *Endocytobiosis & Cell Res.* 7, 259–273.

RIGG, C. A., PEREA, M., GONZÁLEZ, K., SALDAÑA, A., CALZADA, J. E., GAO, Y., GOTTDENKER, N. L., & CHAVES, L. F. (2021). Diversity, co-occurrence, and nestedness patterns of sand fly species (Diptera: Psychodidae) in two rural areas of western Panamá. *Insects*, 12(2), 113. doi:10.3390/insects12020113

RIGG, C. A., CALZADA, J. E., SALDAÑA, A., PEREA, M., CHAVES, L. F., & VALDERRAMA, A. (2019). *Leishmania* spp. Infection Rate and Feeding Patterns of Sand Flies (Diptera: Psychodidae) from a Hyperendemic Cutaneous Leishmaniasis Community in Panamá. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 100(4), 798–807. doi:10.4269/ajtmh.17-0628

ROZAS, J., FERRER-MATA, A., SÁNCHEZ-DELBARRIO, J.C., GUIRAO-RICO, S., LIBRADO, P., RAMOS-ONSINS, S.E. & SÁNCHEZ-GRACIA, A. (2017). DnaSP 6: análisis de polimorfismos de secuencias de DNA de grandes conjuntos de datos. *mol. Biol. Evol.* 34: 3299-3302. doi: 10.1093/molbev/msx248

SACKS, D., LAWYER, P., & KAMHAWI, S. (2008). The biology of *Leishmania*-sandfly interactions. En: *Leishmania tras el genoma*. Myler P, Fasel N, editores. Caister Academic Press. doi:10.21775/9781912530304

SACKS, D., & KAMHAWI, S. (2001). Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annual review of microbiology*, 55, 453–483. doi:10.1146/annurev.micro.55.1.453

SANT'ANNA, M. R., DIAZ-ALBITER, H., AGUIAR-MARTINS, K., AL SALEM, W. S., CAVALCANTE, R. R., DILLON, V. M., BATES, P. A., GENTA, F. A., & DILLON, R. J. (2014). Colonization resistance in the sand fly gut: *Leishmania* protects *Lutzomyia longipalpis* from bacterial infection. *Parasites & vectors*, 7, 329. doi:10.1186/1756-3305-7-329

SANT'ANNA, M. R., DIAZ-ALBITER, H., MUBARAKI, M., DILLON, R. J., & BATES, P. A. (2009). Inhibition of trypsin expression in *Lutzomyia longipalpis* using RNAi enhances the survival of *Leishmania*. *Parasites & Vectors*, 2(1), 62. doi:10.1186/1756-3305-2-62

SANT'ANNA, M.R., DARBY, A.C., BRAZIL, R.P., MONTOYA-LERMA, J., DILLON, V.M., BATES, P.A. & DILLON, R.J. (2012). Investigation of the bacterial communities associated with females of *Lutzomyia* sand fly species from South America. *PLoS One*, 7(8):e42531. doi: 10.1371/journal.pone.0042531.

- SASTRE, A., GONZÁLEZ-ARREGOCES, J., ROMAINOIK, I., MARIÑO, S., LUCAS, C., MONFÁ, E., STEFAN, G., DE LEÓN, B., & PRIETO, M. (2016). Peritonitis causada por *Paracoccus yeei* en diálisis peritoneal. *Nefrología (Madrid)*, 36(4), 445-446. doi:10.1016/j.nefro.2016.02.009
- SCHÖNIAN, G., NASEREDDIN, A., DINSE, N., SCHWEYNOCH, C., SCHALLIG, H. D., PRESBER, W., & JAFFE, C. L. (2003). PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 47(1), 349–358. doi:10.1016/s0732-8893(03)00093-2
- SHROPSHIRE, J. D., LEIGH, B., & BORDENSTEIN, S. R. (2020). Symbiont-mediated cytoplasmic incompatibility: what have we learned in 50 years?. *eLife*, 9, e61989. doi:10.7554/eLife.61989
- STEVERDING, D. (2017). The history of leishmaniasis. *Parasites y Vectors*, 10(1), 82. doi: 10.1186/s13071-017-2028-5
- SUDIA, W.D., & CHAMBERLAIN, R. W. (1962). Battery-operated light trap, an improved model. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 4(4), 536–538.
- TABBABI, A., MIZUSHIMA, D., YAMAMOTO, D.S. y KATO, H. (2022). "Las moscas de la arena y su microbiota" *Parasitología* 2, no. 2: 71-87. <https://doi.org/10.3390/parasitologia2020008>
- TABBABI, A., WATANABE, S., MIZUSHIMA, D., CACERES, AG, GOMEZ, EA, YAMAMOTO, DS, CUI, L., HASHIGUCHI, Y. & KATO, H. (2020). Análisis comparativo de comunidades bacterianas en poblaciones de *Lutzomyia ayacuchensis* con diferente competencia vectorial a parásitos *Leishmania* en Ecuador y Perú. *Microorganismos*, 9 (1), 68. doi:10.3390/microorganisms9010068
- TAMURA, K., STECHER, G., & KUMAR, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular biology and evolution*, 38(7), 3022–3027. doi:10.1093/molbev/msab120
- TELLERIA, E. L., SANT'ANNA, M. R., ALKURBI, M. O., PITALUGA, A. N., DILLON, R. J., & TRAUB-CSEKÖ, Y. M. (2013). Bacterial feeding, *Leishmania* infection and distinct infection routes induce differential defensin expression in *Lutzomyia longipalpis*. *Parasites & vectors*, 6, 12. doi:10.1186/1756-3305-6-12
- TELLERIA, E.L., MARTINS-DA-SILVA, A., TEMPONE, A. J., & TRAUB-CSEKÖ, Y. M. (2018). *Leishmania*, microbiota and sand fly immunity. *Parasitology*, 145(10), 1336–1353. doi:10.1017/S0031182018001014

- VAIDYANATHAN, R. (2004). *Leishmania* parasites (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) reversibly inhibit visceral muscle contractions in hemimetabolous and holometabolous insects. *Journal of Invertebrate Pathology*, 87(2-3), 123–128. doi:10.1016/j.jip.2004.09.001
- VALDERRAMA, A.; HERRERA, M. & SALAZAR, A. (2008). Relationship between the species composition of the genus *Lutzomyia* França (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) and the different types of forests in Panama. *Acta Zoológica Mexicana*, 24(2), 67-78.
- VIVERO, R. J., CASTAÑEDA-MONSALVE, V. A., ROMERO, L. R., D HURST, G., CADAVID-RESTREPO, G., & MORENO-HERRERA, C. X. (2021). Gut Microbiota Dynamics in natural populations of *Pintomyia evansi* under experimental infection with *Leishmania infantum*. *Microorganisms*, 9(6), 1214. doi:10.3390/microorganisms9061214
- VIVERO, R. J., BEDOYA MESA, G., ROBLEDO, S. M., MORENO HERRERA, C. X., & CADAVID-RESTREPO, G. (2020). Corrigendum to "Enzymatic, antimicrobial, and leishmanicidal bioactivity of gram-negative bacteria strains from the midgut of *Lutzomyia evansi*, an insect vector of leishmaniasis in Colombia" [Biotechnol. Rep. 24 (2019) 1-9]. *Biotechnology reports* (Amsterdam, Netherlands), 26, e00451. doi:10.1016/j.btre.2020.e00451
- VIVERO, R. J., MESA, G. B., ROBLEDO, S. M., HERRERA, C., & CADAVID-RESTREPO, G. (2019a). Enzymatic, antimicrobial, and leishmanicidal bioactivity of gram-negative bacteria strains from the midgut of *Lutzomyia evansi*, an insect vector of leishmaniasis in Colombia. *Biotechnology reports* (Amsterdam, Netherlands), 24, e00379. doi:10.1016/j.btre.2019.e00379
- VIVERO, R. J., VILLEGAS-PLAZAS, M., CADAVID-RESTREPO, G. E., HERRERA, C., URIBE, S. I., & JUNCA, H. (2019b). Wild specimens of sand fly phlebotomine *Lutzomyia evansi*, vector of leishmaniasis, show high abundance of *Methylobacterium* and natural carriage of *Wolbachia* and *Cardinium* types in the midgut microbiome. *Scientific reports*, 9(1), 17746. doi:10.1038/s41598-019-53769-z
- VIVERO, R. J., CADAVID-RESTREPO, G., HERRERA, C. X., & SOTO, S. I. (2017). Molecular detection and identification of *Wolbachia* in three species of the genus *Lutzomyia* on the Colombian Caribbean coast. *Parasites & vectors*, 10(1), 110. doi:10.1186/s13071-017-2031-x
- VIVERO, R.J., JARAMILLO, N.G., CADAVID-RESTREPO, G., SOTO, S.I., & HERRERA, C.X. (2016). Structural differences in gut bacteria communities in

- developmental stages of natural populations of *Lutzomyia evansi* from Colombia's Caribbean coast. *Parasites & vectors*, 9(1), 496. doi: 10.1186/s13071-016-1766-0
- VIVERO, R. J., TORRES-GUTIERREZ, C., BEJARANO, E. E., PEÑA, H. C., ESTRADA, L. G., FLOREZ, F., ORTEGA, E., APARICIO, Y., & MUSKUS, C. E. (2015). Study on natural breeding sites of sand flies (Diptera: Phlebotominae) in areas of *Leishmania* transmission in Colombia. *Parasites & vectors*, 8, 116. doi:10.1186/s13071-015-0711-y
- VOLF, P., HAJMOVA, M., SADLOVA, J., & VOTYPKA, J. (2004). Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. *International journal for parasitology*, 34(11), 1221-1227. doi: 10.1016/j.ijpara.2004.07.010
- WEISBURG, WG, BARNES, SM, PELLETIER, DA & LANE, DJ (1991). Amplificación de DNA ribosomal 16S para estudio filogenético. *Revista de bacteriología*, 173 (2), 697–703. doi:10.1128/jb.173.2.697-703.1991
- WEISS, B. & AKSOY, S. (2011). Influencias del microbioma en la competencia del vector huésped de insectos. *Tendencias en parasitología*, 27 (11), 514–522. doi:10.1016/j.pt.2011.05.001
- WERREN, J. H., & WINDSOR, D. M. (2000). *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium?. *Proceedings. Biological sciences*, 267(1450), 1277–1285. doi:10.1098/rspb.2000.1139
- WERMELINGER, E. D., & ZANUNCIO, J. C. (2001). Development of *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) larvae in different diets. *Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia*, 61(3), 405–408. doi:10.1590/s1519-69842001000300009
- WERMELINGER, E., ZANUNCIO, J., RANGEL, E., CECON, P. & RABINOVITCH, L. (2000). Toxicity of *Bacillus* species to larvae of *Lutzomyia longipalpis* (L. & N.) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*. v. 29, n. 3, pp. 609-614. doi:10.1590/S0301-80592000000300025
- WU, Q., PATOČKA, J. & KUČA, K. (2018). Péptidos antimicrobianos de insectos, una mini revisión. *Toxinas*, 10 (11), 461. doi:10.3390/toxins10110461
- YE, Y. H., CARRASCO, A. M., FRENTIU, F. D., CHENOWETH, S. F., BEEBE, N. W., VAN DEN HURK, A. F., SIMMONS, C. P., O'NEILL, S. L., & MCGRAW, E. A. (2015). *Wolbachia* reduces the transmission potential of dengue-infected *Aedes aegypti*. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(6), e0003894. doi:10.1371/journal.pntd.0003894

YOUNG D.G. & DUNCAN M.A. (1994). Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the west Indies, Central And South America (Diptera: Psychodidae). Memories of the American Entomological Institute, Number 54. doi:10.1016/0035-9203(95)90687-8

YUVAL, B. & WARBURG, A. (1989). Susceptibilidad de flebótomos adultos (Diptera: Psychodidae) a *Bacillus thuringiensis* var. *israeliensis*, Annals of Tropical Medicine & Parasitology, 83:2, 195-196, doi:10.1080/00034983.1989.11812331

ZUG, R., & HAMMERSTEIN, P. (2015). Bad guys turned nice? A critical assessment of *Wolbachia* mutualisms in arthropod hosts. Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society, 90(1), 89–111. doi:10.1111/brv.12098

ZUG, R., & HAMMERSTEIN, P. (2012). Still a host of hosts for *Wolbachia*: analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected. PloS one, 7(6), e38544. doi:10.1371/journal.pone.0038544

ANEXOS

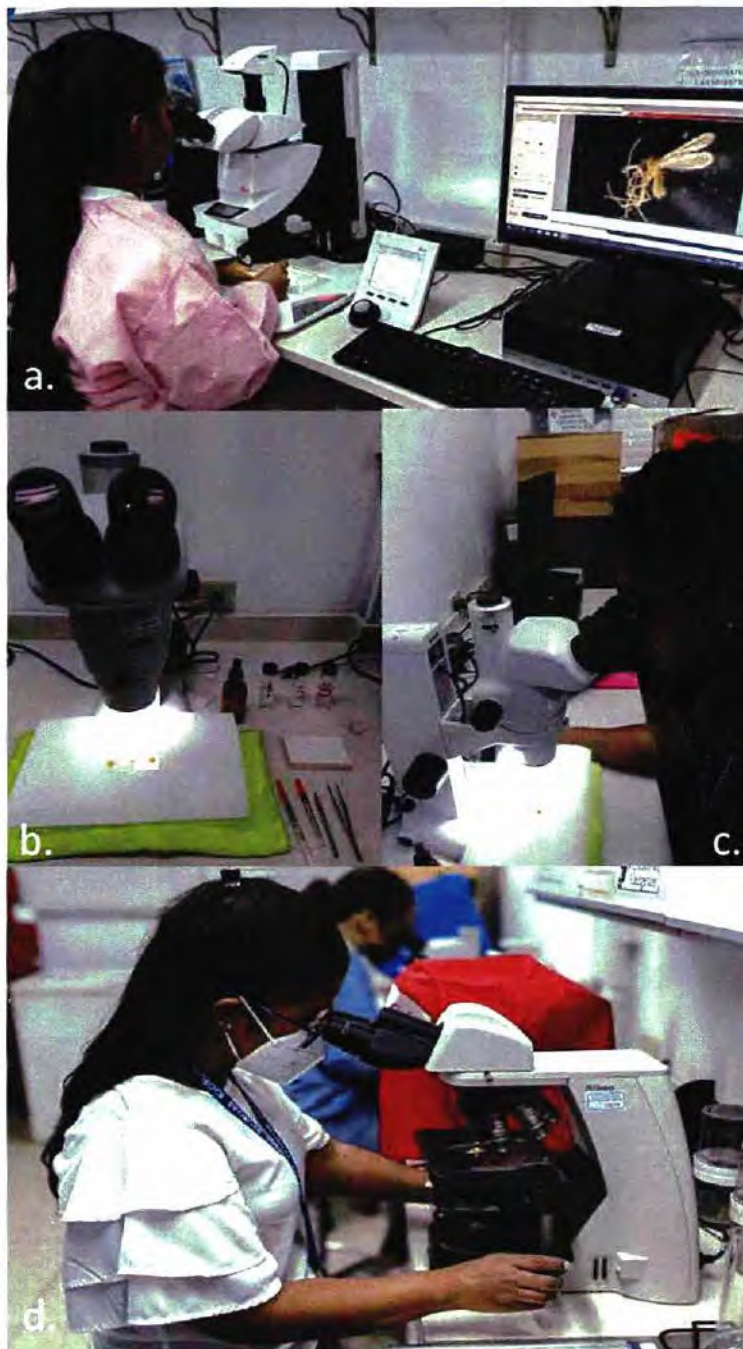


Figura 11. Micropreparado para la identificación taxonómica de flebotomos. (a. Selección de flebotomos, b. materiales utilizados para realizar la esterilización, disección y montaje de placas, c. disección de flebotomos, d. identificación taxonómica).

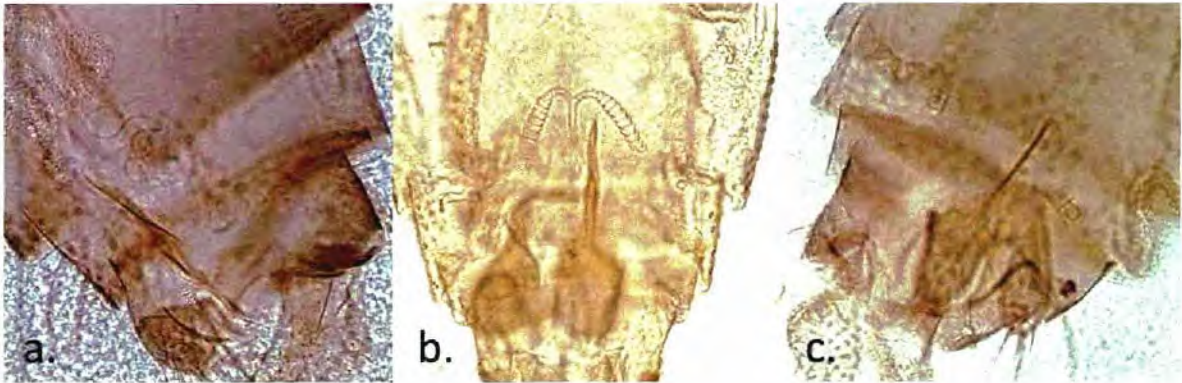


Figura 12. Vista al microscopio de genitalia de flebótomos vectores incriminados en la transmisión de leishamianiasis en Panamá. (a. *Lutzomyia gomezi*, b. *Lutzomyia panamensis*, c. *Lutzomyia trapidoi*). Fotos por: Eddier Rivera y Luisa Collado, 2019.

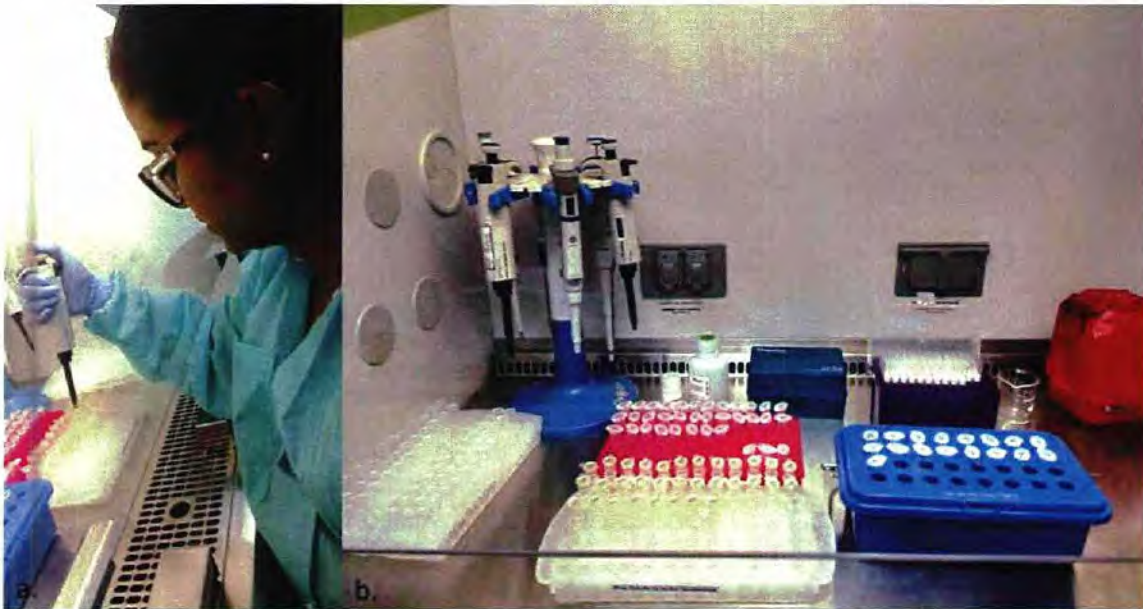


Figura 13. Aislamiento de DNA de flebótomos. (a. proceso de extracción de DNA utilizando kit, b. muestras extraídas y reactivos utilizados para el aislamiento de DNA).



Figura 14. Proceso de preparación de la mezcla de reacción para PCR. (a. preparación del mix de la reacción, b. colocación de muestras en termociclador, c. termociclador utilizado para llevar a cabo el ciclado de la reacción de PCR).



Figura 15. Proceso de electroforesis. Se realizó con la preparación de gel de agarosa al 1.5 % en Buffer TBE 1X, corrida electroforética a 60 Voltios por una hora. (a y b. carga de muestra, c. corrida de muestras en la cámara de electroforesis).

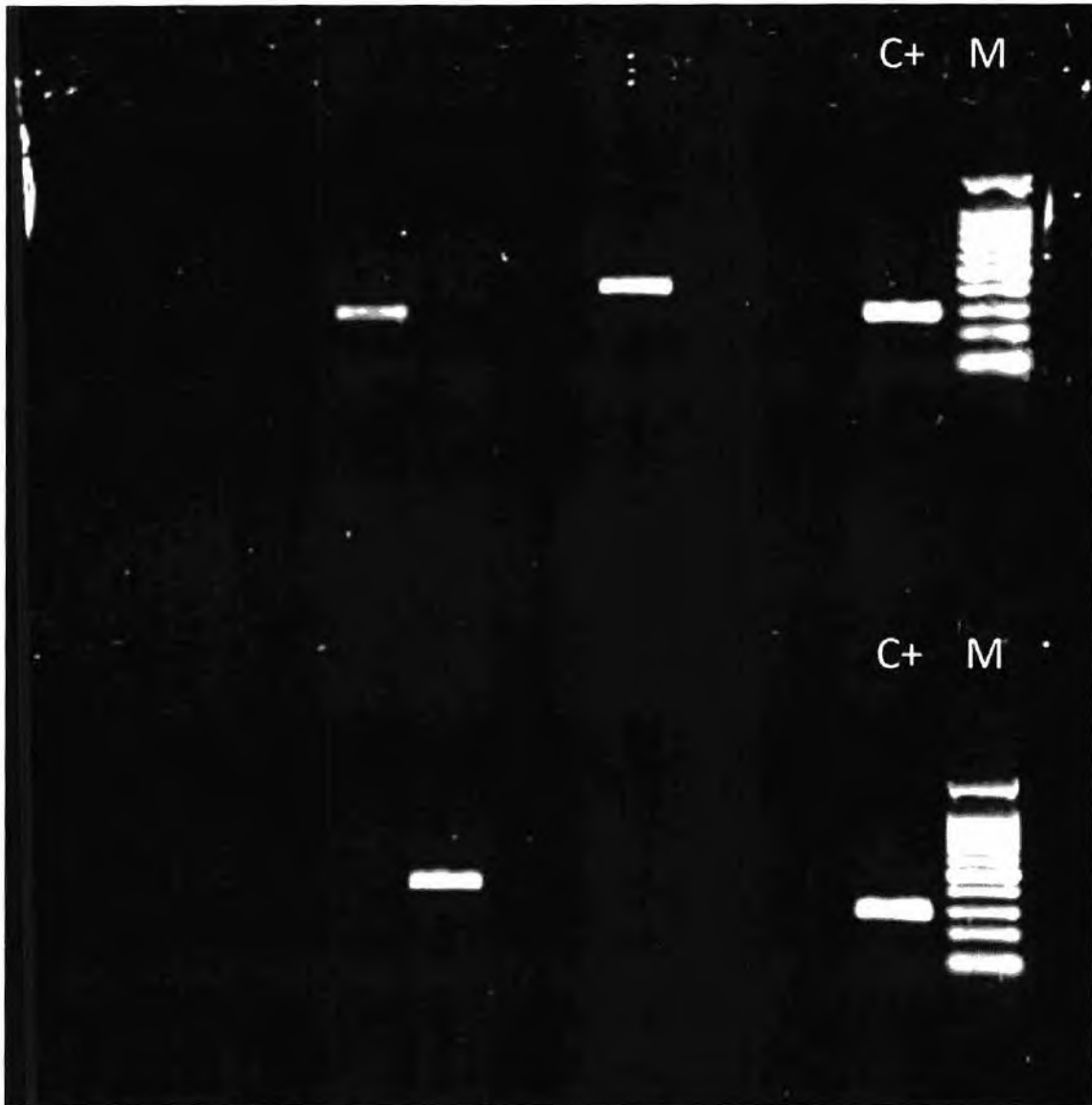


Figura 16. Electroforesis de productos amplificados por PCR para *Leishmania* spp. amplificadas mediante el gen ITS-1. Se utilizó un marcador de 100pb.



Figura 17. Electroforesis de productos amplificados por PCR para *Wolbachia* sp. amplificadas mediante el gen 16S. Se utilizó un marcador de 100pb.

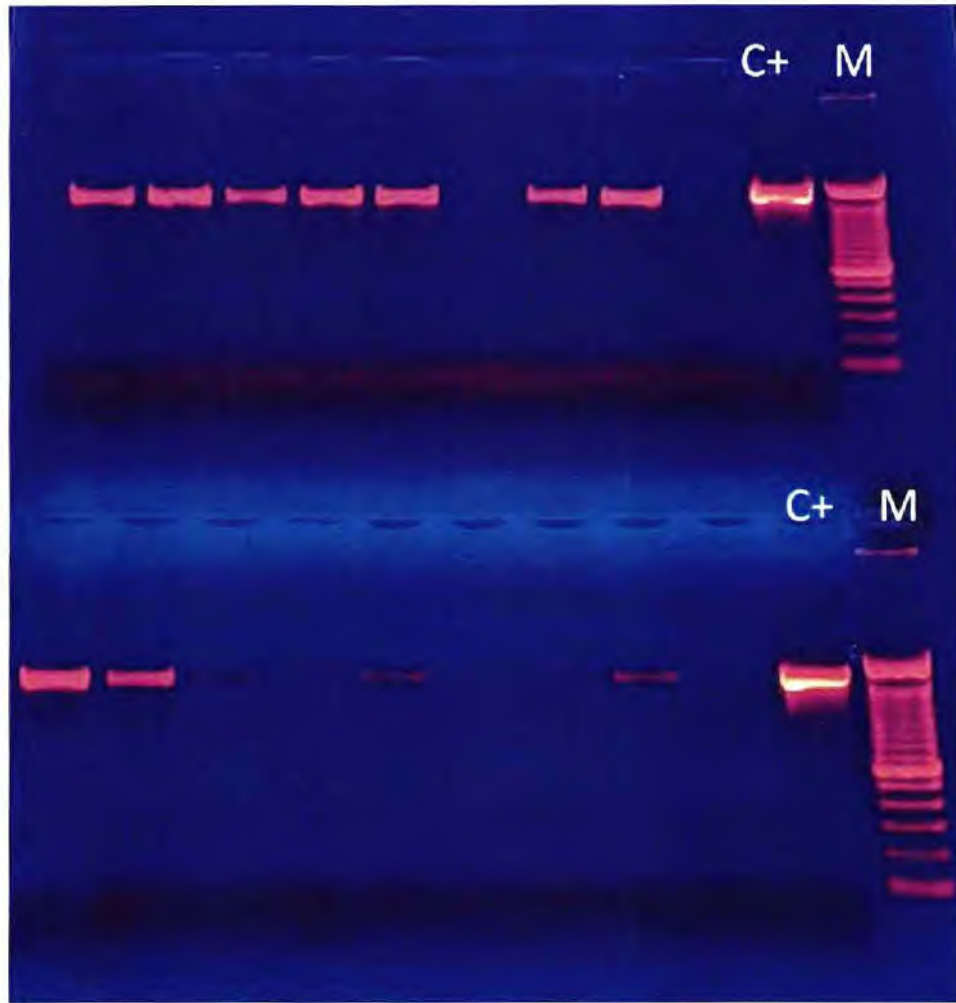


Figura 18. Electroforesis de productos amplificados por PCR para bacterias amplificadas mediante el gen 16S ARNr. Se utilizó un marcador de 1kb.