

Estudio preliminar de la estructura genética de *Triatoma venosa* (Hemiptera: Reduviidae) mediante marcadores moleculares RAPD

Preliminary study of the genetic structure of *Triatoma venosa* (Hemiptera: Reduviidae) using RAPD molecular markers

CLAUDIA ESPITIA¹, CARLOS JARAMILLO², GERMÁN AGUILERA³, NÉSTOR PINTO⁴, FELIPE GUHL⁵

Revista Colombiana de Entomología 30 (2): 157-160 (2004)

Resumen. *Triatoma venosa* es uno de los principales vectores secundarios de la enfermedad de Chagas en Colombia. Para estudiar su estructura genética se colectaron 30 individuos adultos de *T. venosa* en los municipios de Somondoco (veredas de Cabrera y Barreras), Guateque (veredas de Llano Grande, Tincachoque, y Cantoras) y Sutatenza (veredas de Sisquique, Ovejeras, el Gaque y Piedra Larga), departamento de Boyacá, provenientes de dos hábitats diferentes (peridoméstico y doméstico). El ADN genómico de cada individuo se amplificó por RAPD utilizando 4 iniciadores, los productos se visualizaron mediante electroforesis en geles de poliácridamida al 6% teñidos con plata. Al realizar un análisis mediante el programa SYNTAX 2000 y RAPDPLOT se obtuvo un dendrograma donde no se define un cluster para cada población de insectos evaluada. Al analizar la matriz de datos con RAPDFST se obtuvo un F_{st} de Wright de 0,047 y de Weir & Cockerham de 0,056. La tasa efectiva de migración en este análisis fue de 5,0 con la metodología de Wright, y de 4,2 con la de Weir & Cockerham. Estos resultados preliminares indican una gran movilidad de los insectos entre los dos hábitats y un elevado flujo genético que no permite el establecimiento de diferenciación genética entre las poblaciones domésticas y peridomésticas analizadas.

Palabras clave: Enfermedad de Chagas. Triatomino. Insectos vectores. RAPD.

Summary. *Triatoma venosa* is one of the main secondary vectors of Chagas Disease in Colombia. To study its genetic structure, 30 adult individuals of *T. venosa* were collected in the municipalities of Somondoco (villages of Cabrera and Barreras), Guateque (villages of Llano Grande, Tincachoque, and Cantoras) and Sutatenza (villages of Sisquique, Ovejeras, el Gaque and Piedra Larga) department of Boyaca, from two different habitats (peridomestic and domestic). Genomic DNA of each individual was amplified by RAPD using 4 primers; the products were visualized after polyacrilamide gel electrophoresis followed by 6% silver staining. The dendrogram obtained after analysis with SYNTAX 2000 and RAPDPLOT software did not define a cluster for each insect population evaluated. When the binary matrix was analyzed with RAPDFST software, the Wright's F_{st} was 0,047 and Weir & Cockerham's F_{st} was 0,056. The effective migration rate in this analysis was 5,0 under Wright's methodology and 4,2 under Weir & Cockerham's methodology. These preliminary results indicate a high mobility of the insects between the two habitats and a high genetic flow, which do not allow the establishment of genetic differentiation between the domestic and peridomestic populations analyzed.

Key words: Chagas disease. Triatominae. Insect vectors. RAPD.

Introducción

La enfermedad de Chagas fue descrita por primera vez por Carlos Chagas en 1909, es exclusiva del continente americano y es causada por *Trypanosoma cruzi*, un protozoo parásito flagelado transmitido a humanos por insectos triatomíneos. La distribución geográfica de infecciones humanas por *T. cruzi* se extiende desde México hasta el sur de Argentina, afectando entre 16 a 18 millones de personas, adicionalmente cerca del 25% de la población latinoamericana se encuentra en riesgo de adquirir la enfermedad (WHO 2000). En Colombia se estima que alrededor del 5% de la población está infectada y

cerca del 20% se encuentra bajo riesgo de adquirir la infección (Guhl 2000).

La transmisión de *T. cruzi* se lleva a cabo principalmente por medio de insectos vectores que han mostrado una fuerte estructuración geográfica, la cual puede ser detectada por marcadores morfológicos, citogenéticos e isoenzimáticos (Guhl y Schofield 1996). Adicionalmente, se han empleado marcadores moleculares generados por amplificación azarosa de polimorfismos de ADN que permiten detectar variabilidad genética entre diferentes poblaciones de vectores (Welsh y McClelland 1990; Williams *et al.* 1990).

Harry *et al.* (1998) realizaron una revisión sobre la utilización de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) en entomología y sugirieron que estos marcadores son útiles en estudios de genética poblacional y pueden ser de gran utilidad en programas de control a través de la localización de genes o de regiones importantes en el genoma.

En triatomíneos, se han realizado algunos estudios utilizando esta técnica, Carlier *et al.* (1996) presentaron unos resultados preliminares sobre el uso de RAPD en la comparación de vectores triatomíneos intra e interespecíficos, los cuales permitieron una

1 Microbióloga. Universidad de los Andes, Departamento de Ciencias Biológicas, CIMPAT. E-mail: cl-espit@uniandes.edu.co

2 M. Sc. Universidad de los Andes, Departamento de Ciencias Biológicas, CIMPAT. E-mail: cjaramil@uniandes.edu.co

3 M. Sc. Universidad de los Andes, Departamento de Ciencias Biológicas, CIMPAT. E-mail: geragui25@hotmail.com

4 M. Sc. Universidad de los Andes, Departamento de Ciencias Biológicas, CIMPAT. E-mail: npinto@uniandes.edu.co

5 Autor para Correspondencia: M. Sc. Universidad de los Andes, Departamento de Ciencias Biológicas, Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical, CIMPAT. Carrera 1 No 18^a 10 Bloque A. Fax: 3324540, Tel. 3394949 Ext. 2774. E-mail: fguhl@uniandes.edu.co

separación fácil entre *Triatoma sordida* y *T. infestans*, al igual que poblaciones silvestres y domésticas de *T. infestans*. De la misma manera, Jaramillo *et al.* (2001), usando esta misma técnica molecular, establecieron que no se presentaba flujo genético entre *Rhodnius prolixus* y *R. colombiensis* (domiciliados y silvestres, respectivamente), corroborando de esta manera las diferencias encontradas mediante métodos morfológicos y bioquímicos por Moreno *et al.* (1999). Otras especies de triatomos evaluadas de manera preliminar por esta técnica han sido *T. brasiliensis* (Borges *et al.* 2000) donde se sugiere una heterogeneidad poblacional y *Triatoma dimidiata* (Jaramillo *et al.* 2003) donde se sugiere homogeneidad genética entre las poblaciones domésticas, peridomésticas y silvestres de esta especie.

Estudios como los realizados para *Rhodnius* spp. y *T. dimidiata* evidencian la necesidad de evaluar la estructura genética de otras especies vectores en Colombia, permitiendo entender el comportamiento de sus poblaciones y de esta manera, poder establecer estrategias de control vectorial más eficaces.

En esta investigación se muestran resultados preliminares de la estructura genética de *Triatoma venosa* (Stål), un vector secundario de importancia epidemiológica por su amplia distribución geográfica (Guhl *et al.* 2002) y cuyos hábitos y hospederos son desconocidos. Hasta el momento, *T. venosa* ha sido registrado en forma silvestre en Ecuador (Azuay, Sucumbios, Napo) y en colonias domésticas en Colombia (Boyacá, Santander) (Abad-Franch y Aguilar 2003). Se empleó la técnica RAPD (Williams *et al.* 1990), con el fin de analizar la estructura genética y detectar variabilidad genética de poblaciones domésticas y peridomésticas de esta especie capturadas en el departamento de Boyacá, Colombia, para poder estimar el riesgo epidemiológico que representa la población peridoméstica en la transmisión de la enfermedad de Chagas en Colombia. Este estudio se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical - CIMPAT, Universidad de los Andes, Bogotá - Colombia, en el año 2003.

Materiales y Métodos

Los insectos evaluados se capturaron en dos hábitat diferentes: en gallineros localizados fuera de las viviendas habitadas o hábitat peridoméstico (15 individuos) y dentro de las viviendas o domicilio (15 individuos), para un total de 30 individuos adultos provenientes del departamento de Boyacá, en los municipios de Somondoco (veredas de Cabrera y Barreras), Guateque (veredas de llano grande, Tincachoque, y Cantoras) y Sutatenza (veredas de Sisquique, Ovejeras, el Gaque y Piedra Larga), localizados alrededor de los 1.700 msnm.

El procedimiento de extracción de ADN genómico total se realizó mediante la maceración de las seis patas de cada indivi-

duo, previamente lavadas con hipoclorito para evitar contaminación con ADN foráneo, seguida de una purificación mediante el kit Aqua Pure para el aislamiento de ADN a partir de tejidos de BIO-RAD®. El ADN se almacenó a -20°C hasta el momento de su análisis. Se empleó el kit Ready To Go RAPD de Amersham Pharmacia®, rehidratando cada perla con 19 µl de agua destilada y agregando 25 pmol de iniciador (5 µl). Posteriormente, se dividió el contenido en cuatro tubos, a cada uno de los cuales se le agregaron 2 µl de ADN templado, para un volumen final de reacción de 8 µl. El perfil térmico utilizado consistió en: un paso inicial de denaturación a 95°C por 5 minutos, seguido de 44 ciclos de 95°C por 1 min, 36°C por 1 min, 72°C por 2 min y un paso final de elongación a 72°C por 7 min.

Se analizaron 15 individuos peridomésticos y 15 individuos domésticos con los iniciadores RTG 2, 3, 4 y 5 de Pharmacia® (Tabla 1), que permitieron obtener un total de 70 marcadores.

La visualización de los productos de RAPD se realizó en geles de poliacrilamida al 6% con un tiempo de corrido electroforético de 3 h a 80 V, los cuales fueron posteriormente teñidos con el kit Silver Stain Plus de Pharmacia® siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

Se construyeron matrices binarias de datos de acuerdo con Welsh *et al.* (1992) en donde se representa la información genética colectada para cada individuo. La matriz de datos se analizó con los programas RAPDLOT (Kambhampati *et al.* 1992) y SYNTAX2000 (Podani 1993), los cuales permiten crear una matriz de distancia empleando el índice de Disimilaridad de Jaccard. Posteriormente, esta matriz fue utilizada para construir un dendrograma mediante el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group with Averaging).

Se empleó el programa de RAPDDIST para establecer las distancias genéticas de Nei (1973) entre poblaciones a partir de una matriz de datos y, posteriormente con la

Tabla 1. Secuencia de los iniciadores RTG de Pharmacia® utilizados en las reacciones de amplificación RAPD

Iniciador RTG	Secuencia
2	5'-d[GTTCGCTCC]- 3'
3	5'-d[GTAGACCCGT]- 3'
4	5'-d[AAGAGCCCGT]- 3'
5	5'-d[AACGCGCAAC]- 3'

Tabla 2. Valores de Fst y Nm calculados para las poblaciones de *Triatoma venosa* mediante el programa RAPDFST

Metodología	Entre las poblaciones	
Wright (1978)	Fst	0,047
	Nm	5,0
Weir & Cockerham (1984)	Fst	0,056
	Nm	4,2

matriz de distancia, se generó el dendrograma con 1.000 repeticiones.

Resultados

Con los 4 iniciadores empleados, no se observa un patrón de bandeo definido para ninguna de las dos poblaciones estudiadas (Fig. 1), similar a lo señalado en *Triatoma dimidiata* (Jaramillo *et al.* 2003), como si se pudo establecer previamente para *Rhodnius prolixus* y *R. colombiensis* (Jaramillo *et al.* 2001), donde claramente se definían patrones particulares de polimorfismos mediante la técnica de RAPD para cada especie estudiada.

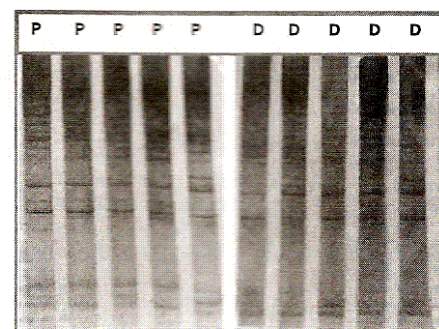


Figura 1. Geles de poliacrilamida al 6% teñidos con el kit Silver Stain Plus de Pharmacia®, donde se visualizan los productos de amplificación por RAPD con el iniciador RTG 5 de Pharmacia®, para cinco individuos peridomésticos (P) y cinco domésticos (D) de *Triatoma venosa*.

Para *T. venosa* se observa una homogeneidad en los patrones de bandeo entre las dos poblaciones evaluadas (Fig. 1), lo que sugiere una poca diferenciación genética entre las dos poblaciones estudiadas de este insecto.

El análisis mediante los programas SYNTAX 2000 y RAPDLOT generó un dendrograma donde no se define un cluster para cada población de insectos, sino que se ve una distribución mezclada de los individuos de las diferentes poblaciones (Figs. 2-3).

Al realizar el análisis con el programa RAPDFST se calculó el Fst de Wright (1951) y de Weir & Cockerham (1984) (Tabla 2), para las dos poblaciones en conjunto. Con la metodología de Wright y de Weir & Cockerham, el Nm fue suficiente para mantener homogeneidad genética, debido a que al menos un individuo debe migrar por generación. Estos resultados indican una gran movilidad de los insectos.

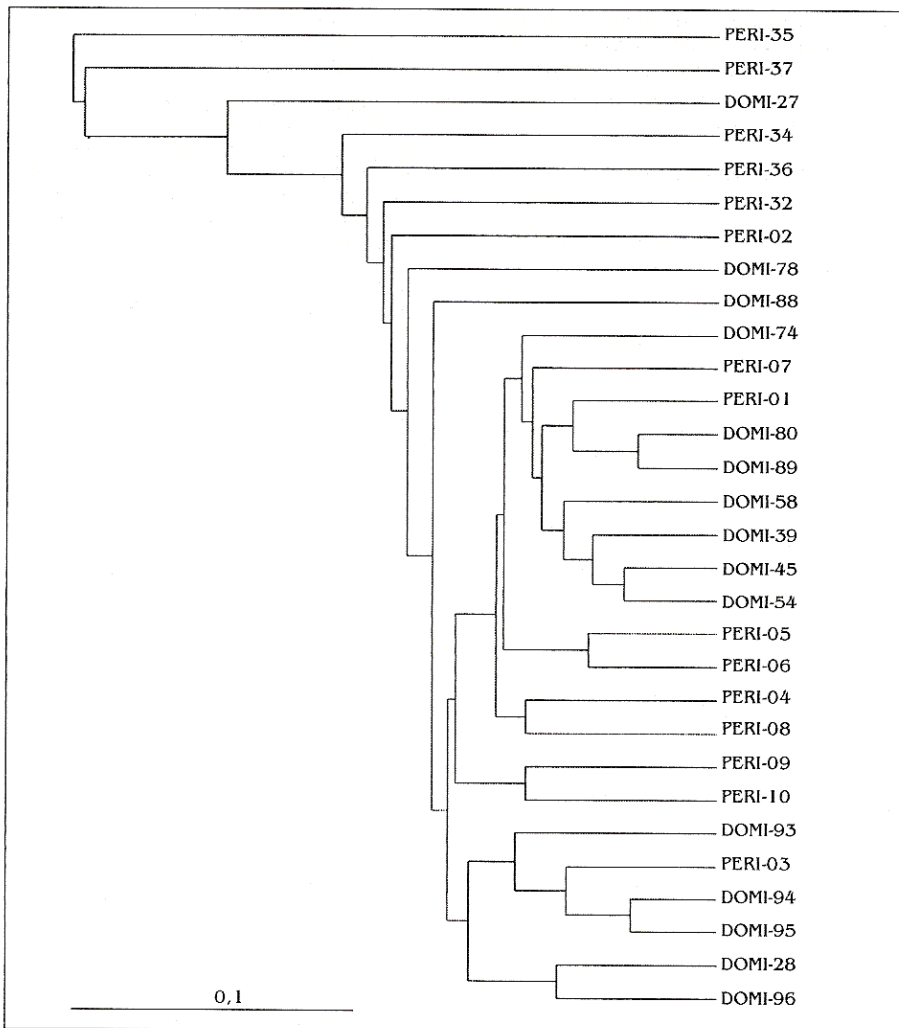


Figura 2. Dendrograma de los individuos de las poblaciones doméstica (DOMI) y peridoméstica (PERI) de *Triatoma venosa* generado con RAPDPLOT, y el método UPGMA, para 70 loci.

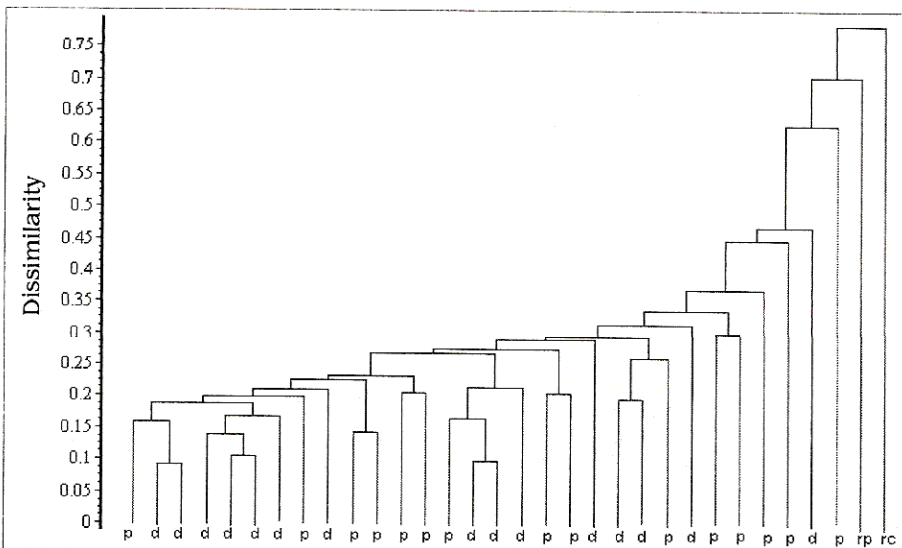


Figura 3. Dendrograma generado con SYNTAX 2000, a partir de 70 marcadores RAPD con los iniciadores 2, 3, 4 y 5 para individuos de *Triatoma venosa* peridomésticos (p) y domésticos (d). Se utilizó un individuo *Rhodnius prolixus* (rp) y un individuo *Rhodnius colombiensis* (rc) como grupos de exclusión.

tos entre los dos ambientes y un elevado flujo genético que no permite el establecimiento de diferenciación genética entre las dos poblaciones evaluadas.

El análisis de los datos con el programa RAPDDIST permitió generar un dendrograma para las dos poblaciones evaluadas (Fig. 4). En este dendrograma no se obser-

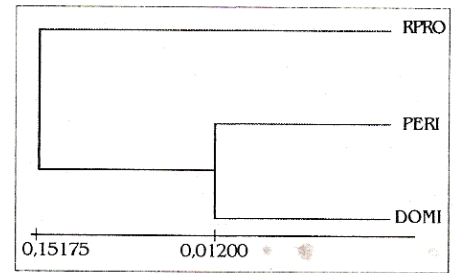


Figura 4. Dendrograma generado con el programa RAPDIST de la distancia genética de Nei y Li (1972), entre las poblaciones peridoméstica y doméstica de *Triatoma venosa*, empleando el método UPGMA y 1.000 repeticiones. Se empleó *Rhodnius prolixus* como grupo de exclusión.

va una diferenciación genética entre la población doméstica y peridoméstica con respecto a los individuos utilizados como grupo de exclusión, dado que el cluster que agrupa a las dos primeras presenta la misma distancia genética, indicando de esta manera la poca diferenciación genética encontrada entre las poblaciones evaluadas de *T. venosa* en este estudio.

Discusión

Los resultados obtenidos a partir de los marcadores moleculares RAPD proveen una base molecular para evaluar las relaciones genéticas entre los triatomíneos (García *et al.* 1998). Esta técnica se ha utilizado ampliamente para analizar el genoma de otros insectos vectores como el vector de la malaria *Anopheles gambiae* (Favia *et al.* 1994), o para identificar poblaciones de *Aedes albopictus* (Kambhupati *et al.* 1992). Jaramillo *et al.* (2001), mediante RAPD, encontraron diferencias entre *Rhodnius prolixus* y *R. colombiensis* lo que llevó a proponer que el control de poblaciones domésticas de *Rhodnius* no se verían influenciadas de manera importante por invasiones silvestres (Guhl y Schofield 1996).

Con los resultados preliminares obtenidos entre las poblaciones de *T. venosa* se sugiere que ocurre un elevado flujo genético entre las mismas, debido a que agrupan en la misma rama del dendrograma (Fig. 4), diferente a lo observado para *Rhodnius prolixus* (de carácter domiciliado) y *R. colombiensis* utilizados como grupos de exclusión en este estudio (Fig. 3), los cuales no presentan flujo genético entre sí (Jaramillo *et al.* 2001).

Adicionalmente, *T. venosa*, aparentemente presenta un flujo genético mayor que el indicado para otras especies como *Rhodnius* (Jaramillo *et al.* 2001), *T. dimidiata* (Jaramillo *et al.* 2003), o para mariposas como *Papilio glaucus* en Ohio, Georgia y Florida donde se registró un Nm de -0,0032 (Bossart y Scriber 1995).

Los valores de Nm obtenidos para *T. venosa* indican una migración significativa de individuos por generación o un potencial de dispersión suficiente para mantener homogeneidad genética, debido a que son

mayores a 1, lo que hace que las frecuencias alélicas permanezcan homogéneas en las poblaciones (Wright 1931). Con los resultados se observa que hay migración de por lo menos 4,2 insectos por generación entre las poblaciones (Tabla 2), lo que contribuiría a mantener homogeneidad genética y a hacer más difícil el control de este vector en la transmisión de la enfermedad de Chagas, en el caso que *T. venosa* se encontrara como un vector eficiente de la transmisión del parásito.

Los valores de *Fst* obtenidos (Tabla 2), indican que hay poca diferenciación entre las poblaciones de *T. venosa*; es decir, que hay un intercambio genético entre las poblaciones evaluadas.

Estos hallazgos son similares a los encontrados para *T. dimidiata* (Jaramillo *et al.* 2003), debido a que las poblaciones no domiciliadas de *T. venosa*, al igual que las poblaciones no domiciliadas de *T. dimidiata*, estarían representando un riesgo epidemiológico en la transmisión de la enfermedad de Chagas.

Dentro del marco del programa nacional de control y eliminación de la enfermedad de Chagas en Colombia, estudios como éste contribuyen en el entendimiento del comportamiento de especies de triatominos de importancia secundaria que pueden tener la capacidad de invadir viviendas rurales, siguiendo de esta manera las recomendaciones hechas por Schofield *et al.* (1999).

La relevancia de *T. venosa* en la transmisión de la enfermedad de Chagas es desconocida hasta el momento, ya que no hay estudios que indiquen una tasa de infección por tripanosomas, pero, dado el elevado flujo genético que sugieren los resultados de este estudio preliminar, podría ser un vector potencial de difícil control.

Conclusiones

- Con el número de individuos evaluados, no se encuentra una divergencia genética elevada entre las poblaciones de *T. venosa*.
- Mediante la técnica de RAPD no se obtuvieron patrones de bandeo que permitieran diferenciar las poblaciones doméstica y peridoméstica de *T. venosa*.
- El índice de fijación (*Fst*) y la tasa efectiva de migración (*Nm*) estimados, sugieren un flujo genético suficiente para mantener una homogeneidad genética entre las poblaciones.
- Existe flujo de genes entre las poblaciones domiciliadas y peridomiciliadas estudiadas de *T. venosa*.
- El movimiento de los insectos entre las poblaciones estudiadas hace necesario un mayor control del peridomicilio en los programas de eliminación de insectos vectores de la enfermedad de Chagas.

• Aunque hasta el momento se desconoce la capacidad vectorial de *T. venosa*, el posible flujo genético encontrado puede ser un factor determinante para el aumento de su capacidad vectorial.

Agradecimientos

Este proyecto se llevó a cabo gracias al apoyo financiero de Colciencias proyecto Cód: 1204-04-13018 y la Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes.

Literatura citada

- ABAD-FRANCH, F.; AGUILAR, M. 2003. Control de la enfermedad de Chagas en el Ecuador. OPS/OMS - Ministerio de Salud Pública del Ecuador. Quito, Ecuador.
- BORGES, É.; ROMANHA, A.; DIOTAUTI, L. 2000. Uso do Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) no estudo populacional do *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 16 (Sup.2): 97-100.
- BOSSART, J. L.; SCRIBER, J. M. 1995. Maintenance of ecologically significant genetic variation in the tiger swallowtail butterfly through differential selection and gene flow. *Evolution* 49: 1163-1171.
- CARLIER, L.; MUÑOZ, M.; DUJARDIN, J. P. 1996. A RAPD protocol for Triatominae. En: Proceedings of the International Workshop on Population Genetics and Control of Triatominae (C.J. Schofield, J.P. Dujardin & J. Jurberg, eds.), p. 81-83. México, D. F.: Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencias Epidemiológicas.
- FAVIA, G.; DIMOPOULUS, G.; LOUIS, C. 1994. Analysis of the *Anopheles gambiae* genome using RAPD markers. *Insect. Mol. Biol.* 3: 149-157.
- GARCÍA, A. L.; CARRASCO, H. J.; SCHOFIELD, C. J.; VALENTE, S.A.; FRAME, I. A.; STOTHARD, R.; MILES, M. A. 1998. Random amplification of polymorphic DNA as a tool for taxonomic studies of Triatomine bugs (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.* 35: 38-45.
- GUHL, F. 2000. Programas en la eliminación de la transmisión de la enfermedad de Chagas en Colombia. *Medicina* 22 (2): 96-104.
- GUHL, F.; SCHOFIELD, C. J. 1996. Population genetics and control of triatominae. *Parasitology Today* 12: 169-170.
- GUHL, F.; MONTOTOYA, R.; PINTO, N.; AGUILERA, G.; DAVIES, C.; CAMPBELL-DENDRUM, D. 2002. Efecto del clima y del medio ambiente en la distribución de triatominos y enfermedad de Chagas en Colombia. *Biomédica* 22 (1): 35.
- HARRY, M.; ROBIN, S.; LACHAISE, D. 1998. L'utilisation de marqueurs génétiques polymorphes (RAPDs) en entomologie évolutive et appliquée. *Annales de la Société Entomologique de France*, 34 :9-32.
- JARAMILLO, C.; MONTAÑA, M. F.; CASTRO, L.; VALLEJO G.; GUHL, F. 2001. Differentiation and genetic analysis of *Rhodnius prolixus* and *Rhodnius colombiensis* by rDNA and Random Amplified Polymorphic DNA. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96 (8): 1043-1048.
- JARAMILLO, C.; RAMÍREZ, C.; DELGADO, P.; PINTO, N.; AGUILERA, G.; GUHL, F. 2003. Estudio preliminar de la estructura genética de poblaciones domésticas, peridomésticas y silvestres de *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae). *Revista Colombiana de Entomología* 29 (1): 1-5.
- KAMBHAMPATI, S.; BLACK, W. C. IV; RAI, K. S. 1992. RAPD-PCR of mosquito species and populations: techniques, statistical analysis and applications. *J. Med. Entomol.* 29:939-945.
- MORENO, J.; GALVAO, C.; JURBERG, J. 1999. *Rhodnius colombiensis* sp. N. da Colombia, com quadros comparativos entre estruturas fálizas do genero *Rhodnius* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomol. Vect.* 6: 601-617.
- NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 3321-3323.
- PODANI, J. 1993. SYNTAX. Computer programs for multivariate data analysis in Ecology and Systematics. Scientia Publishing. Budapest.
- SCHOFIELD, C. J.; DIOTAUTI, L.; DUJARDIN, J. P. 1999. The Process of Domestication in Triatominae. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94, Suppl. 1: 375-378.
- WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of populations structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- WELSH, J.; MCCLELAND, M. 1990. Fingerprinting using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Research* 18: 7213-7218.
- WELSH, J.; PRETZERNAN, C.; POSTIC, D.; GIRON, I. S.; BARANTON, G.; MCCLELLAND, M. 1992. Genomic fingerprinting by arbitrary primer polymerase chain reaction resolves *Borrelia burgleri* into three distinct phylogenetic groups. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42: 370-377.
- WILLIAMS, J. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2000. Weekly Epidemiol. Rec. No. 2: 10-12.
- WRIGHT, S. 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16: 97-159.
- WRIGHT, S. 1951. The genetical structure of populations, *Ann. Eugen.* 15: 323-354.

Recibido: Ago. 01/2003

Aceptado: Nov. 30/2003