

"Comparación de Frecuencias génicas en dos generaciones de *Triatoma dimidiata*, utilizando técnicas de genética molecular RAPDS-PCR"¹

MSc. Maria Carlota Monroy; Lic. Juan José Chávez; MSc. Sergio Melgar; Licda. Antonieta Rodas; Licda. Silvia Bor; Licd.; Regina Rosales; Licda. Eunice Enríquez; PhD. Patricia Dorn.

Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología.
Escuela de Biología; Universidad de San Carlos de Guatemala.
e-mail: cmonroy@usac.edu.gt • lenap@usac.edu.gt
http://www.usac.edu.gt/~lenap

RESUMEN

La biología molecular ha sido aplicada al estudio de genética de poblaciones y recientemente se han enfocado estas técnicas a la investigación de triatomíneos. En esta investigación se aplicó la técnica de Amplificación al Azar de ADN Polimórfico (RAPD's) para profundizar en el conocimiento de los patrones reproductivo y migratorio de *Triatoma dimidiata* debido a que se ha detectado la reinfestación de *T. dimidiata* en casas rociadas. Siendo *T. dimidiata* el principal vector de la enfermedad de Chagas, se planteó conocer mejor sus patrones reproductivos y migratorios, ya que esto podría contribuir a mejorar las estrategias para el control de este vector.

Se seleccionaron principalmente, dos tipos de muestras: individuos control, resultantes del cruce entre dos progenitores vírgenes conocidos y muestras de campo en las cuales se desconocía a los progenitores machos. Los individuos de campo fueron colectados en los municipios de Ixhutatán y Pueblo Nuevo Viñas del Departamento de Santa Rosa.

Entender el proceso genético relacionado con la copulación y fecundación de estos triatomíneos permitió enfocar mejor las alternativas contra la reinfestación de las casas rociadas. Los resultados obtenidos sugieren que las hembras de *T. dimidiata* copulan con varios machos. Esto se apreció visualmente al graficar con dendrogramas los datos de los análisis de agrupamiento realizados entre los individuos control y los individuos de campo. Es posible que sean los machos de *Triatoma*

dimidiata los que determinen los movimientos poblacionales de esta especie, ya que son inducidos a copular con varias hembras y que tienen una mayor capacidad de vuelo.

Este es el primer trabajo que documenta la poliandria en *Triatoma dimidiata* y plantea el papel preponderante del macho de esta especie en los movimientos poblacionales.

Se recomienda ampliar este tipo de estudio fundamentando el análisis con una mayor cantidad de loci evaluados y utilizar técnicas alternativas al corrimiento de las muestras en geles de agarosa, que permitan una mejor resolución del patrón de bandedo.

INTRODUCCIÓN

El presente proyecto es una continuación de una serie de trabajos de investigación que se han estado realizando desde 1992 en relación con los vectores de la enfermedad de Chagas. En el año 2000 se inició una campaña nacional para el control de los vectores de esta enfermedad. El financiamiento fue aportado por el gobierno de Japón y el Ministerio de Salud Pública de Guatemala.

Investigaciones previas han mostrado que *Triatoma dimidiata* se encuentra localizada como vector en 18 de los 22 departamentos, en condiciones silvestres y peridomiciliares, y recientemente se ha identificado la reinfestación de las casas rociadas por los programas de

¹ Proyecto financiado por la Dirección General de Investigación de la Universidad de San Carlos de Guatemala; la Organización Mundial de la Salud, proyecto TDR y NETROPICA.

control del vector (Monroy et al, 1995). Frente a esta situación se planteó la posibilidad de contribuir en la mejora del enfoque estratégico para el control de *T. dimidiata* como vector de la enfermedad de Chagas, profundizando en el estudio poblacional de esta especie, aplicando la biología molecular a la genética de poblaciones. Una de las causas de movimientos de población en insectos son estímulos reproductivos, este proyecto pretendió determinar algunos detalles de la reproducción de esta especie.

Se aplicó la técnica RAPD's para crear un perfil del genoma de los individuos control, de los cuales se conocía a los dos progenitores, y de individuos de campo, de los cuales se desconocía al progenitor macho. De esta forma se estudió el papel de la reproducción en el comportamiento en movimientos de población de la especie, determinando si las hembras recibían el esperma de uno o varios machos y la forma en que fecundaban sus huevos. Por otro lado se cuantificaron las frecuencias génicas de una población de *Triatoma dimidiata* del Municipio de Ixhuitán y Pueblo Nuevo Viñas, en el departamento de Santa Rosa, estableciéndose así las bases necesarias para determinar posibles reinfestaciones posteriores a los rociamientos.

METODOLOGÍA.

Los individuos de *Triatoma dimidiata* se colectaron en los municipios de Ixhuitán y Pueblo Nuevo Viñas del Departamento de Santa Rosa. Se seleccionaron las ninfas de quinto estadio y se aisló cada una en un frasco, hasta que llegaran al estadio adulto. Los individuos adultos fueron sexados para realizar cruces selectivos. Unas hembras vírgenes se cruzaron con un solo macho y otras con dos. Los huevos que ovipuso cada hembra con el macho seleccionado se colocaron separadamente hasta su eclosión. Las crías se alimentaron hasta que alcanzaron el primero, segundo o tercer estadio larvario. Los adultos parentales y las crías se preservaron en alcohol al 95% con 5% de glicerol a 4 °C. Luego se cortaron las patas, se lavaron y se extrajo el ADN. También se seleccionaron hembras de campo, desconociéndose se habían copulado con uno o más machos. Las crías de estas hembras se procesaron como muestras desconocidas.

Por la diferencia de tamaño significativa entre estadios se tomó el siguiente patrón para la extracción de ADN del músculo de las patas.

ESTADIO	CANTIDAD DE PATAS A USAR
Adulto hembra o macho	Dos patas
Quinto estadio	Dos patas
Cuarto estadio	Tres patas
Tercer estadio	Tres Patas
Segundo Estadio (sin ingurgitar)	Seis Patas o todo el insecto
Primer estadio (sin ingurgitar)	Todo el insecto.

Las patas de cada individuo preparadas para la extracción, se colocaron en un eppendorf estéril con 100 L de buffer. Las patas se maceraron para extraer, mecánica y químicamente el ADN de las células musculares. Se centrifugaron los macerados y se colocaron 30 minutos en Baño María a 65 °C. Posteriormente se les agregó a cada uno, 14 L de acetato de potasio. Después de 15 minutos de incubación en hielo, se centrifugaron 10 minutos y se transfirió el sobrenadante de cada eppendorf a uno nuevo y estéril. A cada sobrenadante se le agregaron 200 L de etanol al 95% y se centrifugó nuevamente por 20 minutos. Cada precipitado se lavó con etanol al 70% y 100% y una vez seco, se resuspendió en una solución de TE con 1 U de ARNasa. El ADN extraído se mantuvo 20° C.

Amplificación de ADN y Corrimiento de geles:

Para amplificar el ADN se crearon "in vitro" las condiciones necesarias para que ocurriera la replicación. Para eso se agregaron 17 L de una solución con "primers" L4 ó L1 de Operon, nucleótidos y cloruro de magnesio. Luego se adicionaron 2 L de ADN y 1 L de Taq polimerasa. Finalmente se colocaron las muestras en el termociclador. Este aparato puede variar drásticamente de temperaturas elevadas a temperaturas bajas. Se programó para que realizara 34 ciclos. En cada ciclo la temperatura variaba de la siguiente manera: 1 minuto a 94 °C, 2 minutos a 30 °C y 1 minuto a 72 °C.

Después de amplificar las muestras se utilizaron 7 L de solución con amplicones (el resultado de la amplificación) y 2 L de colorante para cargar los pozos y correr las muestras amplificadas por 75 minutos a 100 voltios en una cámara de electroforesis BIORAD. Se utilizó un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. La lectura de las bandas se realizó con un transiluminador y se fotografiaron con una cámara digital Olympus de 1.3 megapixels. Las fotografías fueron trasladadas a una computadora IBM.

Los "primers" utilizados para la amplificación fueron L4 (5'-GTGGATGCGA-3') con un peso molecular de 3099 D, L1 (5'-CGGCCCTG G-3') con un peso molecular de 2996 D y H5 (5'-TAGGATCAGA-3') con un peso molecular de 3067 D, de la casa Operon. Para el análisis de los datos se hizo el supuesto que la población de triatomínos en esa región estaba en equilibrio Hardy-Weinberg.

Los datos fueron analizados con el programa RFLP-SCAN, el cual fue proporcionado por el Dr. Andreas Langsdorf de la Universidad de Giessen, Alemania. Este programa calcula la densidad óptica de las imágenes de geles, reconociendo los carriles y detectando con precisión la presencia de bandas. Una vez detectadas las bandas, y calibrados los marcadores moleculares (soluciones con distintos fragmentos de ADN con pesos moleculares conocidos), el programa calcula el peso molecular de cada banda, determina índices de similitud y genera dendrogramas.

RESULTADOS

PRIMERS O CEBADORES

Los primer L1 y L4 de Operon pueden ser seleccionados para amplificar con RAPD's regiones del genoma de *Triatoma dimidiata*. No se recomienda el uso del primer H5 de Operon ya que ofrece una amplificación muy pobre en la mayoría de especímenes de *Triatoma dimidiata*.

FRECUENCIAS GÉNICAS

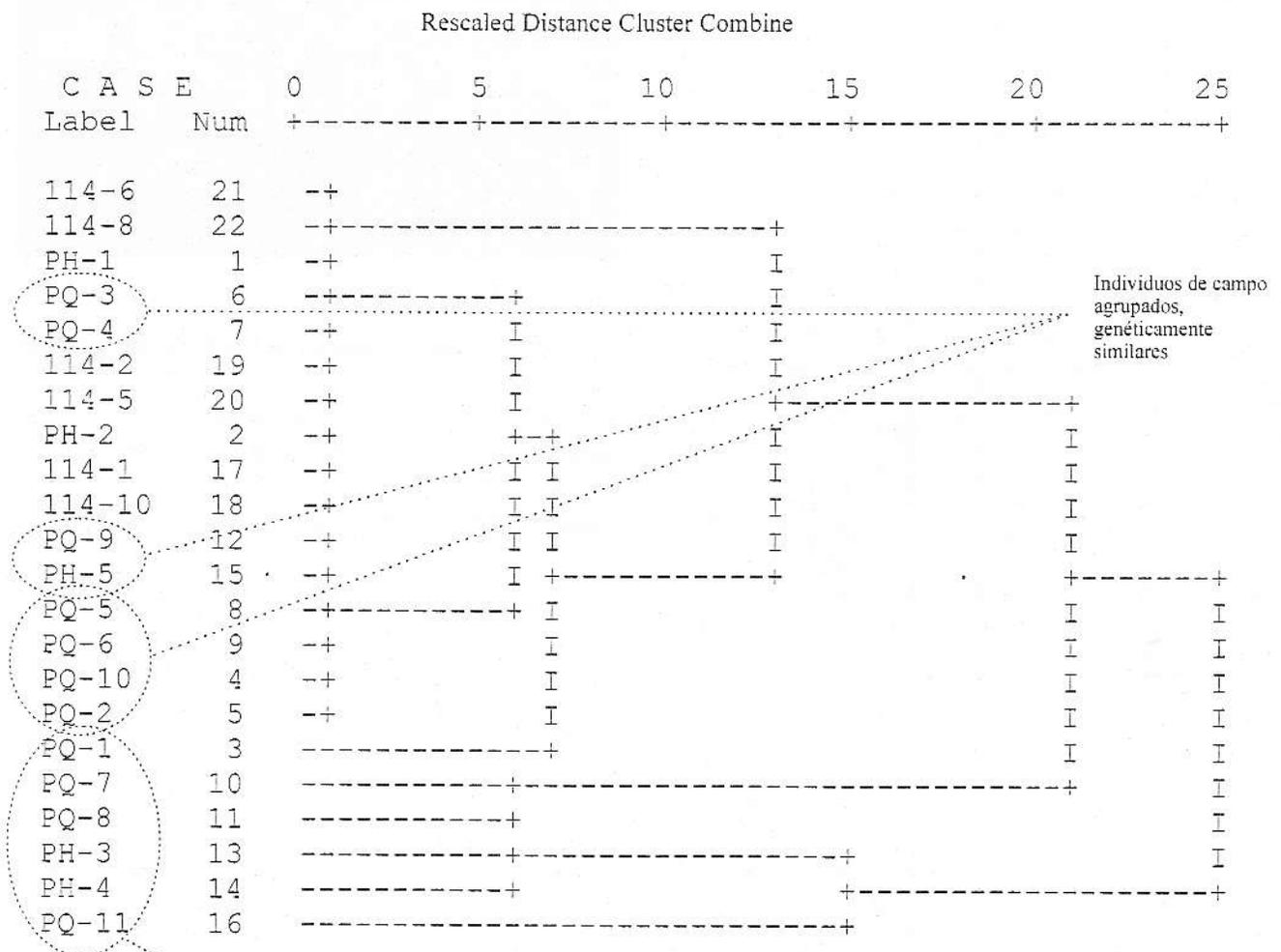
Se seleccionaron 35 individuos para calcular las frecuencias génicas. Con el "primer" L4 se obtuvieron resultados válidos para los 35 individuos; el "primer" L1 dio resultados válidos para 21 individuos. Con el L1 se determinaron 13 loci de los cuales solamente 7 tenían frecuencias comprendidas entre 0.1 y 0.6, con el L4 se determinaron 6 loci de los cuales solo 3 tenían frecuencias entre 0.1 y 0.6. El estudio por lo tanto se realizó con un total de 10 loci.

Frecuencias obtenidas con el "primer" L1

	LOCI →	A	B	C	D	E	F	G						
	173	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	190	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
	191	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
I	192	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
N	193	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
D	199	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
I	229	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0
V	230	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
I	305	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
D	426	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0
U	465	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0
O	474	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1
S	484	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
	514	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	526	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	527	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	528	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
	604	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1
	618	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	622	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	642	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Frecuencias	0.024	0.423	0.024	0.512	0.622	0.127	0.024	0.074	0.155	0.049	0.127	0.024	0.049

ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO JERÁRQUICO ENTRE INDIVIDUOS DE LAS FAMILIAS 114A, PH y PQ

Dendrograma utilizando Average Linkage (Between Groups)



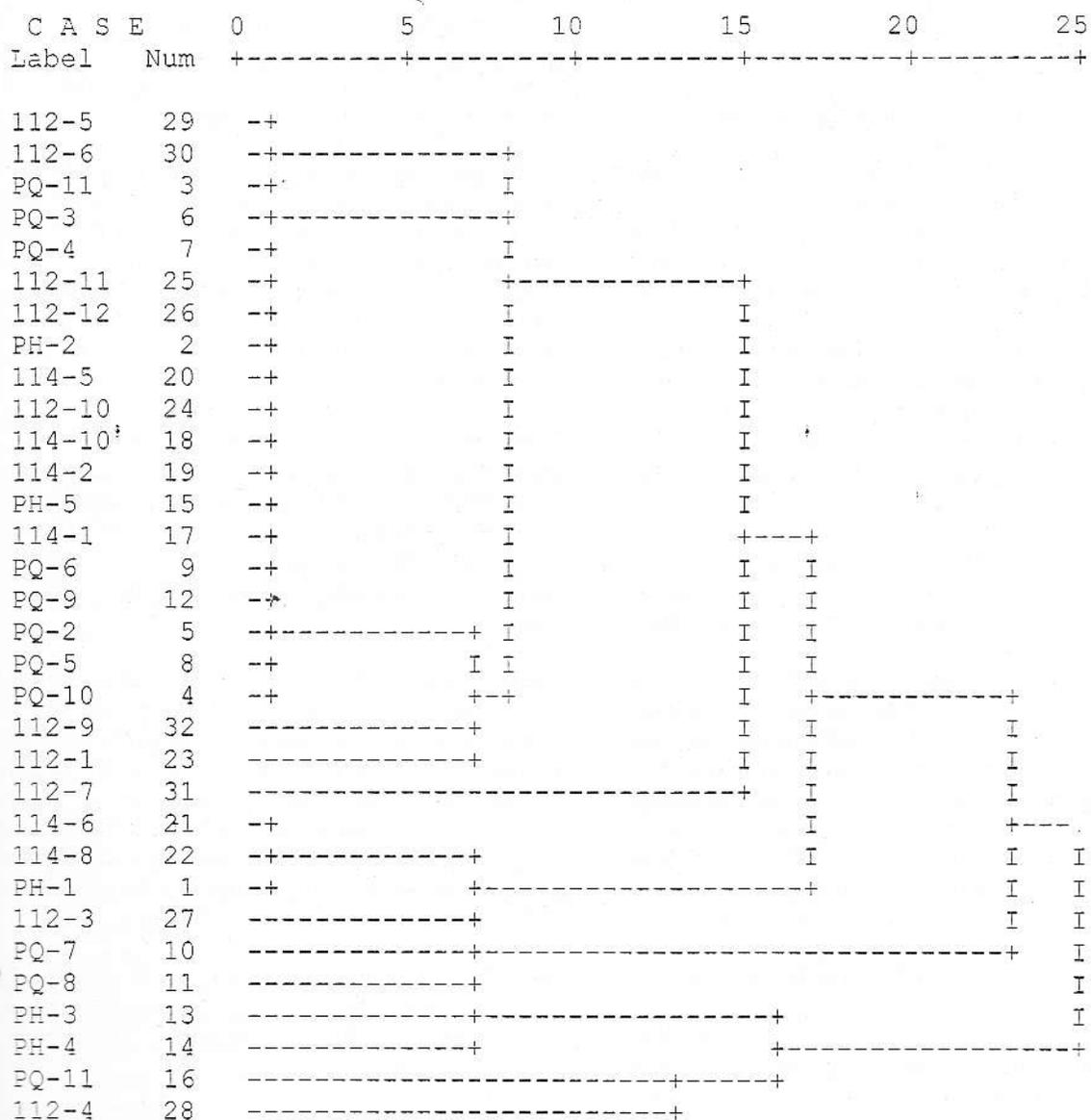
Individuos de campo dispersos, con índices de similitud bajos, genéticamente distantes.

Las intersecciones entre individuos cercanas a 0 en la escala superior, indican que los individuos están relacionados genéticamente. Entre más se acercan las intersecciones entre los individuos a 25 en la escala superior, más distantes genéticamente se encuentran los individuos.

ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO JERÁRQUICO ENTRE
INDIVIDUOS DE LAS FAMILIAS 114, 114A PH y PQ

Dendrograma utilizando Average Linkage (Between Groups)

Rescaled Distance Cluster Combine



COPULACIÓN

Los análisis de agrupamiento realizados revelan que las crías de campo (las crías de las familias PH y PQ) aparecen más dispersas en los dendrogramas que las crías control (las crías de las familias 114, 114 A y 112). Esta mayor dispersión de las crías de campo, frente a la descendencia de familias conocidas que aparecen en bloques más compactos, puede estar indicando que proceden de la copulación de una hembra con más de un macho.

DISCUSIÓN

Este trabajo es uno de los primeros que se realizan en Guatemala en relación con genética de poblaciones de insectos utilizando técnicas moleculares como RAPDS-PCR. La estandarización y condiciones constantes - como el que las mismas personas realicen la amplificación y el corrimiento de geles- son aspectos importantes para el éxito de la técnica. Las amplificaciones con los primers L1 y L4 de la casa "Operon" demostraron que éstos pueden ser utilizados para amplificar regiones del genoma de triatominos ofreciendo resultados reproducibles con la técnica RAPD's. No así el primer H5 de la misma casa con el cual no se pudieron obtener amplificaciones satisfactorias.

En los estudios de genética de poblaciones es necesario determinar las frecuencias génicas de los alelos que se desean analizar. Este debe ser un paso previo al estudio de índices de similitud o grados de parentesco, pues es necesario seleccionar regiones del genoma con una frecuencia intermedia para evitar cualquier tipo de sesgo en los análisis subsecuentes. Con la determinación de las frecuencias génicas se pudieron seleccionar únicamente 10 loci para realizar los análisis de agrupamiento. Comparando esta cifra con estudios análogos, resulta que este número de loci es bajo. Esto es una limitante que se presentó en la investigación, ya que disminuyó el rigor en el análisis de agrupamiento. Por lo tanto, se sugiere ampliar el estudio con los resultados de amplificaciones realizadas con los "primers" L2 y H3 de la casa Operon.

Luego de seleccionar las regiones del genoma para analizar, se estudiaron dichas regiones en las muestras control y en las muestras de campo. Los amplicones fueron separados por electroforesis y analizados con el software "RFLPscan". Con este programa se determinó

la presencia o ausencia de bandas traduciendo el patrón de cada individuo a una base binaria para calcular los índices de similitud necesarios para generar los dendrogramas. Los dendrogramas son uno de los diversos recursos estadísticos para realizar análisis de agrupamientos. La interpretación inicia reconociendo visualmente los grandes bloques o grupos. Seguidamente se identifican los subgrupos, hasta llegar a los núcleos, los que traducen la mayor similitud encontrada entre los individuos estudiados. En el primer dendrograma se ve claramente que los individuos de campo (PQ-1, PQ-7, PQ-8, PQ-11, PH-3, PH-4) no aparecen agrupados, están dispersos. Esto significa que no están emparentados entre sí. El resto de individuos de campo y los controles aparecen agrupados. Esta interpretación descriptiva del dendrograma sugiere que los individuos de campo agrupados son hermanos completos, provienen de la copulación de la hembra con un solo macho y que existe una alta probabilidad para que los individuos de campo dispersos en el dendrograma provengan de la copulación de una hembra con varios machos. Estos resultados señalarían que la reproducción puede ser un factor desencadenante de movimientos poblacionales o migratorios, coincidiendo con los modelos panmícticos de reproducción.

Como las hembras de *T. dimidiata* disponen de una espermateca para almacenar el esperma, la copulación frecuente se observa fácilmente en el laboratorio. Los machos están mucho más activos para poder transmitir sus genes a generaciones sucesivas. Esto podría explicar los hallazgos de proporciones ligeramente diferentes de machos y hembras en algunos domicilios.

Tabaru et. al. (1995) señaló que los machos tienen una mayor capacidad de vuelo que las hembras. Un patrón etológico de este tipo tiene generalmente un estímulo reproductivo. En este caso el patrón de migración encontrado estaría relacionado con el estímulo reproductivo que sufren los machos al verse forzados a competir y buscar las hembras dispuestas a la copulación (en este caso sería poco probable que las ninfas se vean inducidas a este tipo de patrón migratorio).

Este dato aunado a la necesidad de fecundaciones sucesivas señalan la posibilidad que sean los machos los que determinen los movimientos poblacionales de *Triatoma dimidiata*

Uno de los objetivos de la propuesta original de investigación se relaciona con la búsqueda de

alternativas a la reinfestación de *Triatoma dimidiata*. Este proyecto permitió esclarecer los procesos que pueden inducir movimientos poblacionales desde ambientes silvestres a domiciliarios. La comprensión de las posibles causas que originan este comportamiento permitiría plantear alternativas a los procesos de reinfestación de esta especie. Esta información puede ser utilizada en relación a los rociamientos con insecticidas, ya que éstas deberían coincidir con las épocas de mayor migración de machos. Para esto se habría que realizar otro trabajo de investigación en la que se estudiaran los movimientos mensuales.

Los resultados de laboratorio de este proyecto junto con los datos aportados en trabajos previos de campo, orientan la procedencia de la reinfestación de las viviendas en los machos de *T. dimidiata*, ya que éstos son los más afectados por el estímulo reproductivo, al verse en la necesidad de movilizarse para copular varias veces

con las hembras fértiles.

Establecer los factores de riesgo de reinfestación de vectores es determinar las causas y condiciones que determinan este comportamiento, uno de los factores de riesgo estudiados en este proyecto es la capacidad reproductiva de las hembras como detonante de la migración en los machos. En posteriores proyectos se recomienda establecer la frecuencia con la que estas hembras están disponibles para la cópula para determinar la frecuencia de este factor riesgo.

Este es el primer trabajo realizado en Guatemala en donde se especifican las frecuencias génicas de la especie *Triatoma dimidiata*. Estas frecuencias podrán ser considerados en estudios poblacionales posteriores de esta misma especie procedentes del departamento de Santa Rosa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Monroy C, Mejía M., Rodas A. 1995. Ecología intradomiciliar de *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata* y *Triatoma nitida*. Informe anual (Gjet-72) del proyecto de cooperación Guatemala-Japón para la Investigación de Enfermedades Tropicales, JICA, Guatemala.
2. García Beatriz A, Osares Barata JUL, Blanco A. 1995 Enzyme polymorphism among *Triatoma infestan* (Hemiptero: Reduviidae) colonies. *Journal of Medical Entomology* 32 (2):126-133.
3. García B.A., Canali D.M y Blanco A. 1995. Genetic Structure of four species of *Triatoma* (Hemiptera : Reduviidae from Argentina. *J. of Med. Entomol.* 32 (2) : 134-137
4. Lynch M. 1988. Estimation of relatedness by DNA fingerprint. *Mol. Biol. Evol.* 5 : 584-599.
5. Apostol B.L, Black IV W.C, Miller B.R, Reiter P and Beaty B.J. 1993. Estimation of the number of full sibling families at an oviposition site using RAPDS-PCR marker: applications to the mosquito *Aedes aegypti*. *Theor Appl Genet.* 86 : 991-1000
6. Apóstol Barbara, Black IV Willian , Reiter Paul and Miller Barry. 1994. Use of randomly amplified polymorphic DNA amplified by polymerase chain reaction markers to estimate the number of *Aedes aegypti* families at oviposition sites in San Juan Puerto Rico. *Am : J. Trop Med. Hyg.* 51(1): 89-97
7. Tabaru Y, Monroy C, Rodas A, Mejía M, Rosales R. 1999. Geographical distribution of vectors of Chagas Disease and populations at risk of infection in Guatemala. *Md. Entomol. Zool.* 50(1): 9-17
8. Black W.C. IV. 1993. PCR with arbitrary primer : approach with care. *Insect Molecular Biology* 2(1): 1-6
9. Elseth G., Baumgardner K., 1995 *Principles of Modern Genetics*, West Publishing Company, USA.
10. Tabachnich W.J and Black IV W.C. 1995. Making a case for molecular population genetic studies of Arthropod vectors. 1995. *Parasitology Today.* 11 (1):27-29.
11. Williams J.K, Kubelik A.R, LivaK K.J, Rafalski J.A, Tingey S.V 1991. DN polymorphisms amplified by arbitrary primer are useful as genetic marker. *Nucleic Acids. Res.* 18 : 6531-6535