

ARTICULO ORIGINAL

Perfiles isoenzimáticos de poblaciones de *Triatoma infestans* de la Región Oriental y Occidental del Paraguay**Isoenzyme profiles of *triatoma infestans* populations from eastern and western regions of Paraguay*****Acosta N, López E, González N, Fernández MJ, Rojas de Arias A**Departamento de Medicina Tropical
Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción**RESUMEN**

Poblaciones de *Triatoma infestans* provenientes de 4 departamentos endémicos para la enfermedad de Chagas se caracterizaron por medio de la electroforésis de isoenzimas en placas de acetato de celulosa. Se estudiaron 24 ejemplares del Chaco: doce de Boquerón y doce de Presidente Hayes; y 20 de la región Oriental: diez de Cordillera y diez de Paraguari. Se analizaron los sistemas enzimáticos: alfa-GDP, GPI, PGM, 6PGD, IDH y MDH, que abarcan en total 8 loci. Sólo se encontraron diferencias en el sistema alfa-GDP, observándose dos fenotipos: el fenotipo 1 en 38 ejemplares (86,36%) y el fenotipo 2 en 6 ejemplares (13,63%). Este último sólo se encontró en ejemplares del Chaco; en los demás sistemas se obtuvieron los mismos fenotipos en todos los ejemplares, por lo que la variabilidad genética fue baja. Los ejemplares de la región Oriental resultaron todos iguales, sin encontrarse diferencias entre poblaciones domiciliarias y peridomiciliarias de los diferentes departamentos estudiados. El marcado monomorfismo encontrado en las poblaciones estudiadas estaría en concordancia con autores que sugieren una evolución a partir de una pequeña población inicial (efecto fundador) y posterior proceso de deriva génica para las poblaciones de *T. infestans* y para la mayoría de los insectos hematófagos. La poca variabilidad observada constituiría una ventaja para el control químico de estos insectos, ya que se vuelve menos probable la aparición de variantes resistentes. Sin embargo, es importante recalcar la diferencia encontrada en ejemplares del Chaco.

Palabras claves: Isoenzimas, *triatoma infestans*, Paraguay, monomorfismo.**ABSTRACT**

Triatoma infestans populations from 4 departments endemic for Chagas disease, corresponding to the two main regions of Paraguay, were characterized by isoenzymes electrophoresis in cellulose plates. Twenty four specimens from the Chaco region were studied: twelve from Boquerón and twelve from Pte. Hayes. Twenty specimens from the Eastern region were studied: ten from Cordillera and ten from Paraguari. Six enzyme systems were analyzed: alfa-GDP, GPI, PGM, 6PGD, IDH and MDH which involve 8 loci. Only alfa-GDP system showed differences and two phenotypes were found: phenotype 1 was found in 86.36% of the specimens and phenotype 2 in 13.63%. Phenotype 2 was only observed in specimens from the Chaco. In the other systems, the same phenotypes were obtained in all specimens. Consequently, it can be said that the genetic variability found was low. Specimens of the Eastern Region were all the same without any differences between domiciliary and peridomiciliary populations. The marked monomorphism shown by this study would agree with other authors who suggest an evolution from a small initial population (founder effect) and a genetic drift process for *T. infestans* populations. The small variability observed could constitute an advantage for

*Autor Correspondiente: **Dra. Nidia Acosta**, Departamento de Medicina Tropical
Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. Río de la Plata y Lagerenza. Asunción-Paraguay
Email: medicinatropical@iics.una.py

the chemical control of these insects, as the appearance of resistant variants, which could give origin to resistant individuals, is less probable. However, it should be pointed out the difference found in the Chaco specimens.

Keywords: Isoenzymes, *triatoma infestans*, Paraguay, monomorphism.

INTRODUCCION

En Paraguay, al igual que en la mayoría de los países de América Latina, la enfermedad de Chagas constituye uno de los problemas prioritarios en el área de salud pública. Situado en el centro de América del Sur, el país se halla dividido geográficamente por el río Paraguay, en dos regiones: la región Occidental o Chaco y la región Oriental. Estas dos zonas difieren tanto en sus características ecológicas y demográficas así como en la intensidad de la transmisión de la enfermedad de Chagas. La región Occidental es una zona con alta prevalencia, encontrándose en diferentes estudios, índices de seroprevalencia del 73%, 22,3% y 12% (1, 2, 3) y tasas de infección con *Trypanosoma cruzi* en triatominos de 20% y 62,6% (1, 2). En la región Oriental, específicamente en los Departamentos de Cordillera y Paraguari se han encontrado los índices de prevalencia más altos con valores de 24,9% y 21,6% respectivamente (4) y tasas de infección en triatominos de 20,4% en algunas localidades (5). La principal vía de transmisión de la enfermedad es la vectorial, siendo el *Triatoma infestans* el principal vector involucrado (6). La herramienta más importante para el control de esta enfermedad es la eliminación de las poblaciones domésticas del insecto vector con el uso de insecticidas y el mejoramiento de viviendas (7). Sin embargo, es común que se registren reinfestaciones del domicilio con poblaciones de la misma especie de triatominos. Por ello resulta importante determinar si esas poblaciones reinfestantes son residuales de la población original o son poblaciones provenientes de otros focos, ya que las estrategias a seguir en esos casos son diferentes (7). Se han empleado varias técnicas como marcadores de las variaciones intraespecíficas e interespecíficas en poblaciones de triatominos: isoenzimas, RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar), análisis de mtADN (ADN mitocondrial), estudios citogenéticos y morfometría, entre otros (8,9). En apoyo al Programa de control vectorial de la enfermedad de Chagas en Paraguay, este trabajo determinó las características isoenzimáticas de poblaciones de *T. infestans* provenientes de zonas endémicas para la enfermedad de Chagas de la región Oriental y Occidental, capturadas antes del rociado de las viviendas para determinar si existe diferenciación geográfica entre ellas que sirvan luego de base para determinar el origen de posibles grupos reinfestantes.

MATERIALES Y METODOS

Triatominos: Integrantes del Programa Nacional de Control de la Enfermedad de Chagas (SENEPA) capturaron triatominos, casa por casa, de diferentes localidades de los departamentos de Boquerón, Presidente Hayes, Cordillera y Paraguari. (ver figura 1). De un total de 1136 ejemplares se estudiaron cuarenta y cuatro ejemplares adultos de ambos sexos de *T. infestans*. De los 210 ejemplares correspondientes a la región Occidental, se seleccionaron al azar veinticuatro ejemplares: doce del departamento de Boquerón y doce de Presidente Hayes, todos domiciliarios. De los 926 ejemplares de la región Oriental, se seleccionaron al azar veinte ejemplares: diez del dpto. de Cordillera (5 de domicilio y 5 de peridomicilio) y diez del dpto. de Paraguari (5 del domicilio y 5 del peridomicilio). Electroforesis de isoenzimas Para el análisis se utilizó el tórax de cada espécimen preservado a -70°C hasta su uso. Las condiciones de la electroforesis y la interpretación de los perfiles se realizó de acuerdo a Dujardin y Tibayrenc (8). La electroforesis se realizó en cubetas horizontales (cámara de electroforesis Zip-Zoner, Helena Laboratories, Beaumont, TX) y se utilizaron placas de acetato de celulosa (Helena Laboratories, Beaumont, TX). Se analizaron los siguientes seis sistemas enzimáticos: alfa

glicerofosfato deshidrogenasa (EC1.1.1.8, alfa-GDP), glucosa fosfato isomerasa (EC5.3.1.9, GPI), isocitrato deshidrogenasa (EC1.1.1.49, IDH), malato deshidrogenasa (EC1.1.1.37, MDH), fosfoglucomutasa (EC2.7.5.1, PGM) y 6 fosfogluconato deshidrogenasa (EC1.1.1.44, 6PGDH). Se utilizaron ejemplares de *Triatoma sordida* como referencia de otra especie.

RESULTADOS

De los sistemas estudiados sólo se encontró diferencias entre ambas poblaciones de triatominos en el sistema alfa GDP, en el cual se obtuvieron dos fenotipos: el fenotipo 1 con tres bandas y el fenotipo 2 con una sola (figura 2). El fenotipo 1 de este sistema se observó en el 86,36% de los 44 ejemplares provenientes de la región Oriental y Occidental, en tanto que el fenotipo 2 se observó sólo en el 13,63%, todos pertenecientes al Chaco, tanto en Boquerón como en Presidente Hayes, aunque en mayor proporción en este último (5 de los 12 examinados de ese departamento). En los otros sistemas se obtuvieron los mismos perfiles de bandas en todos los ejemplares, lo que indica una baja variabilidad. En los sistemas MDH e IDH se observaron dos bandas pertenecientes a dos loci separados. En los demás sistemas (PGM, GPI, y 6PGD) se obtuvo una sola banda. Los ejemplares de la región oriental resultaron todos iguales, sin encontrarse diferencias entre poblaciones domiciliarias y peridomiciliarias. Como ya se ha descrito previamente los perfiles de isoenzimas no revelaron diferencias entre hembras y machos.



Figura 1. Origen geográfico de los ejemplares de *Triatoma infestans* empleados en el análisis isoenzimático. Las cruces indican las localidades estudiadas en cada departamento.

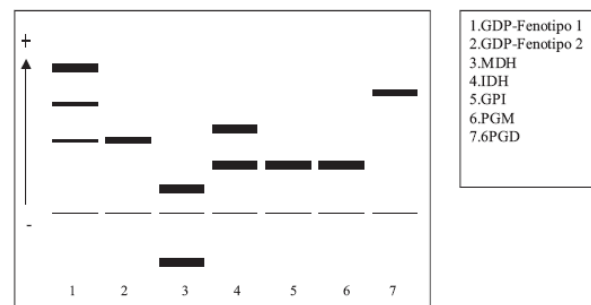


Figura 2. Representación esquemática de los perfiles isoenzimáticos encontrados en seis sistemas enzimáticos en las poblaciones de *Triatoma infestans* estudiadas. El fenotipo 2 del sistema GDP sólo fue encontrado en ejemplares del Chaco y el fenotipo 1 tanto en el Chaco como en la región Oriental.

DISCUSION

La electroforesis de isoenzimas se ha utilizado ampliamente para determinar variaciones inter específicas e intraespecíficas en poblaciones de triatominos (10,11,12,13). Así, ha permitido diferenciar poblaciones crípticas de *T. sordida* y variaciones en poblaciones de *T. brasiliensis* (12,13). En estudios en *T. infestans* se ha encontrado con frecuencia polimorfismo en sólo 3 sistemas: PGM, GDP y 6PGD (8,10,14). De estos, el GDP es el que mayor polimorfismo presenta en poblaciones de triatominos de diferentes zonas geográficas (10). En este sistema se han descrito tres fenotipos diferentes en Bolivia y dos fenotipos distintos en Uruguay (10,14). Esta enzima, considerada enzima de vuelo en los insectos, cumpliría un papel preponderante en la dispersión (15). Se ha estudiado en poblaciones silvestres de *T. sordida*, *T. guasayana* y *T. delpontei* y las diferencias encontradas podrían reflejar la antigüedad del proceso de domesticación aunque todavía faltan más estudios sobre este punto (16). Si bien las diferencias encontradas en el sistema GDP en este trabajo permiten identificar dos grupos de *T. infestans*, la variabilidad fue baja, ya que los ejemplares se mostraron monomórficos en la mayoría de

los loci. Esta homogeneidad también se encontró con el estudio de espaciadores transcritos internos ITS-2 sin que se observaran diferencias entre ejemplares domiciliarios de ambas regiones (17). Esto parece ser un aspecto característico de las poblaciones de insectos especialistas, ya que al adaptarse a ambientes estables que les ofrecen protección contra condiciones climáticas extremas y la falta de comida, con el tiempo llegan a una simplificación genética (18). El marcado monomorfismo encontrado en los ejemplares de Paraguay estaría reforzando la hipótesis propuesta por varios autores de que las poblaciones de las diferentes regiones provienen de la dispersión de pequeños grupos fundadores (15). Si bien se ha observado poca variabilidad en las isoenzimas, a nivel de estudios morfométricos se han encontrado diferencias en ejemplares pertenecientes a ambas regiones (19). Sobre este punto algunos autores hablan de que la diferenciación morfológica se puede instalar antes que las barreras reproductivas y genéticas en poblaciones entre las cuales se establece una separación física (7, 20). Así mismo, en estudios citogenéticos con bandeado C realizados en ejemplares de la región Oriental se han descrito dos grupos: uno que presentó similitud con ejemplares de Brasil y otro con los de Argentina.(21). Hasta el momento no se han encontrado en nuestro país focos selváticos de *T. infestans* por lo que la similitud encontrada entre ejemplares de diferentes regiones, constituiría una ventaja para su control.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la red ECLAT y la Fundación AVINA. Especial agradecimiento al personal del SENEPA del Programa Nacional de Chagas, Graciela Russomando, Nidia Martínez, Elizabeth Ferreira por haber facilitado los ejemplares estudiados en el presente trabajo.

BIBLIOGRAFIA

1. Canese A. Datos actualizados sobre conocimientos epidemiológicos de la enfermedad de Chagas en el Paraguay. Revista Paraguaya de Microbiología 1978; 13(1):7-19.
2. Rojas de Arias A, Velázquez de Saldivar G, Merlo R, Gamarra de Galaher P, Keller F. Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en el Paraguay: un estudio de dos localidades del Chaco Paraguayo. En: Rosner JM, Kawabata M, editores. Enfermedad de Chagas en el Paraguay. EFACIM. 1990.
3. Rojas de Arias A, Arévalo de Guillén I, Inchausti A, Samudio M, Schmeda-Hischmann G. Prevalence of Chagas disease in Ayoreo communities of the Paraguayan Chaco. Tropical. Medicine and Parasitology 1993; 44:285-8.
4. Rojas de Arias A. Chagas disease in Paraguay. PAHO Document No. PAHO/HCP/HCT/72/ 96. Washington, DC: Pan-American Health Organization. 1996.
5. Rojas de Arias A, Monzón MI, Velázquez de Saldivar G, Guillén E, Arrúa N. Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en localidades rurales de Paraguay. En: Rosner JM, Kawabata M, editores. Enfermedad de Chagas en el Paraguay. EFACIM. 1990.
6. OPS. Oficina Sanitaria Panamericana. OPS/HCP/HCT/94/97. Iniciativa del Cono Sur: La eliminación del *Triatoma infestans* y la interrupción de la tripanosomiasis americana transfusional. Asunción: Evaluación del Programa en Paraguay. 1997.
7. Dujardin JP, Bermudez H, Gianella A, Cardozo L, Ramos E, Sarvia R, et al. Uso de marcadores genéticos en la vigilancia entomológica de la enfermedad de Chagas. En: Cassab JR Alfred, Noireau F, Guillén G, editores. Chagas. La Enfermedad en Bolivia, Conocimientos Científicos al Inicio del Programa de Control (1998-2002). La Paz: Ediciones Gráficas "E.G.". 1999.
8. Dujardin JP, Tibayrenc M. Etude de 11 enzymes et données de génétique formelle pour 19 loci enzymatiques chez *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale 1985; 65:271-80.
9. Panzera F, Alvarez F, Sanchez-Rufas J, Pérez R, Suja J, Scvortzoff E, et al. C-heterochromatin polymorphism in holocentric chromosomes of *Triatoma infestans* (Hemiptera Reduviidae). Genome 1992; 35: 1068-74.
10. Pereira J, Dujardin JP, Salvatella R, Tibayrenc M. Enzymatic variability and phylogenetic relatedness among *Triatoma infestans*, *T. platensis*, *T. delpontei* and *T. rubrovaria*. Heredity 1996;

77: 47-54.

11. Harry M, Galindez I, Cariou L. Isozyme variability and differentiation between *Rhodnius prolixus*, *R. robustus* and *R. pictipes*, vectors of Chagas disease in Venezuela. *Medical and Veterinary Entomology*. 1992; 6: 37-43.

12. Noireau F, Gutiérrez T, Zegarra M, Flores R, Brenière F, Cardozo L, et al. Cryptic speciation in *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) from the Bolivia Chaco. *Tropical Medicine and International Health* 1998; 3(5): 364-72.

13. Costa J, Goretí R, Freitas-Sibajev M, Marchon-Silva V, Quinhones Pires M, Pacheco R. Isoenzymes detect variation in populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 1997; 92(4): 459-64.

14. Dujardin JP, Schofield CJ, Tibayrenc M. Population structure of andean *Triatoma infestans*: allozyme frequencies and their epidemiological relevance. *Medical and Veterinary Entomology* 1998; 12: 20-9.

15. Schofield CJ, Diotaiuti L, Dujardin JP. The process of domestication in Triatominae. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 1999; 94 (Suppl I): 375-8.

16. Noireau F. Triatominae candidatos vectores y realidad de los focos selváticos de *Triatoma infestans* en Bolivia. In Schofield CJ, Ponce C. editores. *Proceedings of the Second International Workshop on Population Biology and Control of Triatominae egucigalpa, Honduras*. Mexico City: INDRE. 1999.

17. Canese A. Análisis de los segundos espaciadores transcritos internos (ITS-2) del ADN ribosomal genómico de *Triatoma infestans*, Klug 1834, (Hemiptera: Reduviidae), de Paraguay, Thesis. España: Universidad de Valencia. 2000.

18. Schofield CJ. Bases técnicas y económicas para el control a gran escala de la enfermedad de Chagas. En: Guhl F editor. *Memorias Curso Postgrado: Genética poblacional de triatominae aplicada al control vectorial de la enfermedad de Chagas*. Santa Fe de Bogotá: Editores Corcas. 1997.

19. López E, Acosta N, González N, Fernández MJ, Ferreira E, Rojas de Arias A. Diferencias morfológicas en poblaciones de *Triatoma infestans* provenientes de la región Oriental y Occidental del Paraguay, Departamento de Medicina Tropical, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (UNA). *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud* 2002; 1(1): 51-7.

20. Usinger RL, Wygodzinsky P, Ryckman R. The bio-systematics of Triatominae. *Annual Review of Entomology* 1966; 11: 309-30.

21. Rojas de Arias A, Hirai H, Ascurra M. Karyotype variation in the Triatominae subfamily. A study on *Rhodnius neglectus* (Lent 1954) and *Triatoma infestans* (Klug 1934). *Annual Report (IICS)* 1990; 14:113-27.