

Uso do Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) no estudo populacional do *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911

Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in the populational study of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911

Érika C. Borges ¹
Alvaro J. Romanha ²
Liléia Diotaiuti ¹

¹ Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas, Centro de Pesquisas René Rachou, Av. Augusto de Lima 1715, Belo Horizonte, MG 30190-002, Brasil.

² Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Augusto de Lima 1715, Belo Horizonte, MG 30190-002, Brasil.

Abstract We evaluated the genetic variability of *Triatoma brasiliensis*, the main vector of Chagas disease in Northeast Brazil, using specimens from three populations. Regions of genomic DNA were amplified by RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), using two primers. The products were visualized after polyacrylamide gel electrophoresis followed by silver staining. A dendrogram constructed through the Dice similarity coefficient allowed for separation of the tested specimens into three distinct groups. The populations captured in areas from Ceará State showed similar profiles, but different from that captured in Piauí State. Our results indicate that RAPD can be used successfully in triatomine studies and suggest the presence of genetic variability between different populations of *T. brasiliensis*.

Key words Chagas Disease; Triatominae; Insect Vectors; RAPD

Resumo Para o estudo de variabilidade genética em *Triatoma brasiliensis*, o principal vetor da doença de Chagas no Nordeste brasileiro, espécimes de três diferentes populações intradomiciliares foram analisados. Regiões do DNA genômico foram amplificadas utilizando dois iniciadores randômicos através da técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), visualizados em géis de poliacrilamida corados pela prata. Os perfis originados se mostraram bastante homogêneos quando comparados intrapopulacionalmente. Populações capturadas em duas regiões diferentes do Estado do Ceará também apresentaram homogeneidade entre si, mas, quando comparadas com a população proveniente do Piauí, foi possível diferenciá-las. Esses resultados, preliminares, indicam que o RAPD pode ser usado com sucesso nos estudos de variabilidade em triatomíneos, bem como sugerem a existência de variabilidade entre diferentes populações de *T. brasiliensis* pertencentes a uma mesma subespécie.

Palavras-chave Doença de Chagas; Triatominae; Insetos Vetores; RAPD

Introdução

A doença de Chagas ou tripanosomíase americana é um importante problema de saúde pública que atinge principalmente os países das Américas Central e do Sul. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (1991), 28% das pessoas infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* estão no Brasil. De acordo com Dias (1979) a transmissão vetorial é a principal responsável pela manutenção da endemia, estando a distribuição da doença humana intimamente relacionada com a presença de triatomíneos domiciliados na área endêmica. No Nordeste brasileiro, o *Triatoma brasiliensis* é o principal vetor da doença, ocupando tanto tocas de roedores e locas de pedras nos ambientes silvestres (Alencar, 1987) como os ambientes artificiais. Em ambos os ambientes, eles se apresentam em altas densidades populacionais, o que torna seu controle mais difícil (Dias & Diotaiuti, 1998).

Estudos biológicos, morfológicos e epidemiológicos já foram feitos com essa espécie, mas pouco se conhece a respeito de sua estrutura populacional. Costa et al. (1997a, 1997b) utilizaram marcadores biológicos, bioquímicos e morfológicos para o estudo de diferentes populações de *T. brasiliensis* e observaram a existência de diferenças marcantes entre elas, estando estas relacionadas aos padrões de coloração, utilizados como marcadores na classificação das diferentes subespécies. Nos últimos tempos, tem sido utilizados inúmeros indicadores de variabilidade populacional em triatomíneos. Esses indicadores fornecem uma grande quantidade de informações importantes para os estudos de biosistemática, genética populacional e evolução dos triatomíneos. Este trabalho propõe investigar a presença de variabilidade genética entre diferentes populações de *T. brasiliensis* utilizando a técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Em 1990, essa técnica foi descrita simultaneamente por Williams et al. (1990) e Welsh & McClelland. (1990). Baseia-se na amplificação de seqüências de DNA randômicas utilizando iniciadores pequenos de seqüências arbitrárias, que detectam polimorfismos, mesmo na ausência de informações da seqüência específica de nucleotídeos do DNA alvo. Os marcadores de RAPD são extremamente apropriados para realização de mapas genéticos, diferenciação de espécies animais e vegetais e para impressões de DNA, com especial utilidade nos estudos de genética de populações.

Harry et al. (1998) fizeram uma revisão sobre a utilização do RAPD na entomologia e sugerem que esses marcadores são úteis em estu-

dos de genética populacional e podem auxiliar nos programas de controle através da localização de genes ou de regiões importantes do genoma. Em triatomíneos, poucos estudos foram feitos utilizando essa técnica. Carlier et al. (1996) apresentaram, em um *workshop*, dados preliminares sobre o uso do RAPD na comparação de espécies e no estudo de variações intra-específicas em triatomíneos. Os resultados encontrados proporcionaram uma fácil separação entre *Triatoma infestans* e *T. sordida* e entre populações silvestres e domiciliares de *T. infestans*. Garcia et al. (1998) estudaram diferentes espécies de triatomíneos e conseguiram distinguir diferentes espécies de *Rhodnius* e os principais gêneros da subfamília.

Materiais e métodos

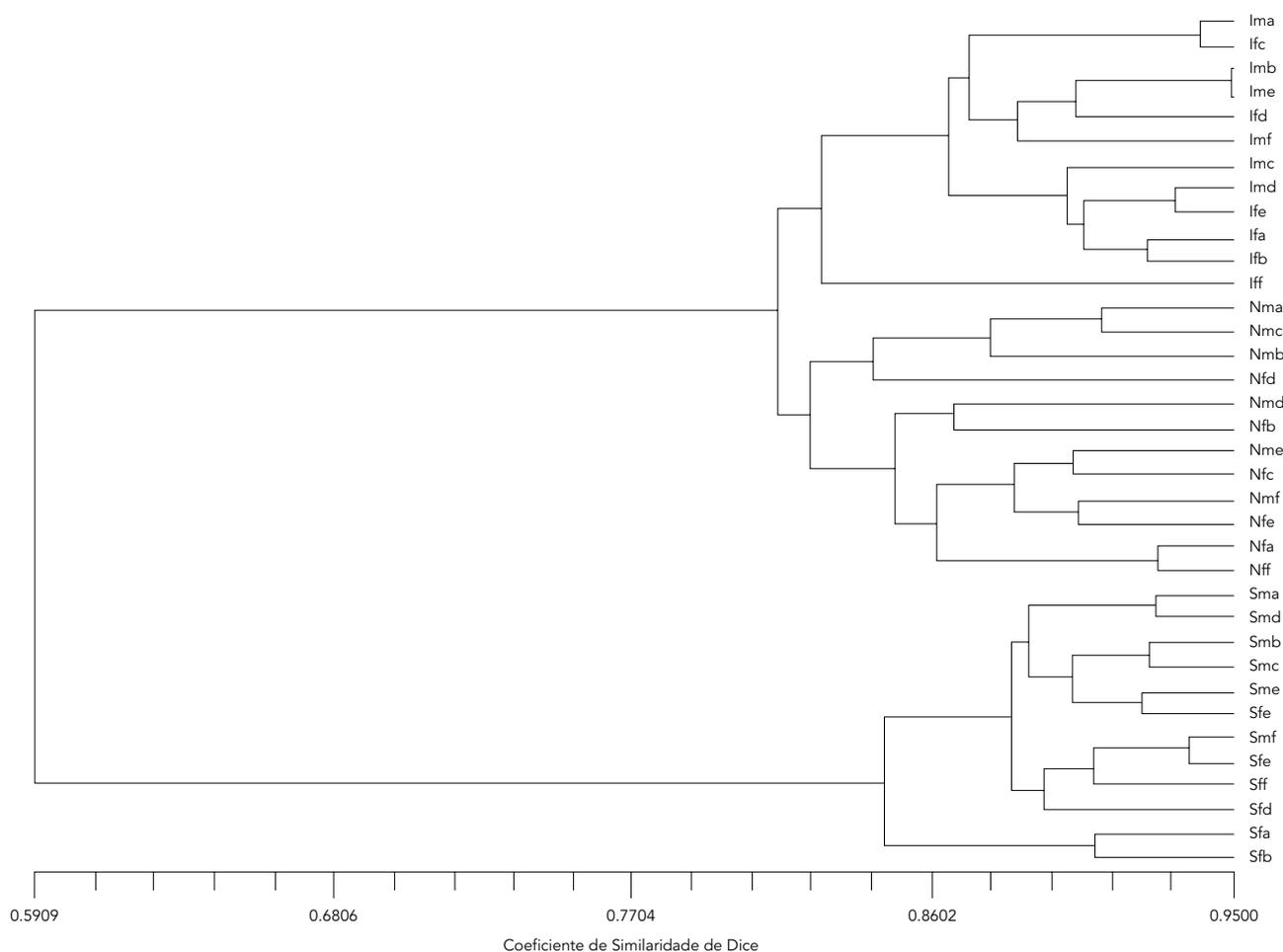
Foram utilizadas três diferentes populações de *T. brasiliensis* capturadas no intradomicílio dos municípios de Independência e Novo Oriente, ambos no Ceará, e de Simplício Mendes, no Piauí. De cada inseto adulto (dez machos e dez fêmeas) foram retiradas as patas, que foram extraídas em freezer, à temperatura de -70°C, para posterior extração de DNA. O protocolo de amplificação foi previamente usado em estudos de *Schistosoma mansoni* e *Trypanosoma cruzi* (Dias Neto et al., 1993; Steindel et al., 1993). Amostras de DNA de cada indivíduo foram amplificadas, usando cerca de 4ng de DNA molde. Os iniciadores 3302 (5'-GGGTAACGCC-3') e 3304 (5'-GCACTGTCA-3') foram selecionados dentro de um conjunto de nove iniciadores testados. Foram construídas matrizes com base na presença ou ausência de bandas, utilizadas para obtenção do coeficiente de similaridade de Dice (1945) e construção de um dendrograma pelo programa *NTSYSpc 2.0* (Rohlf, 1998).

Resultados e discussão

Foram analisados os perfis eletroforéticos de vinte insetos (dez machos e dez fêmeas) de cada uma das populações. A partir dos perfis originados por cada iniciador, pode-se observar uma grande homogeneidade intrapopulacional. Para a análise de compartilhamento de bandas, foram usadas 94 bandas, geradas pelos dois iniciadores. A partir daí, foi calculada uma matriz de similaridade e construído o dendrograma (Figura 1). O dendrograma obtido mostra, claramente, três grupos distintos, sendo um grupo formado pelas populações do Ceará e o outro, pela população do Piauí. É importan-

Figura 1

Dendrograma UPGMA das três populações intradomiciliares de *T. brasiliensis* estudadas. A escala horizontal representa o índice de similaridade de Dice e as letras à direita indicam origem geográfica, sexo e código de registro dos indivíduos: Im – Independência, machos; If – Independência, fêmeas; Nm – Novo Oriente, machos; Nf – Novo Oriente, fêmeas; Sm – Simplício Mendes, machos; e Sf – Simplício Mendes, fêmeas.



te ressaltar que tanto as populações de *T. brasiliensis* encontradas no Ceará quanto as encontradas no Piauí, segundo Costa (1997), são pertencentes a uma mesma subespécie, tendo, portanto, características biológicas e morfológicas muito semelhantes. Entretanto, a técnica utilizada foi sensível o suficiente para detectar variações entre essas populações, podendo ser usada com sucesso em estudos de variabilidade populacional em triatomíneos. Estudos com a utilização de outros iniciadores, outras populações e outras técnicas estão sendo realizados, mas esses resultados preliminares sugerem a existência de heterogeneidade populacional em *T. brasiliensis*.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à Fundação Nacional de Saúde dos Estados do Ceará e Piauí pelo auxílio nas capturas dos triatomíneos.

Referências

- ALENCAR, J. E., 1987. *História Natural da Doença de Chagas no Estado do Ceará*. Fortaleza: Imprensa Universitária, Universidade Federal do Ceará.
- CARLIER, L.; MUÑOZ, M. & DUJARDIN, J. P., 1996. A RAPD protocol for Triatominae. In: *Proceedings of the International Workshop on Population Genetics and Control of Triatominae* (C. J. Schofield, J. P. Dujardin & J. Jurberg, eds.), pp. 81-83, México, D. F.: Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.
- COSTA, J., 1997. *Triatoma brasiliensis Neiva, 1911 (Hemiptera – Reduviidae – Triatominae): Estudos Morfológicos, Biológicos e Isoenzimáticos sobre Diferentes Padrões Cromáticos*. Tese de Doutorado, Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz.
- COSTA, J.; BARTH, O. M.; MARCHON-SILVA, V.; ALMEIDA, C. E.; FREITAS-SIBAJEV, M. G. R. & PANZERA, F., 1997a. Morphological studies on the *T. brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) genital structures and eggs of different chromatic forms. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92:493-498.
- COSTA, J.; FREITAS-SIBAJEV, M. G. R.; MARCHON-SILVA, V.; PIRES, M. Q. & PACHECO, R. S., 1997b. Isoenzymes detect variation in populations of *T. brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92:459-464.
- DIAS, J. C. P., 1979. Mecanismos de transmissão. In: *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas* (Z. Brener & Z. Andrade, eds.), pp. 152-174, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- DIAS, J. C. P. & DIOTAIUTI, L., 1998. Vetores secundarios de la enfermedad de Chagas en el Brasil y perspectivas para su control. In: *Control de Tripanosomiasis Americana y Leishmaniosis: Aspectos Biológicos, Genéticos y Moleculares* (F. Guhl & C. A. Jaramillo, eds.), pp. 154-159, Santafé de Bogotá: Universidad de los Andes.
- DIAS NETO, E.; SOUZA, C. P.; ROLLINSON, D.; KATZ, N.; PENA, S. D. J. & SIMPSON, A. J. G., 1993. The random amplification of polymorphic DNA allows the identification of strains and species of schistosome. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 57:83-88.
- DICE, L. R., 1945. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology*, 26:297-302.
- GARCIA, A. L.; CARRASCO, H. J.; SCHOFIELD, C. J.; STOTHARD, J. R.; FRAME, I. A.; VALENTE, S. A. & MILES, M. A., 1998. Random amplification of polymorphic DNA as a tool for taxonomic studies of triatomine bugs (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology*, 35:38-45.
- HARRY, M.; ROBIN, S. & LACHAISE, D., 1998. L'utilisation de marqueurs génétiques polymorphes (RAPDs) en entomologie évolutive et appliqué. *Annales de la Société Entomologique de France*, 34:9-32.
- OMS (Organización Mundial de la Salud), 1991. *Control de la Enfermedad de Chagas*. Informe de un Comité de Expertos, Serie de Informes Técnicos 811. Ginebra: OMS.
- ROHLF, F. J., 1998. *NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.0, User's Guide*. New York: Exeter Software.
- STEINDEL, M.; DIAS NETO, E.; MENEZES, C. L. P.; ROMANHA, A. J. & SIMPSON, A. J. G., 1993. Random Amplified Polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Molecular Biochemical Parasitology*, 60:71-80.
- WELSH, J. & McCLELAND, M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18:7213-7218.
- WILLIAMS, J. C. G.; 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.