

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO MORFOLÓGICO Y MOLECULAR DE *Taenia Solium*

T E S I S

Que para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

JOSÉ PABLO MARAVILLA CAMPILLO

ASESOR: ANA FLISSER STEINBRUCH

México., D.F.

2005

M-0341639



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
SISTEMÁTICA Y CLASIFICACIÓN	2
FILOGENIA	4
ASIGNACIÓN Y DILEMA DEL HERMAFRODITISMO	5
CICLO DE VIDA	8
VARIABILIDAD GENÉTICA	
GENERALIDADES	9
CÉSTODOS	11
<i>Taenia solium</i>	13
Cromosomas, DNA mitocondrial y rearrreglos genéticos	15
Electroforesis multiloci de enzimas (MLEE)	17
Amplificación aleatoria del DNA polimórfico (RAPD)	18
JUSTIFICACIÓN	20
HIPÓTESIS	20
OBJETIVO GENERAL	20
MATERIAL Y MÉTODOS	21
OBTENCIÓN DE CISTICERCOS Y TENIAS	22
PERFILES DE ISOENZIMAS	
Obtención de extractos solubles	23
Electroforesis de isoenzimas	23
PERFILES DE RAPD	
Obtención del DNA	26
Selección de iniciadores	26
Obtención de perfiles de RAPD	28
ANÁLISIS DE DATOS	30
RESULTADOS	
ELECTROFORESIS DE ISOENZIMAS	34
RAPD	30
DISCUSIÓN	43
PERSPECTIVAS	60
BIBLIOGRAFIA	62
ANEXO 1.	
DILEMA DEL PRISIONERO	70
JUEGO DE LA GALLINA	71
COMO LAS DAN LAS TOMO	72
ANEXO 2.	
PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA PRESENTE TESIS	73

ABSTRACT

Human cysticercosis caused by *Taenia solium* is an important public health problem in Mexico and in several developing countries; however, little is known about the genetic structure and variability in this parasite, in spite that in other cestodes understanding population genetics has led to the control and the development of new epidemiological and diagnostic strategies.

In order to evaluate the presence and variability of *Taenia solium* lineages, as well as the relationship between them, electrophoresis of isozymes and RAPD were used in cysticerci obtained from Mexico, Colombia, Honduras and Tanzania. 70 cysticerci recovered from 7 pigs with cysticercosis (6 pigs from Central of Mexico and 7th from Colombia) and some adult taenias of different species were individually analyzed by isozymes. Also, 160 cysticerci recovered of 6 pigs (4 from Morelos, Guerrero and Yucatan in Mexico, one from Tegucigalpa in Honduras and another one from Arusha in Tanzania). Parasites were kept individually frozen until their use except African cysticerci that were conserved in 70% ethanol and were analyzed only by RAPD. All cysticerci recovered from one pig was considered as isolate. Commercial primers used were: OPB 3 (5'-CATCCCCCTG), OPB 11 (5'-GTAGACCCGT), OPB 14 (5'-TCCGCTCTGG) and OPB18 (5'-CCACAGCAGT) chosen according to their polymorphic patterns from a prior assay. RAPD profiles were analyzed using the software program TFGA (Tools For Population Genetic Analyses).

Isozyme analysis showed that only ARK, G3PD, G6PD, GPI, GOT, MDH, ME and MPI had homocigotic profiles with good resolution, some differences in the mobility in GPI and MDH between Mexican and Colombian cysticerci were observed. Species and stage-specific profiles were also exhibited, for some enzymes such as ME and MPI.

RAPD showed 80% polymorphic loci (P), average heterocigosity (H) of 0.077, as well as a high differentiation ($\Theta = 0.718$) and low genetic flow ($Nm = 0.068$) between isolates. Linkage disequilibrium analysis displayed that isolates both from Morelos and Arusha had genetic events of recombination with random mixis, while for isolates from Guerrero, Yucatan and Honduras had a clonal structure. A UPGMA dendrogram from Nei's genetic distances were built. Each isolate clustered in its own clade except isolate from Yucatan that shared some cysticerci with isolates from Morelos and Honduras. Private alleles allowed to distinguish between cysticerci from different geographic zone and the presence of several cysticerci with the same genetic profile within isolates was interesting too. Our data of isoenzymes suggest there is a homogeneous phenotypic lineage in *T. solium* that expresses some species and stage specific enzyme that allow the parasite colonize and develop different organs of its host. Besides, H, P, Θ , and Nm values are according with those reported for other worms such as *Echinococcus granulosus*, *Taenia taeniaeformis* and *Schistosoma hematobium*, and recently for isolates of *T. solium* from Morelos, Puebla, Yucatan and Madagascar. Our RAPD results suggests that *T. solium* has local lineages or descendant lines with different characteristics because the hermaphrodite worm in its definitive host has undergone genetic drift and inbreeding effects and has therefore fixed several alleles. Furthermore, this parasite could maintain and inherit a polymorphic genetic pool generated by sexual reproduction, mutation and occasionally, by cross-fertilization between different adults.

RESUMEN

La cisticercosis humana causada por *Taenia solium* es un problema de salud pública en México y en varios países del mundo; sin embargo, el conocimiento de la estructura y variabilidad genética de este parásito es escaso, no obstante que en otros céstodos la comprensión de su genética poblacional ha permitido controlar y generar nuevas estrategias epidemiológicas y de diagnóstico.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la presencia y variabilidad de linajes en *Taenia solium*, así como la relación que guardan entre ellos, empleando electroforesis de isoenzimas y perfiles de RAPD en cisticercos obtenidos de México, Colombia, Honduras y Tanzania. Para ello, se analizó el perfil isoenzimático individual de 70 cisticercos de 7 cerdos cisticercosos infectados de manera natural (6 cerdos provenían de comunidades del Centro de México y el séptimo de Colombia) así como algunos ejemplares adultos de tenias de diferentes especies. Asimismo, para el análisis por RAPD se obtuvieron 160 cisticercos de cerdos de Morelos, Guerrero y Yucatán, en México, otro de Tegucigalpa, Honduras y otro más en Arusha, Tanzania. Todos los parásitos se conservaron en congelación hasta su análisis o en etanol al 70% en el caso de los cisticercos de África. A todos los cisticercos recuperados de un cerdo se les denominó aislado. Con base en el polimorfismo de los productos de amplificación obtenidos en un ensayo inicial, se seleccionaron para los RAPD los iniciadores comerciales OPB 3 (5'-CATCCCCCTG), OPB 11 (5'-GTAGACCCGT), OPB 14 (5'-TCCGCTCTGG) y OPB18 (5'-CCACAGCAGT), y los perfiles se analizaron con el programa TFPGA (*Tools For Population Genetic Analyses*).

De las isoenzimas examinadas, ARK, G3PD, G6PD, GPI, GOT, MDH, ME y MPI mostraron patrones de corrimiento electroforético homocigóticos con buena resolución y se observaron diferencias en el corrimiento de la MDH y GPI entre los aislados mexicanos y el colombiano. También se observó que algunas enzimas mostraron perfiles estadio y especie específicos, como la ME y MPI.

Para los RAPD se encontró un 80% de loci polimórficos (P) y una heterocigosis promedio (H) de 0.077, así como una alta diferenciación ($\Theta = 0.718$) y escaso flujo génico ($Nm = 0.068$) entre los aislados. El análisis del desequilibrio de ligamiento indicó que los dos aislados de Morelos y el de Tanzania presentaron una asociación aleatoria de alelos, mientras que los aislados de Guerrero, Yucatán y Honduras mostraron una estructura clonal. La construcción de un árbol de distancias de Nei por UPGMA agrupó a cada aislado en clados bien definidos, con excepción del aislado de Yucatán, en el que algunos cisticercos se agruparon con el aislado de Honduras y otros con uno de los aislados de Morelos. También se observó la presencia de alelos exclusivos de aislado, lo que permitió distinguir a cisticercos de las distintas regiones geográficas. Llamó la atención la presencia de múltiples cisticercos genéticamente idénticos dentro de cada aislado. El análisis de isoenzimas sugiere que existe una homogeneidad genética en *T. solium*, que expresa enzimas estadio y especie específicas que facilitan su desarrollo en los órganos de sus hospederos. Asimismo, los valores poblacionales (H, P, Θ y Nm) son similares a los reportados para otros platelmintos como *Echinococcus granulosus*, *Taenia taeniaeformis* y *Schistosoma hematobium* y recientemente para *T. solium* al analizar otros aislados de Morelos, Puebla, Yucatán y Madagascar. Además, los resultados sugieren la existencia de linajes en *Taenia solium* con eventos de recombinación entre ellos, con un fondo genético polimórfico que es probablemente producto de su reproducción sexual y se mantiene por una segregación no aleatoria de sus alelos.

INTRODUCCIÓN

Taenia solium (Linnaeus, 1758) es un helminto en forma de cinta responsable de dos parasitosis: teniosis en los seres humanos y cisticercosis en el hombre y el cerdo. La teniosis se debe al establecimiento del estadio adulto del parásito en el intestino delgado de su único hospedero definitivo, el ser humano, y la cisticercosis, que es sin duda el problema de salud más serio que genera este parásito, es causada por la localización de la larva o metacéstodo en los tejidos de sus hospederos intermediarios, el cerdo y accidentalmente el hombre (Flisser *et al.*, 1997). Debido a la importancia de la cisticercosis humana se han realizado progresos importantes en cuanto a su diagnóstico y tratamiento (Del Brutto *et al.*, 2001; García *et al.*, 2002), y los aspectos clínicos han sido ampliamente descritos (Prabhakar y Singh, 2002). Asimismo, se han logrado avances importantes en el conocimiento epidemiológico de esta enfermedad; se ha demostrado que el principal factor de riesgo para adquirir la cisticercosis es el contacto cercano con un portador del estadio adulto del parásito (Sarti *et al.*, 1988, 1992; García *et al.*, 1999); lo que ha motivado a realizar distintas estrategias de intervención tales como: tratamiento masivo contra la teniosis humana, desarrollo de infraestructura sanitaria y campañas de educación para la salud (Flisser *et al.*, 1997, 2003; Sarti y Rajshekhar, 2003). Finalmente, se han llevado a cabo ensayos de vacunación en contra de la cisticercosis porcina, los que han mostrado resultados prometedores encaminados al control y erradicación de esta enfermedad (Huerta *et al.*, 2001; Flisser *et al.*, 2001, 2003).

En contraste, los estudios sobre diagnóstico, tratamiento y aspectos clínicos de la teniosis por *T. solium* son escasos, ya que, este parásito adulto se alberga solo en seres humanos y libera huevos que son los que causan cisticercosis. El conocimiento sobre los mecanismos de expulsión y la permanencia de este parásito, la relación hospedero-parásito como el estudio de la interfase y equilibrio dinámico de intercambio de metabolitos, anticuerpos, antígenos y células del sistema inmune, la embriogénesis y aspectos moleculares son limitados. Como alternativa se han establecido modelos experimentales de teniosis en

roedores tales como hámsteres, gerbos y chinchillas (Maravilla *et al.*, 1998) en los que se están realizando diversos estudios (Avila *et al.*, 2002, 2003; Willms *et al.*, 2003). Sin embargo mantener de forma perenne el ciclo de vida de este parásito aún no ha sido posible.

SISTEMÁTICA Y CLASIFICACION

De acuerdo a la sistemática actual (Smyth, 1994; Thompson y Lymbery, 1995), *Taenia solium* se clasifica de la siguiente manera:

Phylum Platyhelminthes

Helminths de cuerpo blando y acelomados, aplanados dorso-ventralmente que poseen un sistema excretor protonefridial

Clase Cestoda

Endoparásitos sin tubo digestivo, cuya cubierta corporal externa es un tegumento sincicial con microtricas

Subclase Eucestoda

Estadio adulto con cuerpo alargado en forma de cinta (estróbilo), formado por proglótidos (segmentos) lineales que contienen a los órganos reproductores hermafroditas; escólex como órgano especializado de anclaje, con ciclos de vida indirectos

Orden Cyclophyllidea

Escólex con cuatro ventosas musculares y un rostelo generalmente armado con ganchos, estróbilo con proglótidos con distintos grados de desarrollo (inmaduros, maduros y grávidos) y con segmentación externa, huevos esféricos, no operculados que contienen una oncosfera no ciliada con seis ganchos

Familia Taeniidae

Estadio adulto en el intestino delgado de carnívoros, consta de rostelo con o sin doble corona de ganchos; estróbilo con genitales masculinos y femeninos en cada proglótido,

roedores tales como hámsteres, gerbos y chinchillas (Maravilla *et al.*, 1998) en los que se están realizando diversos estudios (Avila *et al.*, 2002, 2003; Willms *et al.*, 2003). Sin embargo mantener de forma perenne el ciclo de vida de este parásito aún no ha sido posible.

SISTEMÁTICA Y CLASIFICACION

De acuerdo a la sistemática actual (Smyth, 1994; Thompson y Lymbery, 1995), *Taenia solium* se clasifica de la siguiente manera:

Phylum Platyhelminthes

Helminths de cuerpo blando y acelomados, aplanados dorso-ventralmente que poseen un sistema excretor protonefridial

Clase Cestoda

Endoparásitos sin tubo digestivo, cuya cubierta corporal externa es un tegumento sincicial con microtricas

Subclase Eucestoda

Estadio adulto con cuerpo alargado en forma de cinta (estróbilo), formado por proglótidos (segmentos) lineales que contienen a los órganos reproductores hermafroditas; escólex como órgano especializado de anclaje, con ciclos de vida indirectos

Orden Cyclophyllidea

Escólex con cuatro ventosas musculares y un rostelo generalmente armado con ganchos, estróbilo con proglótidos con distintos grados de desarrollo (inmaduros, maduros y grávidos) y con segmentación externa, huevos esféricos, no operculados que contienen una oncosfera no ciliada con seis ganchos

Familia Taeniidae

Estadio adulto en el intestino delgado de carnívoros, consta de rostelo con o sin doble corona de ganchos; estróbilo con genitales masculinos y femeninos en cada proglótido,

poro genital marginal irregularmente alternado, huevos con cubierta dura radialmente estriada (embrióforo), estadio de metacéstodo tisular en diversos mamíferos.

Género *Taenia*

Estado adulto en duodeno-yeyuno de su hospedero definitivo, con estróbilos largos formados por cientos de proglótidos; hospederos intermediarios principalmente herbívoros y roedores. Existen tres especies de importancia médica y económica: *T. solium*, *T. saginata* y *T. saginata asiatica*, cada una con características morfológicas distintivas de validez taxonómica y diagnóstica que permiten su identificación (Cuadro 1)

Cuadro 1. Diferencias morfológicas entre tenias que parasitan a los seres humanos*.

	<i>T. solium</i>	<i>T. saginata</i>	<i>T. saginata asiatica</i>
Hospedero intermediario	Porcinos	Bovinos	Porcinos y bovinos
Metacéstodo			
Localización	Cerebro y músculo esquelético	Corazón y músculo esquelético	Hígado
Tamaño (mm)	8-15	6-10	0.4-3.5
Ganchos en escólex	Presente	Ausente	Rudimentarios
Adulto			
Largo de estróbilo (m)	1-5	4-12	1-8
Ancho de estróbilo (mm)	7-10	12-14	9-12
Proglótidos (número)	700-1000	1000-1500	200-1200
Escólex			
Diámetro (mm)	0.6-1.0	1.5-2.0	0.2-2.0
Ventosas (número)	4	4	4
Rostelo	Presente	Ausente	Presente (hundido)
Ganchos (número)	22-32	Ausente	Ausentes o rudimentarios
Proglótidos maduros			
Largo (mm)	2.1-2.5	2.1-4.5	
Ancho (mm)	2.8-3.5	3.1-6.7	
Testículos (número)	350-600	800-1200	300-1200
Ovario (número de lóbulos)	2	2	2
Esfínter vaginal	Ausente	Presente	Presente
Proglótidos grávidos			
Largo (mm)	3.1-10	10-20	4-22
Ancho (mm)	3.8-8.7	6.5-9.5	3-12
Útero (número de ramas)	7-11	14-32	12-26
Protuberancia posterior	Ausente	Presente	Presente
Huevos			
Tamaño (µm)	26-34	26-34	16-45
Ganchos (número)	6	6	6

*Pawlowski 2002, Flisser *et al.* 2004

FILOGENIA

La figura 1 muestra las filogenias de los principales céstodos y ténidos en los que se incluyen a *Taenia solium*, *Taenia saginata* y *Taenia saginata asiatica* como responsables de la teniosis humana. Resaltan las agrupaciones de *T. solium* con *T. ovis* y la de *T. saginata* con *T. saginata asiática*, estas últimas como especies hermanas, ya que ambos parásitos divergen del mismo nodo ancestral lo que junto con otros estudios moleculares han generado un debate aún sin consenso sobre el carácter de especie (*T. asiatica*) o subespecie (*T. saginata asiatica*) de estos parásitos (Flisser *et al.*, 2004).

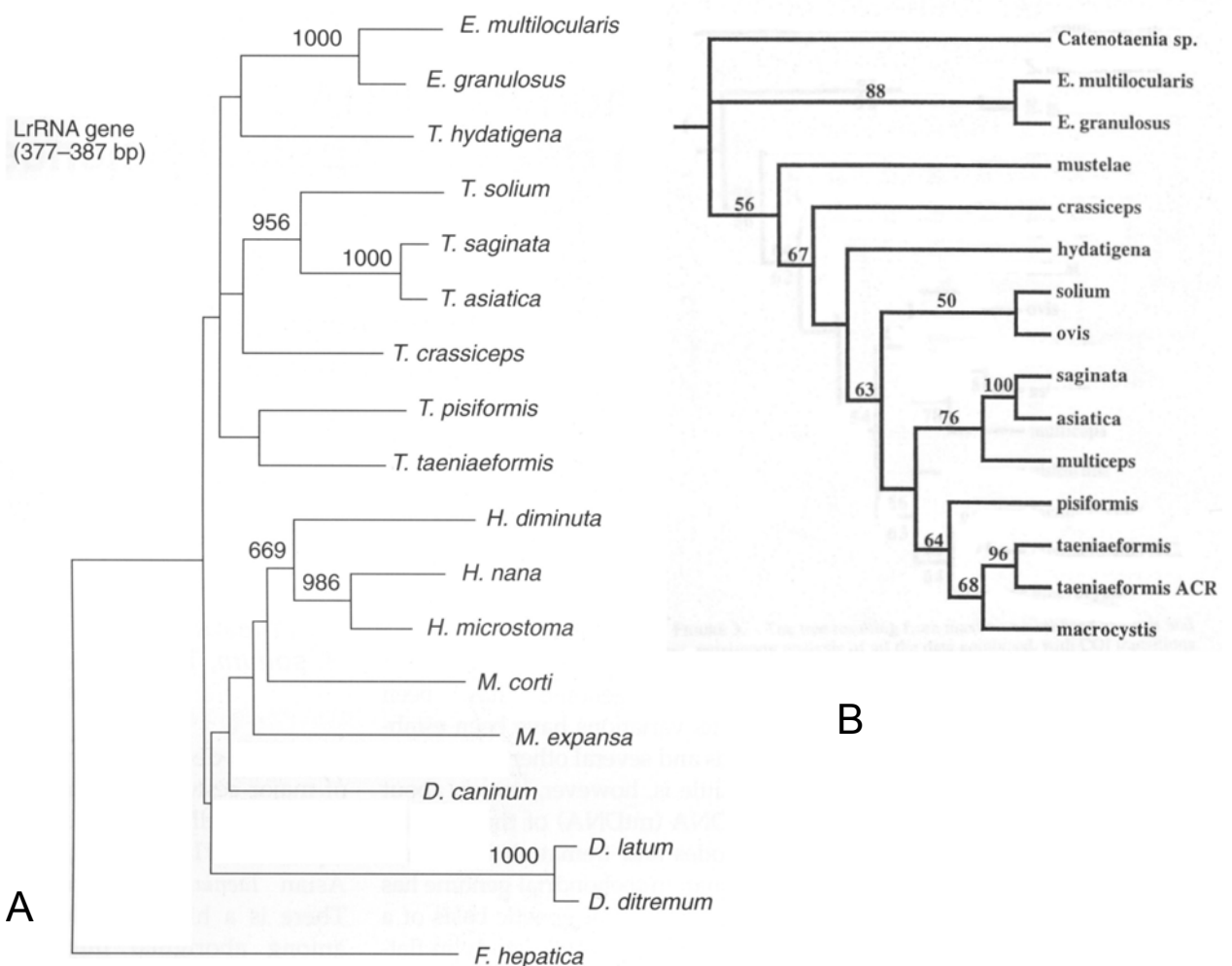


Figura 1. Filogenia molecular de genes mitocondriales de céstodos en los que se marcan algunos valores de *bootstraps* en los nodos principales. (A) Dendrograma de neighbor-joining de 17 parásitos basados en la secuencia parcial de los genes de la subunidad larga del RNA ribosomal (LrRNA), (Ito *et al.*, 2004). (B) Árbol más parsimonioso construido a partir de la secuencia del gen de la citocromo oxidasa I (COI) (de Queiroz y Alkire, 1998).

ASIGNACIÓN Y DILEMA DEL HERMAFRODITISMO

Muchos animales y plantas son hermafroditas, es decir que son individuos únicos que producen tanto gametos masculinos como femeninos a lo largo de sus vidas. Los individuos dioicos aparecieron por eventos independientes de ancestros hermafroditas. El hermafroditismo toma dos formas: a) el secuencial, como aquel individuo que en cierta etapa de su vida es de un sexo (generalmente a etapas tempranas o juveniles) y bajo ciertas condiciones ocurre un cambio hacia el sexo contrario (regularmente para el resto de su vida adulta); b) el simultáneo, en el que un individuo produce ambos tipos de gametos en cada temporada de apareamiento (más o menos al mismo tiempo) (Charnov *et al.*, 1985).

Maynard en 1978 resumió 4 modelos que explican la asignación del hermafroditismo: a) el modelo de la baja densidad: Una especie hermafrodita tendrá ventajas selectivas sobre las especies dioicas que requieren compañeros para reproducirse, esto sucede en situaciones en las que los individuos se encuentren a menudo en baja densidad, si los individuos son poco móviles o si individuos solos colonizan hábitat vacíos, lo que a su vez fortalece la auto-compatibilidad entre los hermafroditas, tal como se observa en algunas plantas. b) el modelo de la ventaja del tamaño: En los hermafroditas secuenciales la función macho o hembra es favorecida por individuos de diferentes tamaños, así organismos hermafroditas que ocupan el papel de hembras, producen más huevos, o si presentan el papel de machos, pelean por las hembras, lográndose aparear los machos de mayor tamaño. c) el modelo de la dispersión de los genes: es un recordatorio de dos implicaciones del hermafroditismo en la estructura genética de las poblaciones, el primero, un hermafrodita secuencial podría actuar como un sistema para reducir los apareamientos entre hermanos, y el segundo, los hermafroditas podrían incrementar el tamaño de población efectiva, de esta manera una población de

hermafroditas de tamaño N tiene el mismo tamaño de población efectiva que una población de $N/2$ machos y $N/2$ hembras y el tamaño efectivo más grande que el de una población dioica de tamaño N con una razón de sexos desigual. d) Asignación de recursos para la reproducción. Este modelo de Maynard y colaboradores (Charnov *et al.*, 1976; Maynard 1978) sugiere que el sistema sexual de una especie está determinado por la selección que actúa sobre el número de prole producida por individuos de diferentes tipos. Considerando que m , f y h son el número de machos, hembras y organismos hermafroditas, respectivamente, en una población, y que toda la prole tiene la misma tasa de supervivencia para llegar a la madurez, un macho puede producir N espermatozoides, una hembra puede producir n óvulos y un hermafrodita αN espermatozoides y βn óvulos, el comportamiento de su adecuación (denominado conjunto de adecuación o *fitness set*) puede ser representado como una gráfica de α contra β (figura 2).

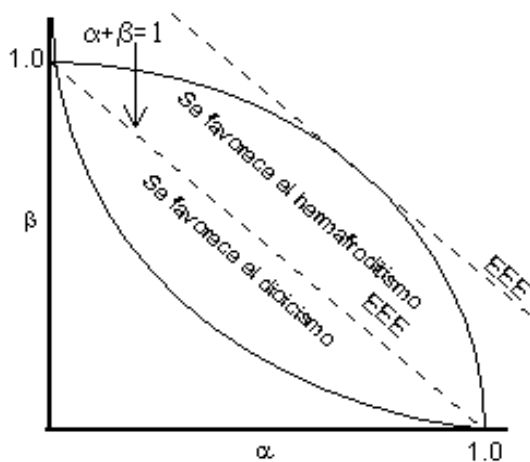


Figura 2. *Fitness set* para la asignación de recursos para la función sexual. α significa los espermatozoides producidos por un hermafrodita como una fracción del total producido por un individuo macho. β es el parámetro correspondiente para una hembra. Una curva cóncava sugiere que una población hermafrodita no presenta una “estrategia evolutivamente estable” (EEE), mientras que una curva convexa sí lo es. Para los organismos dioicos ocurre lo contrario. Las líneas punteadas representan el estado óptimo para cada estrategia (Charnov *et al.*, 1976 y Eguiarte *et al.*, 1999).

Considerando que la población produce una prole R y que el término adecuación es el número esperado de prole de un individuo, entonces la adecuación de un macho es: $(W_m) = R/(m + \alpha h)$; la adecuación de una hembra: $(W_f) = R/(f + \beta h)$ y la adecuación de un hermafrodita $(W_h) = R[\alpha/(m + \alpha h) + \beta/(f + \beta h)]$. En el caso de $m = f = 0$, $h = 1$, la población es hermafrodita, y para que tenga una estrategia evolutivamente estable o

EEE, la mayoría de los miembros deberán ser hermafroditas y evitar que sean invadidos por mutantes que adopten otra estrategia, así los miembros hermafroditas de la población asignarán sus recursos equitativamente para la formación de gametos masculinos y femeninos.

Ha sido ampliamente discutido que los animales hermafroditas simultáneos pueden llegar a presentar conflictos en el momento del apareamiento, teniendo que decidir si presentan autofecundación (*self-fertilization* o *selfing*) o entrecruzamiento (*cross-fertilization* o *crossing*). Sobre este último se ha planteado un sistema teórico denominado “Dilema del hermafrodita” que surge del conflicto que puede tener un hermafrodita simultáneo previo al apareamiento bajo un papel sexual (de macho o hembra) preferido. Este sistema de juego cuya “suma es no cero” (*non-zero sum*) tiene su origen con el “Dilema del prisionero”, “El juego de la gallina” y “Como las dan las tomo” (anexo 1). En la figura 3, se muestra una matriz de pago de recompensa sobre el Dilema del hermafrodita, en el que T es el pago por el papel preferido, R es la recompensa en el apareamiento en ambos papeles, S es el cobro del que adopta el papel no preferido y P el “castigo” por pretender aparearse bajo un solo papel preferido (Leonard 1990).

		Jugador B	
		Se ofrece a su compañero en ambos papeles	Insiste en un papel preferido
Jugador A	Se ofrece a su compañero en ambos papeles	R,R	S,T
	Insiste en un papel preferido	T,S	P,P

Los cobros de recompensa son: $T > R > S$; siendo $R > P$

Figura 3. Matriz de recompensa para una visión general del “Dilema del hermafrodita”

En un sistema *in vitro* en el que se emplearon marcadores de microsatélites en el céstodo *Schistocephalus solidus*, mostró que este parásito tiene un sistema de reproducción mixto (*selfing/crossing*), y cierto grado de conflicto reproductivo que podría reducir la tasa de *selfing* en el gusano adulto (Lüscher y Milinski 2003).

CICLO DE VIDA

El ciclo de vida de *T. solium* (Figura 4) incluye un portador del parásito adulto que libera al medio, a través de sus heces, proglótidos grávidos llenos de huevos. El cerdo y, accidentalmente el ser humano, adquieren cisticercosis al comer los huevos de este parásito; el huevo eclosiona por acción de los jugos gástricos e intestinales, la pepsina y pancreatina digieren las envolturas protectoras del huevo y la oncosfera se libera. Con ayuda de sus ganchos y de sus secreciones enzimáticas, las oncosferas activadas penetran la pared intestinal hasta alcanzar los capilares sanguíneos y linfáticos, por

cuya corriente se transportan a diferentes tejidos del organismo, en donde se desarrollan hasta convertirse en cisticercos. En el cerdo, la oncosfera requiere de 60 a 70 días para transformarse en un cisticerco completamente desarrollado, el cual puede sobrevivir varios años en los tejidos del hospedero. El ciclo biológico de este parásito se completa cuando el ser humano ingiere carne de cerdo cruda o insuficientemente cocida que contiene cisticercos viables. Nuevamente, por acción de los jugos digestivos y las enzimas pancreáticas como la tripsina y la pepsina, junto con las sales biliares se induce la evaginación del escólex, el cual se adhiere a la mucosa del primer tercio del intestino delgado por medio de sus ventosas y ganchos rostellares, convirtiéndose paulatinamente en una tenia adulta al cabo de tres a cuatro meses, la cual es hermafrodita y, por ser generalmente solo un gusano, se reproduce por autofecundación (Flisser *et al.*, 1997; Pawlowski, 2002; Avila, 2003).

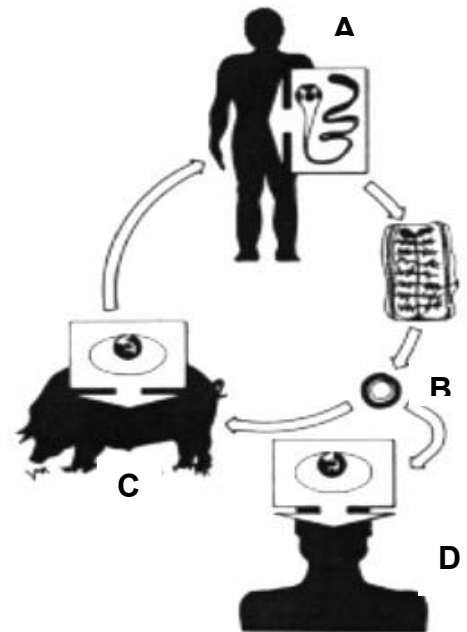


Figura 4. Ciclo de vida de *Taenia solium*. (A) Hospedero definitivo, portador del gusano adulto; (B) huevo, (C) hospedero intermediario natural y (D) hospedero intermediario accidental, en ambos se desarrollan los cisticercos.

VARIABILIDAD GENÉTICA

GENERALIDADES

La variación morfológica dentro de las especies la describieron los primeros taxónomos naturalistas; sin embargo, la base genética de la variación se comienza a entender hasta los trabajos de Mendel que descubre la herencia por segregación de caracteres y su distribución independiente en la progenie. No toda la variación es morfológica, de hecho la mayor parte de la variación es genética y no es visible; por ello, para medir la variación genética se desarrollaron inicialmente técnicas de isoenzimas y después las moleculares (RFLP, RAPD, microsatélites, secuenciación, etc) para detectar polimorfismos de un gen o *locus*. Hardy y Weinberg describieron un estado teórico (“equilibrio de Hardy-Weinberg”) en el cual las frecuencias genéticas de los individuos que constituyen una población no se modifican y presentan una relación simple entre las frecuencias alélicas y las genotípicas, las cuales se conocen como las proporciones de Hardy-Weinberg (Hartl y Clark, 1989). Para que se produzca este estado se requiere que la población sea infinita, que haya panmixia (apareamientos al azar) y que generaciones diferentes no se sobrepongan (generaciones discretas), además de que no actúen las denominadas “fuerza evolutivas”, como son la mutación, deriva génica, selección natural y flujo génico (migración). Estas fuerzas evolutivas son las productoras o eliminadoras de la variación genética, pues la mutación y la migración son promotoras de la variación genética, mientras que la selección natural y la deriva génica (que produce endogamia) disminuyen la variación. La selección natural puede ser también promotora de la variación, pero solo en el caso que favorezca el establecimiento de los heterocigotos en el proceso conocido como “selección balanceadora” (Hartl y Clark, 1989; Navarro, 1999; Núñez-Farfán y Eguiarte, 1999).

La variación genética dentro de una población se expresa comúnmente mediante la proporción de individuos heterocigotos contados directamente (heterocigosis observada o H_{obs}) o esperados, a partir de las frecuencias alélicas (heterocigosis esperada o H):

$$H = 1 - \sum_{i=1}^m p_i^2$$

donde p_i^2 es la frecuencia del alelo i , mientras que m es el número de alelos observados en el *locus*; así, en el caso de dos alelos, la frecuencia máxima de heterocigotos esperada es de 0.5, aunque en el caso de poblaciones con un número muy grande en frecuencias alélicas iguales, se puede llegar a una $H = 1$. Otro parámetro de variación genética es la proporción de *loci* polimórficos (P), que es la proporción de *loci* variables considerando en un sentido práctico a los *loci* polimórficos como aquellos cuya frecuencia del alelo más común sea menor que 0.95 o 0.99 (ambos puntos de corte establecidos de manera arbitraria). Así, el cálculo de P se obtiene mediante el cociente:

$$P = \frac{x}{m}$$

donde x es el número de *loci* polimórficos en una muestra de m *loci*. Este parámetro es menos confiable que H en una población, ya que es sensible al número de *loci* analizados (Hartl y Clark, 1989; Hedrick, 1999).

Siempre que hay movimientos de genes de una parte del área de distribución de una especie a otra hay flujo génico. Esta fuerza evolutiva tiende a reducir las diferencias genéticas entre las poblaciones. Como estimadores del flujo génico se han propuesto métodos directos e indirectos. Los métodos directos implican observaciones detalladas de la especie, movimiento de adultos, marcaje y recaptura de individuos. Los métodos indirectos son aquellos en los que a partir de análisis con marcadores isoenzimáticos o de DNA se pueden obtener parámetros de diferenciación poblacional (Slatkin, 1999). El

coeficiente de coancestría Θ de Weir y Cockerman (1973; 1984), es un estadístico de diferenciación poblacional que indica la correlación de alelos de diferentes individuos dentro de una población y puede considerarse equivalente al F_{ST} de Wright ($\Theta = F_{ST}$)

CÉSTODOS

El corrimiento electroforético de isoenzimas o electroforesis multiloci de enzimas (MLEE), fue la primera técnica empleada para medir la variación poblacional en la que los perfiles de isoenzimas, llamados también electromorfos, permiten obtener la proporción de *loci* polimórficos y las heterocigosis observada y esperada (Lewontin y Hubby, 1966). Lymbery y Thompson (1988) analizaron 20 *loci* enzimáticos en cinco poblaciones de *Echinococcus granulosus* de diferentes áreas geográficas de Australia y encontraron que la diversidad entre poblaciones, observada por los electromorfos, fue más baja comparativamente a los valores reportados para helmintos parásitos o invertebrados de vida libre (Cuadro 2), probablemente debido a que la colonización de *Echinococcus* en Australia es relativamente reciente ya que fue introducido por los exploradores europeos.

Al comparar los corrimientos electroforéticos de isoenzimas de cisticercos de *Taenia taeniaeformis*, recuperados de roedores capturados en diferentes regiones de Japón y de infecciones experimentales con cepas mantenidas en laboratorio, se observó que los valores de heterocigosis observada fluctuaron entre 0.000 a 0.090 en las muestras de roedores silvestres y en los roedores de laboratorio fue 0.000, esto último indica que experimentalmente se tienen cepas de *T. taeniaeformis* sin variabilidad con alelos fijos (Okamoto *et al.*, 1995).

Cuadro 2. Promedio y error estándar (EE) de la proporción de *loci* polimórficos (P) y la heterocigosis esperada (H) en 5 poblaciones australianas de *E. granulosus*, comparados con los valores de 38 especies de helmintos parásitos y 371 especies de invertebrados de vida libre*.

	H (EE)	P (EE)
<i>Echinococcus</i>	0.04 (0.01)	0.15 (0.02)
Helmintos parásitos	0.08 (0.01)	0.31 (0.03)
Invertebrados de vida libre	0.10 (0.01)	0.38 (0.01)

*Datos compilados por Thompson y Lymbery (1995) a partir de datos de isoenzimas.

Con el advenimiento de las técnicas de biología molecular como los RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*); RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*); secuenciación de nucleótidos de fragmentos de DNA obtenidos por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) y SSCP (*Single Stranded Conformation Polimorphysm*) entre otras que permiten analizar grandes números de individuos, se ha confirmado la existencia de variación genética dentro y entre poblaciones de céstodos. Por ejemplo, en *Echinococcus* se encontró la misma relación filogenética entre cepas de *E. granulosus* al analizar perfiles de RAPD y de isoenzimas en ejemplares recuperados de diferentes hospederos en España (Siles-Lucas *et al.*, 1996). Asimismo se encontró una correlación entre los perfiles de RAPD y los genotipos de *E. granulosus* (G1-G9) obtenidos por la secuenciación de nucleótidos de la subunidad 1 del gene mitocondrial de la citocromo C oxidasa (COI), además de cierto grado de variabilidad entre los aislados del mismo genotipo (Scott y Mcmanus, 1994; Maravilla *et al.*, 2004). *Echinococcus* obtenidos de cerdos de Eslovenia mostraron una asociación entre el perfil isoenzimático de la glucosa 6-fosfato isomerasa (GPI) y la malato deshidrogenasa (MDH) con los perfiles de RAPD para los genotipos correspondientes a la cepas porcina y ovina (Turčeková *et al.*, 2003).

El análisis por RAPD y por secuenciación del espacio intergénico de transcripción 2 (ITS2) del DNAr de 8 ejemplares adultos de *Taenia saginata asiática*, 2 de *T. saginata* y 1 de *T. solium* (recuperados principalmente de China y Corea) mostró que *T. saginata asiática* y *T. saginata* compartían una alta homología entre sus secuencias, además de que el perfil de RAPD entre las tres tenias fue homogéneo intra-especie y diferente entre especies, la ausencia de variabilidad pudo deberse al número pequeño de ejemplares estudiados (Eom *et al.*, 2002).

TAENIA SOLIUM

Existen pocos estudios que describen la diversidad de *T. solium*. McManus *et al.* (1989), mientras ensayaban métodos de detección de huevos por hibridación del DNA por *southern-blot*, encontraron que había cierta variabilidad dentro del DNA de cisticercos recuperados de India, México y Zimbabwe; sin embargo, no se llevaron a cabo más ensayos sobre variabilidad, debido a que su trabajo no estaba enfocado a ello. Posteriormente, el mismo grupo reportó pequeñas variaciones de tres cambios de nucleótidos conservados en los codones de la secuencia de 366 nucleótidos del gene mitocondrial COI de aislados de *T. solium* obtenidos de India, China y Zimbabwe (Bowles y McManus, 1994). La variabilidad genética en *T. solium* también se ha analizado con las secuencias de los DNA totales (mitocondriales y nucleares) que codifican para la COI, el espacio intergénico de transcripción 1 (ITS1) nuclear y el antígeno diagnóstico Ts14. La secuencia del producto de amplificación de COI en 21 cisticercos individuales (15 peruanos, dos de Filipinas y uno de cada uno de los siguientes países: China, Colombia, India y México) presentaron diferencias de 1 a 8 nucleótidos; sin embargo, todos los cisticercos peruanos tuvieron una secuencia idéntica. El análisis de la secuencia del ITS 1 se realizó por clonación del DNA de 6 cisticercos (dos peruanos, dos colombianos, uno de Filipinas y uno de México) y

mostró 13 diferencias nucleotídicas en las 22 clonas obtenidas. El análisis de la secuencia del Ts14 se realizó con un cisticerco de China, otro de India y otro de Perú, este último presentó cambios en tres nucleótidos (Hancock *et al.*, 2001). Estos autores concluyen que las variaciones en las cepas no tienen un papel importante en las manifestaciones clínicas, que hay una mínima diversidad genética dentro de la especie de *T. solium* y que las poblaciones de parásitos son homogéneas dentro de un área geográfica limitada, en la discusión de la presente tesis se confrontan estas conclusiones, ya que emplearon genes conservados y un tamaño de muestra reducido.

También se analizó la secuencia de los genes mitocondriales CO1 y de la citocromo b (Cytb) de 13 aislados de *T. solium* recuperados de Asia (China, India, Java y Tailandia), Latinoamérica (Bolivia, Brasil, Ecuador, México y Perú), y África (Camerún, Mozambique y Tanzania). Para el gen COI se encontró que en 28 sitios ocurrieron cambios de nucleótidos (1.7% de la longitud total del gen), mientras que para Cytb se observaron 31 cambios (2.9% de la longitud total del gen). El análisis filogenético global mostró dos genotipos que se reflejaron como agrupaciones: uno en el que se asociaron los cisticercos de Latinoamérica junto con los de África y otro en el que se agruparon los cisticercos asiáticos (Figura 5) (Nakao *et al.*, 2002). Según estos autores, sus resultados, junto con los datos históricos de la domesticación porcina, distribución de cerdos y la colonización europea, muestran que *T. solium* se introdujo de Europa recientemente con la conquista a Latinoamérica y a África hace 500 años, mientras que su distribución hacia los países asiáticos fue a través de un evento independiente.

Recientemente, se encontró una $H = 0.163$ y una $P = 0.433$ al analizar por RAPD a 90 cisticercos de *T. solium* provenientes de cerdos infectados de manera natural en comunidades de Morelos, Puebla y Yucatán en México, y de dos comunidades de Madagascar (Vega *et al.*, 2003).

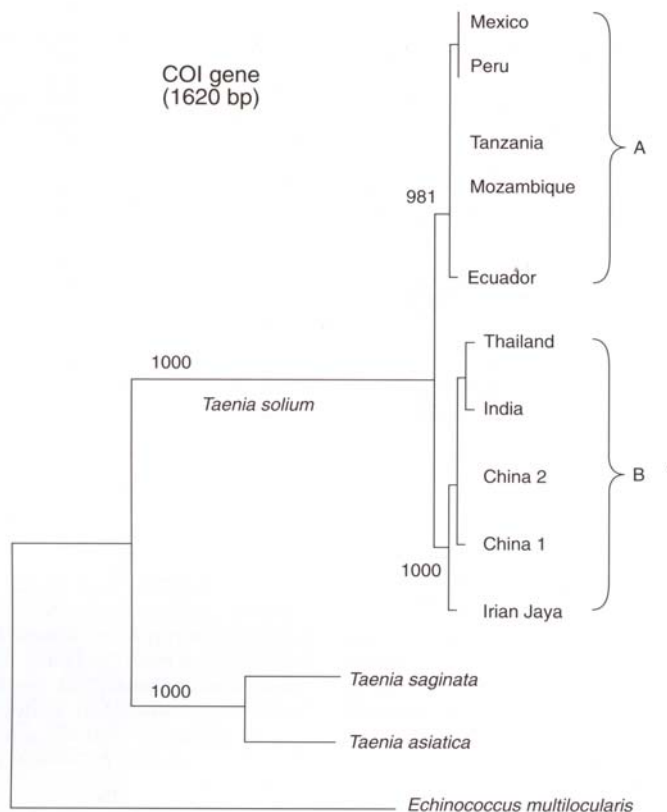


Figura 5. Árbol de neighbour-joining de la secuencia del gen de la COI de varios aislados (cisticercos) geográficos de *T. solium*, en la que se observan 2 linajes principales, el afroamericano (A) y el asiático (B) (Nakao *et al.*, 2002).

Cromosomas, DNA mitocondrial (DNAMt) y rearrreglos genéticos

En estudios de microscopía electrónica llevados a cabo en el cuello de cisticercos evaginados de *T. solium*, se observó la presencia de 6 a 9 pares de cromosomas, empaquetados en cúmulos discretos de cromatina unidos a cinetocoros, microtúbulos y centriolos (Willms *et al.*, 2001), aunque este patrón de profase es observado continuamente en el cuello y estróbilo de la tenia, nunca se han observado células en metafase (comunicación personal con la Dra. Willms). Los cariotipos de otros céstodos como *Echinococcus multilocularis* y *Cyathocephalus truncatus* presentaron 9 pares de cromosomas ($2n= 18$) con agrupaciones subtelocéntricas y acrocéntricas (Raush y Raush, 1981; Petkeviciute, 1996).

El genoma mitocondrial es circular, haploide, que se hereda maternalmente, con características que sugieren un origen procariote. Este genoma codifica para: 12 o 13 enzimas vitales en la cadena respiratoria, 2 RNA ribosomales (RNAr) y 22 RNA de

transferencia (RNAt), además de pequeñas secuencias intergénicas variables y regiones no codificantes (Thanh *et al.*, 2002). En el 2000 se publicó la estructura y secuencia del DNAm_t de *T. solium* y *Echinococcus granulosus*, teniendo longitudes de 13,709 pb y 13,738 pb respectivamente (Figura 6) (Nakao *et al.*, 2000).

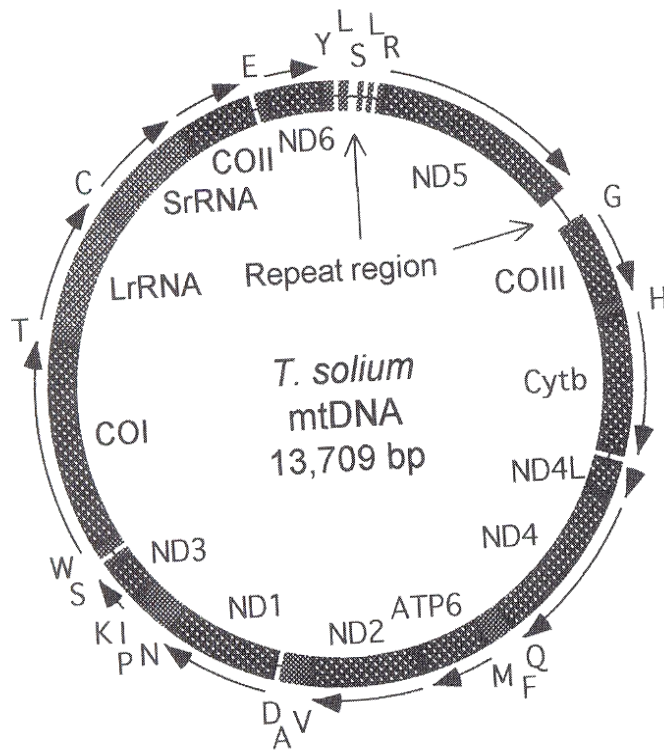


Figura 6. Genoma mitocondrial de *T. solium*. Las flechas indican la dirección de la transcripción. LrRNA y SrRNA: subunidades larga y corta del RNAr. Los genes para los RNAt están indicados como abreviaturas en letras mayúsculas para los aminoácidos que codifican. COI-III: Citocromo oxidasa subunidades I a III. ND 1-6 y 4L: NADH deshidrogenasa subunidades 1-6 y 4L. ATP6: ATPasa subunidad 6 (Nakao *et al.*2000).

Aunque no existen reportes de rearrreglos genéticos en *T. solium*, se han reportado múltiples repetidos cortos de dinucleótidos y trinucleótidos: 1(TG)_n, 2(CGG)_n, 3(TG)_n, 4(TGC)_n, 5(TGG)_n y 6(TG)_n, en las secuencias del ITS1 de distintas cepas y aislados de *Echinococcus*. Herwerden y colaboradores (2000) sugieren la existencia de al menos dos mecanismos de rearrreglos genéticos: un sistema de desplazamiento y otro de transposición /recombinación desigual, los que podrían explicar la divergencia y mantenimiento del polimorfismo en este parásito. La hipótesis de estos autores la basan en un sistema de evolución concertada, en la que este tipo de repetidos individuales en *tandem* debieron evolucionar coordinadamente intra especies y separadamente entre especies.

Electroforesis multiloci de enzimas (MLEE)

La MLEE de isoenzimas se lleva a cabo mediante el corrimiento de enzimas en un campo eléctrico a través de una matriz que funciona de soporte (almidón, acrilamida, agarosa o acetato de celulosa). Las enzimas migran durante un tiempo con un voltaje específico y se revelan mediante un sistema acoplado de reacciones de óxido-reducción y sustratos específicos, así se determina su movilidad relativa, la cual depende del tamaño, carga y forma de la molécula (Hedrick, 1999). Las isoenzimas representan todas las formas moleculares que catalizan la misma reacción pero que difieren en su estructura molecular debido a cambios en su secuencia de aminoácidos, ya sea por la expresión de más de un *locus* estructural, o por la de varios alelos múltiples (aloenzimas). Dentro de las isoenzimas también se incluyen formas múltiples de enzimas generadas por la asociación de subunidades proteicas expresadas de distintos genes estructurales (Figura 7) (Moss, 1982).

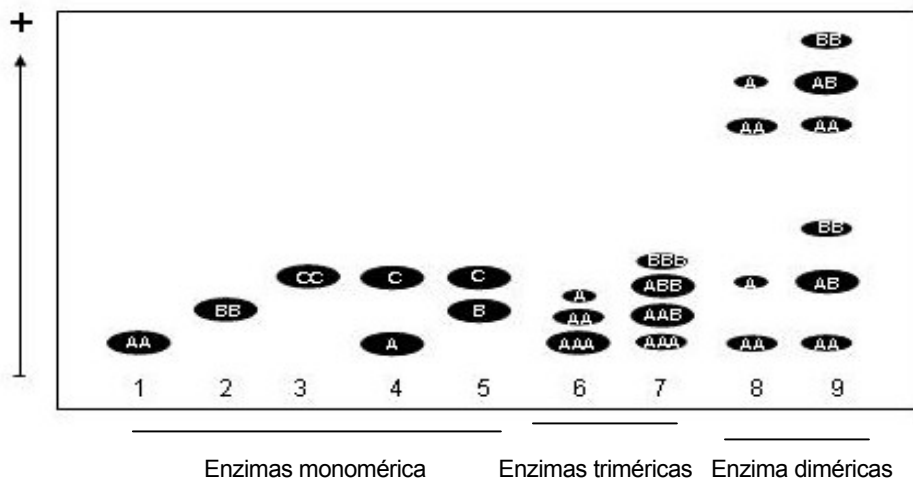


Figura 7. Ejemplos de electromorfos de enzimas monoméricas, diméricas y triméricas para uno y dos *loci* (carriles 1 a 7 y 8 a 9 respectivamente) en un gel de acetato de celulosa. Carriles 1 a 3 perfiles homocigotos para los alelos AA, BB y CC; carriles 4 y 5 perfiles heterocigotos para los alelos CA y CB; carriles 6 y 7 perfiles homocigotos (AAA, AA, A) y heterocigotos (AAA, AAB, ABB, BBB) de un enzima trimérica; carriles 8 y 9 perfiles homocigoto (AA, A) y heterocigoto (AA, AB, BB) de aloenzimas diméricas (Avisé, 1994).

El análisis de MLEE ofrece ventajas importantes como son: (a) el patrón de bandeo (electromorfo) obtenido en los perfiles electroforéticos, refleja la variabilidad genética de *loci* estructurales específicos; (b) las aloenzimas generalmente se expresan codominantemente, por lo que los individuos homocigotos y heterocigotos pueden ser diferenciados con precisión; (c) son técnicas fáciles de desarrollar y de aplicar a cualquier ser vivo; (d) permiten estudiar a diversas poblaciones lo que facilita la interpretación de resultados por los datos de la literatura. Sin embargo, existen limitaciones técnicas: (a) los genes que codifican a las isoenzimas representan una muestra pequeña, no aleatoria de *loci* estructurales; (b) solamente las sustituciones de nucleótidos que generen un cambio en la movilidad electroforética son evidentes y (c) no puede excluirse que una banda isoenzimática pueda representar dos alelos diferentes con una misma movilidad (Müller-Starck, 1998).

Amplificación Aleatoria del DNA Polimórfico (RAPD)

La técnica de amplificación aleatoria del DNA polimórfico o RAPD, por sus siglas en inglés *Random Amplified Polymorphic DNA*, se basa en un PCR tradicional; sin embargo, presenta la particularidad de emplear un único iniciador o *primer* de 9 ó 10 nucleótidos con secuencia aleatoria no palindrómica y cuyo contenido de guaninas y citocinas (G+C) es de 50 a 80%. Los polimorfismos obtenidos por esta técnica se producen por sustituciones de un nucleótido, inserciones y/o deleciones que alteran el sitio de reconocimiento del iniciador (Müller-Starck, 1998). Debido a que una banda de cierto peso molecular por *locus* se puede producir igualmente por el homocigoto dominante o por el heterocigoto (los cuales no pueden distinguirse en esta técnica), se considera que los RAPD son marcadores dominantes (Williams *et al.* 1990). El uso de RAPD se ha difundido ampliamente ya que: a) no se requiere tener un conocimiento previo del genoma del organismo que se va a estudiar; b) se analizan múltiples *loci*, ya que la amplificación obtenida es determinada por la secuencia del iniciador, la cual es arbitraria y se pueden

obtener muchas bandas sin preparación previa (hibridación o marcaje); c) la técnica es relativamente fácil de montar, rápida y es más segura pues utiliza fluorescencia en vez de radioactividad; d) se requieren cantidades pequeñas de tejido para obtener DNA, lo que permite estudiar a organismos difíciles de obtener o en peligro de extinción; e) requieren una cantidad pequeña de DNA (menos de 50 ng por reacción) para obtener amplificadores claros y reproducibles; f) los RAPD son marcadores dominantes y neutros que permiten un muestreo general del genoma nuclear y de organelos, ya que se pueden amplificar genes, secuencias intergénicas, sitios de regulación y pseudogenes, siendo así más sensibles a los polimorfismos, que teóricamente deberían ocurrir más frecuentemente en zonas no codificadoras; g) la sustitución en una base del iniciador puede producir un patrón diferente de bandeo, lo que muestra la sensibilidad de la técnica; h) se han obtenido perfiles reproducibles de RAPD con DNA parcialmente degradado (Welsh y McClelland, 1990; Williams *et al.* 1990; Stewart y Porter, 1995; Navarro, 1999).

También existen factores que limitan el uso de los RAPD: a) la reproducibilidad de las bandas puede afectarse dependiendo del termociclador empleado, pero sobre todo de las concentraciones de los reactivos (*Taq* polimerasa, iniciador, Magnesio, dNTP's, iniciadores); b) la co-migración de bandas puede hacer que 2 bandas de tamaño similar de más de 2000 pb puedan traslaparse y parecer la misma; c) la subestimación de la variación genética, ya que al ser los RAPD marcadores dominantes, las frecuencias genéticas tienen que ser estimadas partiendo del supuesto de que están en equilibrio de Hardy-Weinberg; d) diferencias en la intensidad de las bandas, ya que un amplicón rara vez tiene bandas de la misma intensidad y cuando se va a leer el gel es importante determinar el criterio de lectura a seguir para asegurar que siempre las bandas tienen la misma intensidad aun en geles diferentes (Williams *et al.* 1990; Khandka *et al.* 1997; Hormaza *et al.* 1997; Grosberg *et al.* 1996, Navarro, 1999).

JUSTIFICACIÓN

Debido a que el conocimiento de la estructura poblacional de *Taenia solium* es escaso, la presencia o ausencia de variación genética que conduzca a la generación de cepas en este parásito podría ayudar a comprender el polimorfismo clínico, inmunológico y de tratamiento que se presenta en la cisticercosis (Ito *et al.* 2002). Además, aparentemente existen dos genotipos o “sub-cepas” en *T. solium*: la asiática y la latinoamericana-africana, las cuales pueden correlacionar con las manifestaciones clínicas que se presentan en la cisticercosis humana (Nakao *et al.*, 2002) aunque se deben llevar a cabo más estudios para confirmar esto. Asimismo, Thompson y Lymbery (1995) consideran que para poder definir a una cepa, esta debe cubrir dos características fundamentales que son: (1) deben ser genéticamente diferentes; y (2) deben diferir en rasgos con impacto epidemiológico y en la patología de la parasitosis.

Hasta el momento, no existen reportes sobre el desequilibrio de ligamiento y la clonalidad en *T. solium*, por ello resulta importante llevar a cabo estudios concernientes a la variación intra-especie en este parásito y conocer el efecto que han tenido distintas fuerzas evolutivas como flujo génico, deriva génica, endogamia y presencia de linajes clonales, que a su vez impulsen estudios enfocados a la epidemiología molecular y al control de este parásito.

HIPÓTESIS

La restricción en la variabilidad genética de *Taenia solium*, generada por tratarse de una especie hermafrodita que se autofecunda, se refleja en la similitud molecular y existencia de linajes clonales o cepas de este parásito en diferentes poblaciones de hospederos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la variabilidad genética en *Taenia solium*, por medio de perfiles de isoenzimas y de RAPD en aislados de parásitos recuperados de distintas regiones geográficas.

MATERIAL Y MÉTODOS

El diseño experimental se muestra en la Figura 8.

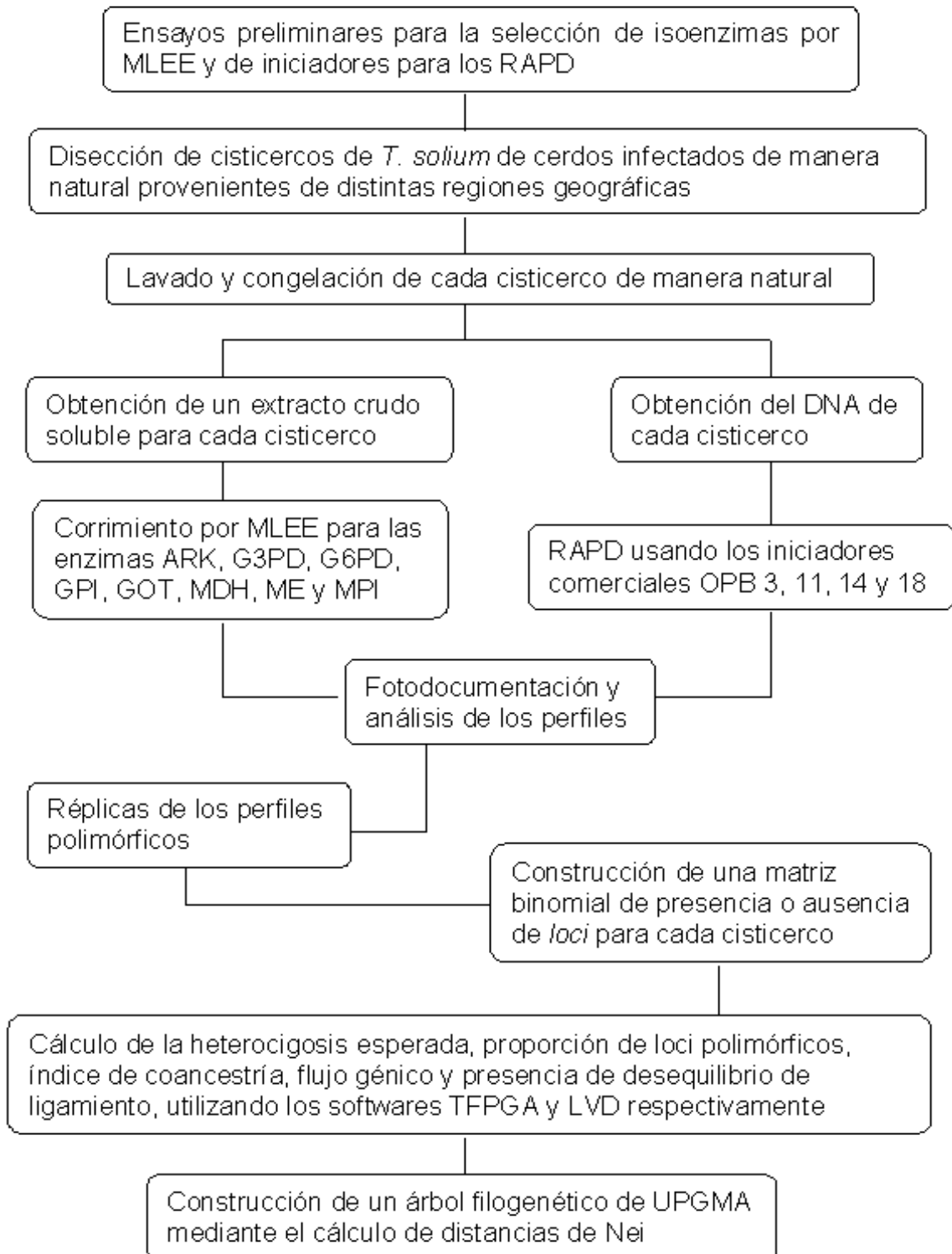


Figura 8. Diseño experimental para el estudio de la variabilidad intra-especie en *T. solium*

OBTENCIÓN DE CISTICERCOS Y TENIAS

Para el análisis de isoenzimas, se llevó a cabo la disección de cisticercos de *Taenia solium* de la carne de cerdos infectados de manera natural en distintas poblaciones rurales de México (Estado de México, Morelos, Guerrero y Puebla) y Colombia (Cali) entre 1996 y 1998. Debido a que los cerdos parasitados fueron adquiridos en mercados y en rastros locales donde se llevan a cabo el comercio y tráfico de cerdos de distintas comunidades, fue difícil ubicar la procedencia y sitios de infección exactos de los cerdos. Los cisticercos recuperados se lavaron en solución salina amortiguada con fosfatos 0.01 M, pH 7.2 (SSAF), se secaron en papel filtro y algunos de ellos se congelaron individualmente a -70 °C hasta su uso. Además, con la finalidad de detectar actividad isoenzimática especie y estadio específica, se incluyeron proglótidos inmaduros de *Taenia solium* y *Taenia saginata* recuperados mediante el tratamiento con prazicuantel a portadores detectados en un estudio previo en Morelos (Plancarte *et al.*, 1999), los cuales se lavaron y congelaron a -70 °C. Asimismo también se incluyeron proglótidos inmaduros de *Taenia taeniaeformis* obtenidos por la desparasitación de gatos infectados experimentalmente.

Para el estudio molecular se consiguieron cerdos cisticercosos infectados en comunidades conocidas, evitando en lo posible lugares de concentración (mercados y rastros); así, el análisis por RAPD se realizó con cisticercos recuperados de un cerdo de Tecpan de Galeana, Guerrero en noviembre de 1997; dos cerdos de El Quebrantadero, Morelos en marzo y septiembre de 1998, uno de la zona conurbana de la ciudad de Mérida, en marzo de 2000, uno de un rastro de Tegucigalpa, Honduras en julio de 2001 y un cerdo del rastro local de Arusha, Tanzania en agosto de 2002. Los cisticercos se manejaron y conservaron de la misma manera que para el análisis de isoenzimas, con excepción de los cisticercos africanos, los cuales se conservaron en etanol al 70%; asimismo, los cisticercos de Honduras y Yucatán se mantuvieron a 4 °C (cadena fría) hasta su llegada a la Ciudad de México donde se congelaron inmediatamente. De cada cerdo se

seleccionaron 30 cisticercos y cada conjunto se identificó con una letra: los cisticercos de Tecpan de Galeana se les denominó aislado "a", a los de El Quebrantadero de marzo y septiembre aislados "b" y "c" respectivamente, a los de Mérida, aislado "d", a los de Honduras, aislado "e" y a los de Tanzania, aislado "f", de este último se obtuvieron 10 cisticercos.

PERFILES DE ISOENZIMAS

OBTENCIÓN DE EXTRACTOS SOLUBLES

Como un primer paso para evaluar el polimorfismo en aislados de *T. solium*, se analizaron individualmente 10 cisticercos de cada uno de 7 cerdos de México y de uno de Colombia, así como proglótidos de distintos ténidos, mediante electroforesis de isoenzimas en acetato de celulosa. Para esto, los cisticercos individuales se descongelaron lentamente manteniéndose en baño de hielo, se homogenizaron en un tubo de vidrio (mortero) de 1.5 ml de fondo cónico y pistilo esmerilados, con agua destilada a una proporción 1:2 (v/v). Posteriormente se centrifugaron en una microcentrífuga Eppendorf a 14,000 rpm durante 15 a 30 segundos para separar el detritus celular. Los sobrenadantes se conservaron en baño de hielo para su análisis inmediato.

ELECTROFORESIS DE ISOENZIMAS

Las electroforesis en acetato de celulosa se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Hebert y Beaton (1993) y por Johnston y Fernando (1997), se ensayaron las siguientes enzimas: aconitato deshidrogenasa (ACON, EC. 4.2.1.3); adenilato cinasa (AK, EC. 2.7.4.3); alcohol deshidrogenasa (ADH, EC. 1.1.1.1); arginina cinasa (ARK, EC. 2.7.3.3); glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD, EC. 1.1.1.49); glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI, EC. 1.2.1.12); gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (G3PD, EC. 1.2.1.12); transaminasa glutámico-oxalacética (GOT, EC. 2.6.1.1); hexocinasa (HK, EC. 2.7.1.1); isocitrato deshidrogenasa (IDH, EC. 1.1.1.42); lactato deshidrogenasa (LDH, EC.

1.1.1.27); malato deshidrogenasa (MDH, EC, 1.1.1.37); enzima málica (ME, EC. 1.1.1.40); manosa-6-fosfato deshidrogenasa (MPI, EC. 5.3.1.8); peptidasa (PEP, EC. 3.4.11); fosfoglucomutasa (PGM, EC. 5.4.2.2); 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD, EC. 1.1.1.44); superóxido dismutasa (SOD, EC. 1.15.1.1); $\alpha\alpha$ trialosa ($\alpha\alpha$ TRE, EC. 3.2.1.28) y xantina deshidrogenasa (XDH, EC. 1.1.1.204).

Se colocaron 3 μ l de 11 sobrenadantes en una placa de 76x76 mm de acetato de celulosa Titan III (Helena Laboratories, Beaumont, TX), previamente humidificadas por capilaridad con solución amortiguadora de corrimiento, mediante el sello Super Z-12 (Helena Laboratories). Las soluciones amortiguadoras de corrimiento, voltaje y el tiempo aplicado se establecieron experimentalmente de acuerdo al comportamiento y resolución de cada enzima y se resumen en los cuadros 3 y 4. Cada placa se cubrió con 2 ml de agar al 1.6% (m/v) que contenía la solución amortiguadora de corrimiento y se incubaron en oscuridad dentro de una estufa a 37 °C hasta la aparición de bandas bien definidas, el agar se retiró mediante un chorro de agua destilada y se dejó secar al aire. Como control se incluyeron extractos solubles de músculo de cerdo, los cuales se procesaron de la misma manera. Debido a la alta intensidad y a un difuso corrimiento en la GPI, fue necesario emplear diferentes condiciones de corrimiento para los estadios de adulto y de cisticerco de *T. solium* (Cuadro 3).

Cuadro 3. Condiciones para la electroforesis en acetato de celulosa.

Enzima	Solución amortiguadora de corrida	Tiempo (min)	Volts
G6PD, MDH, GPI ^C	CAAPM ¹	120	38
HK, IDH, PEP, GOT	TM ²	20	38
ACON, AK, ARK, ADH, LDH, ME, SOD, G3PD, 6PGD, GPI ^A , MPI, PGM, $\alpha\alpha$ TRE y XDH.	TM ²	20	170

¹ 0.22 M de ácido cítrico, 5%(v/v) 4-(3-aminopropil) morfolina, pH 8.2; ² 0.25 M TRIS, 0.05 M ácido málico, pH 7.8; ^A Solo para el adulto; ^C Solo para el cisticerco

Cuadro 4. Soluciones para revelar el perfil isoenzimático de las enzimas ensayadas.

Enzima	Soluciones de revelado
ACON ^{a,c}	16 gotas de ácido cis-aconítico (10 mg/ml), pH 8.0, 6 gotas de MgCl ₂ (20 mg/ml), 10 µl de IDH ^b
AK ^{a,d,e}	1.5 ml de solución de ADP (0.01 g ADP + 0.315 g D-glucosa/ml), 6 gotas de MgCl ₂ (20 mg/ml), 15 µl de hexocinasa ^g , 5 µl G6PD ^h .
ADH ^{a,d}	3 gotas etanol
ARK ^{a,d,f}	5 gotas de MgCl ₂ (20 mg/ml), 5 gotas de fosfo-L-arginina (20 mg/ml), 5 gotas de sol. de ADP (0.01 g ADP + 0.315 g D-glucosa/ml), 10 µl hexocinasa ^g , 10 µl G6PD ^h .
G6PD ^{a,c,f}	12 gotas D-glucosa-6-fosfato (20 mg/ml), 6 gotas de MgCl (20 mg/ml).
GPI ^{a,d,f}	5 gotas de fructosa-6-fosfato (20 mg/ml), 10µl G6PD ^h
G3PD ^{a,d}	1 ml de solución de D-fructosa-1,6-difosfato (20 mg de fructosa-1,6-difosfato + 12.5 µl Aldolasa ⁱ /ml), 5 gotas de Na ₂ HAsO ₄ (10 mg/ml)
HK ^{a,d,e}	16 gotas de solución de ATP (25 mg ATP + 500 mg D-glucosa/ml), 6 gotas de MgCl ₂ (20 mg/ml), 10 µl G6PD ^h
IDH ^{a,c,e}	15 gotas DL-ácido isocítrico (100 mg/ml), 8 gotas de MgCl ₂ (20 mg/ml)
LDH ^{a,c}	4 gotas de ácido láctico
MDH ^{a,d,f}	13 gotas de sustrato málico (20 mg ácido málico + 1.1 ml 0.2 M Tris HCl, pH 9.0 + 1 ml agua), pH 8.0
ME ^{a,c,f}	2 gotas de MgCl ₂ (20 mg/ml), 12 gotas de sustrato málico (20 mg ácido málico + 1.1 ml 0.2 M Tris HCl, pH 9.0 + 1 ml agua), pH 8.0
MPI ^{a,d,f}	5 gotas de manosa-6-fosfato (20mg/ml), 5 µl GPI ^j , 20 µl G6PD ^h .
PEP	2.0 ml 0.02M Na ₂ HPO ₃ , pH 7.5), 4 gotas de Peroxidasa ^k , 8 gotas de O-dianisidina (4 mg/ml) , 2 gotas de MgCl ₂ (20 mg/ml), 8 gotas de L-Leucina-L-Alanina(10 mg/ml), 4 gotas de L-amino acido oxidasa ^l .
PGM ^{a,d,f}	5 gotas de solución de glucosa-1-fosfato (50 mg glucosa-1-fosfato, Grado III + 50 mg glucosa-1-fosfato, Grado VI/ml)
6PGD ^{a,c,f}	6 gotas de ácido 6-fosfogluconico (20 mg/ml), 6 gotas de MgCl ₂ (20 mg/ml).
SOD ^{a,f}	
αTriosa ^{a,c,f}	4 gotas de ATP (25 mg/ml), 5 gotas de MgCl ₂ (20 mg/ml), 5 µl hexocinasa ^g ,
XDH ^{a,d,f}	20 gotas de Hipoxantina (10 mg/ml)
GOT	3 ml de solución de GOT (1 mg piridoxal-5-fosfato, 46 mg ácido L-aspartico, 26 mg ácido α-cetoglutarico/ml; pH 7.4); 10 gotas de solución de Fast Blue BB al 3 % (m/v)

El revelado de la actividad enzimática requiere de los siguientes reactivos: ^a 5 gotas de PMS (2 mg/ml) y MTT (10 mg/ml); ^b Isocitrato deshidrogenasa (50 U/ml); ^c 1.5 ml de NADP (2 mg/ml); ^d 1.5 ml de NAD (2 mg/ml); ^e 0.5 ml 0.09 M Tris HCl, pH 7.0; ^f 1.0 ml 0.09 M Tris HCl, pH 8.0; ^g Hexocinasa (250 U/ml); ^h Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (300 U/ml); ⁱ Aldolasa (200 U/ml); ^j Glucosa-6-fosfato isomerasa (600 U/ml); ^k Peroxidasa (1000 U/ml); ^l L- amino oxidasa (10 U/ml)

PERFILES DE RAPD

OBTENCIÓN DEL DNA

Se purificó el DNA individual de 30 cisticercos de cada uno de los cerdos de México y del cerdo de Honduras y de 10 cisticercos para del cerdo de Tanzania (160 cisticercos en total). Cada cisticerco congelado se homogenizó con 100 μ l del reactivo comercial DNAZOL (Life Technologies, Grand Island, NY) dentro de un tubo de vidrio tipo Eppendorf de fondo y pistilo esmerilados en baño de hielo, la mezcla se centrifugó para separar el detritus en una microfuga a 14,000 rpm durante 10 min a 4°C, el sobrenadante viscoso que contenía al DNA se transfirió a un tubo nuevo y el DNA se precipitó en 1 ml de isopropanol, se lavó tres veces con etanol al 70% y se resuspendió en 30 a 50 μ l de NaOH 8 mM. La extracción del DNA de los cisticercos conservados en etanol se realizó con el estuche comercial Wizard^R Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, Madison, WS) siguiendo las indicaciones del proveedor. La concentración del DNA se determinó midiendo su absorbencia a 260 nm (A_{260}) en un espectrofotómetro Gene Quant RNA/DNA calculator (Pharmacia[®] Buckinghamshire, UK), considerando que la absorbencia de 1 unidad a 260 nm corresponde a 50 μ g/ml de DNA (Sambrook *et al.*, 1989).

SELECCIÓN DE INICIADORES

Para la selección de los iniciadores se llevó a cabo un ensayo de escrutinio con 20 iniciadores de la marca comercial OPERON, serie B (Operon Technologies Inc, Alameda, CA) reportados para *Echinococcus*, usando como templado mezclas de DNA obtenidas de varios adultos de *T. solium*). Los patrones de bandeo obtenidos para los iniciadores se muestran en la figura 9 para el DNA de adultos; y en el cuadro 5, para los amplicones obtenidos para cisticercos y adultos. Los iniciadores para los RAPD de todas las muestras se seleccionaron con base en el número de bandas obtenidas (más de tres y menos de 30), cuyos pesos moleculares fueran entre 100 a 2000 pares de bases (pb), identificables en geles de agarosa al 2%, y que se mantuviera un equilibrio entre el número de *loci* estadio-

específico. Por lo tanto, se seleccionaron los iniciadores: 5'-CATCCCCCTG (OPB3), 5'-GTAGACCCGT (OPB11), 5'-TCCGCTCTGG (OPB14) y 5'-CCACAGCAGT (OPB18). Llamó la atención la diferencia de *loci* entre los estadios adulto y larvario, situación que se analiza más adelante en la sección de discusión de esta tesis.

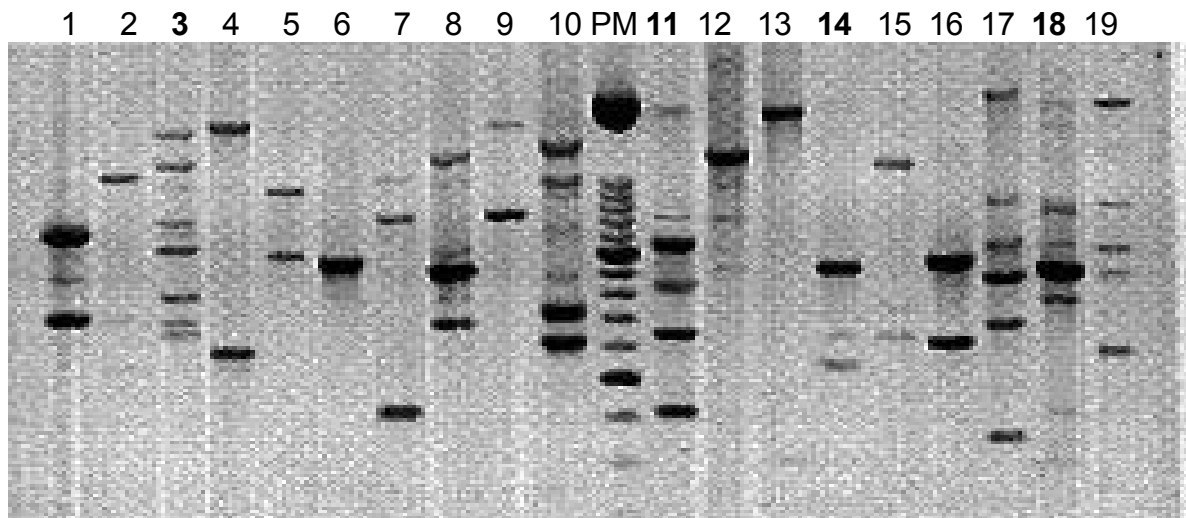


Figura 9. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y visualizado a través de luz UV. Patrones de RAPD de adulto de *T. solium* obtenidos con distintos iniciadores, utilizando el mismo *pool* de DNA como templado pero diferentes iniciadores. Cada carril corresponde al iniciador del mismo número OPB 1 a 19, en negritas se señalan los OPB seleccionados.

Cuadro 5. Productos de amplificación con iniciadores OPERON de la serie B, con DNA de adulto y cisticerco de *T. solium*

Iniciador	Productos de amplificación (<i>locus</i>)*
OPB 1	1150,900 ^A ,700,650 ^C , 500 ^C , 450 ^C
OPB 2	1600 ^A ,1050 ^C
OPB 3	2640 ^A ,1700,1600 ^A ,1500 ^C ,1200,1100 ^A ,1000,800,700,650,500 ^C ,400 ^C
OPB 4	2640,600,500,300 ^A
OPB 5	1450,1000,600 ^C
OPB 6	950,900 ^C
OPB 7	1500,1200,400
OPB 8	1700,1000 ^C ,900,800,700
OPB 9	2640,1300
OPB 10	2000 ^A ,1500 ^A ,1400 ^A ,1200 ^A ,900 ^A ,700 ^A ,600,500 ^C ,400 ^C
OPB 11	2640 ^A ,1250,1050,850,700 ^C ,650 ^A ,500 ^C ,400 ^A
OPB 12	1700 ^A ,1500 ^A ,1200 ^A ,1000 ^A ,900
OPB 13	2640 ^A ,300 ^C
OPB 14	900 ^A ,640,550 ^A ,450 ^C
OPB 15	1700 ^A ,750,600
OPB 16	950,650
OPB 17	2640,1400,1200 ^C ,1100,950,900 ^A ,700,350
OPB 18	2640,1300,1100,950 ^A ,800,500 ^C ,400 ^C ,300 ^C
OPB 19	2640, 1350, 1100, 950 ^A , 600

^A *Locus* exclusivo para el adulto. ^C *Locus* exclusivo para el cisticerco. En negritas se marcan los iniciadores seleccionados para esta tesis.

OBTENCIÓN DE PERFILES DE RAPD

Para obtener los productos de amplificación mediante ensayos de RAPD, se siguió el protocolo de Williams *et al.* (1990) que se describe a continuación: Las reacciones de amplificación se desarrollaron en un volumen total de 25 μl , el cual contenía 2.5 μl del amortiguador de reacción (Tris-HCl 10 mM, MgCl_2 1.5 mM, KCl 50 mM, Tween 20 0.05%. pH 8.3; 10x buffer), 100 μM de una mezcla de desoxinucleótidos (Nucleotidemix: dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.2 μl de solo uno de los iniciadores diluidos para obtener una concentración de 15.5 $\mu\text{g/ml}$, y 0.5 unidades de la enzima Taq DNA Polymerasa (todos los reactivos fueron de Roche, Boehringer Mannheim, Alemania). Durante la estandarización de esta técnica se ensayaron distintas concentraciones de DNA como templado (20, 30 y 50 ng) de algunos cisticercos, se seleccionó la concentración de 20 ng por presentar un patrón de bandeo constante y reproducible (figura 10). Asimismo, se consideró un control de DNA de cerdos (figura 11) y otro sin DNA, el primero fue para asegurar que los productos de amplificación (*loci*) correspondieran a los parásitos y no a una contaminación con DNA del hospedero, mientras que el segundo fue un control negativo en el que no se observaron amplicones lo que indica que no hay DNA contaminante en los reactivos que conforman la mezcla de reacción (figura no mostrada). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en 45 ciclos a 94°C durante 2 min, 36°C durante 1 min y a 72°C durante 2 min. Los productos del PCR se separaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2% en un amortiguador de TAE (Tris acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 7.5) durante 3 h a 80 V y se uso un patrón en escalera de 100 a 2640 pb, con separaciones de 100 pb entre las bandas, que sirvió para determinar el número de bases de las bandas amplificadas (XIV, Lakeside, Boehringer Mannheim, Alemania). El trabajo se realizó en áreas separadas con material nuevo y estéril, en una se llevó a cabo la mezcla de reacción y en otra se efectuó la electroforesis de los productos amplificados. Después de la electroforesis, las bandas se tiñeron con bromuro de etidio, visualizadas en un transiluminador de luz UV y se digitalizaron en un equipo Eagle Eye II Still Video System

(Stratagene, CA). Las bandas obtenidas de los RAPD se clasificaron en constantes (no polimórficas), variables (polimórficas) y exclusivas (aquellas bandas que fueron constantes y que solo estuvieron presentes en un aislado en particular). Además se hicieron las siguientes consideraciones según Brouwer *et al.* (2001) y Williams *et al.*, (1990): (1) Un *locus* puede ser polimórfico, mientras que un alelo no lo es. (2) Los productos de amplificación de los RAPD se segregan como alelos dominantes de forma Mendeliana, en la que los individuos heterocigotos y homocigotos dominantes tienen el mismo patrón de bandeo por *locus*; por lo tanto, cada banda registrada representa un *locus* independiente. Asimismo si se considera que solo existen dos alelos por cada *locus* (presencia o ausencia de una banda), entonces un *locus* está siempre presente en un individuo y la ausencia de una banda no significa que el *locus* esté ausente si no que se trata de un alelo diferente. (3) Las frecuencias genotípicas de los *loci* por RAPD están en equilibrio de Hardy-Weinberg. (4) Los alelos homocigotos recesivos o dominantes provienen de una mutación ancestral heredada de los padres.

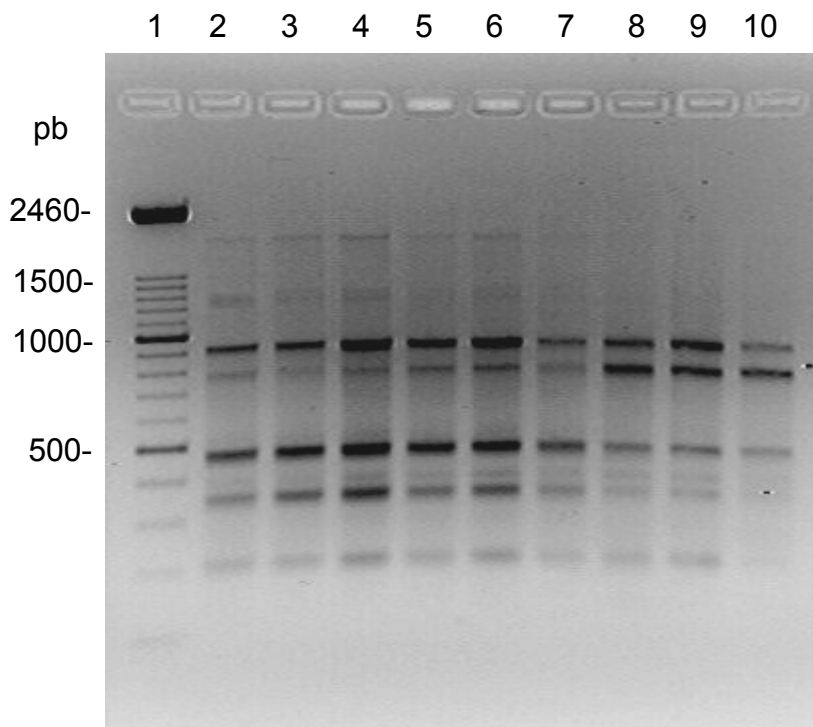


Figura 10. Perfil de RAPD empleando el iniciador OPB 18 para 3 concentraciones diferentes de un mismo DNA de cisticerco. Carril 1, pesos moleculares con diferencia de 100 pb entre cada uno; carriles 2-4, 20 ng de DNA; carriles 5-7 30 ng de DNA; carriles 8-10 50 ng de DNA.

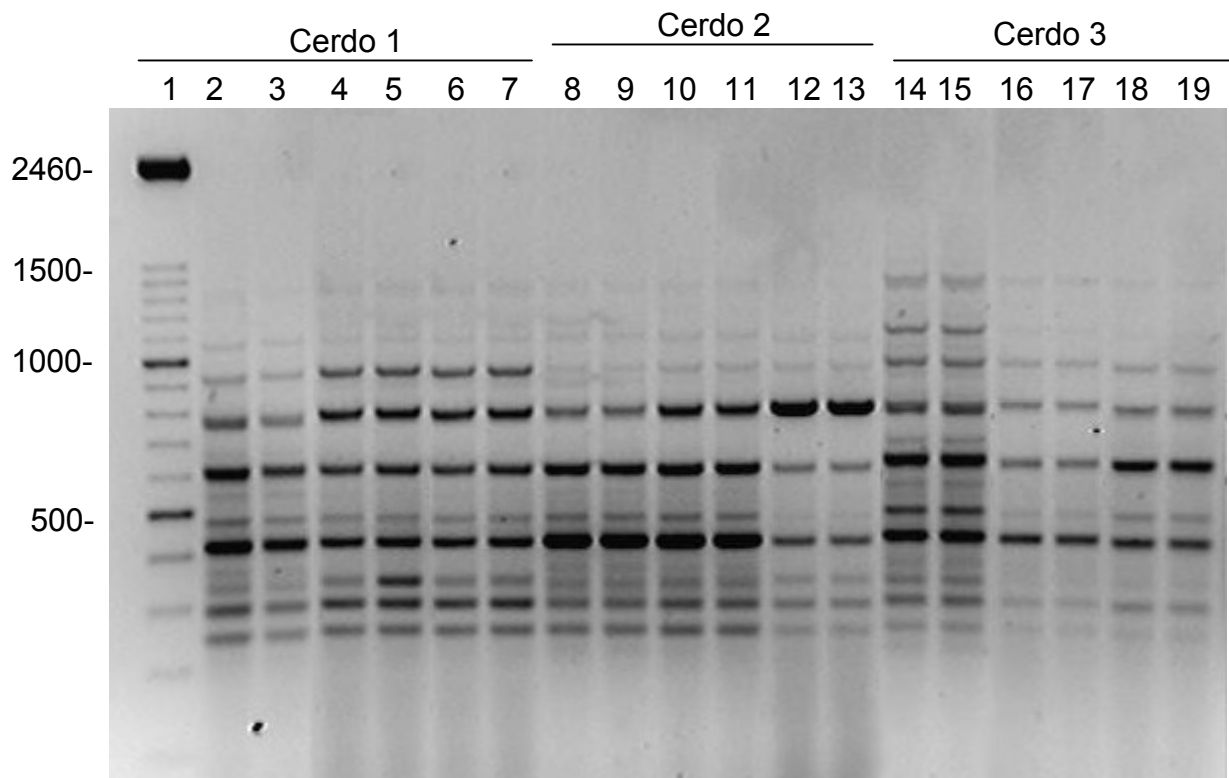


Figura 11. Perfiles de RAPD con el iniciador OPB 18 para DNA de músculo de 3 cerdos no infectados (controles). Carril 1, pesos moleculares de 100 pb; carriles 2-3, 8-9, 14-15: 20 ng de DNA; carriles 4-5, 10-11, 16-17: 30 ng de DNA; carriles 6-7, 12-13, 18-19: 50 ng de DNA.

ANÁLISIS DE DATOS

El perfil de bandeo de las isoenzimas y de los 160 cisticercos estudiados por RAPD se analizó mediante el software LabWorks Analysis Software 3.0.02 (Corporate HQ:UVP Inc. Upland, CA), el cual reduce el fondo de los gels y discrimina la presencia de bandas. Para los perfiles de isoenzimas se registró la movilidad relativa (R_f) de cada alelo y sus correspondientes *loci*, de acuerdo a Johnston y Fernando (1997):

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la enzima desde el origen}}{\text{Distancia del origen al fin del gel}}$$

Para los perfiles de RAPD, a cada banda se le asignó un valor de 1 o 2, dependiendo de su presencia o ausencia en el gel. Para asegurar la reproducibilidad de los productos de amplificación, cada DNA que mostró bandas polimórficas fue repetido por lo menos una vez más.

Al ser los RAPD marcadores dominantes, la heterocigosis esperada se calcula a partir de las frecuencias genotípicas de p y q , pero no se puede obtener la heterocigosis observada. Para los cálculos de las frecuencias alélicas p y q se consideraron dos aproximaciones:

Aproximación 1: Se consideró un análisis para organismos diploides suponiendo que la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg; entonces, el alelo recesivo $q = x^{1/2}$, donde x es la frecuencia de bandas ausentes en la población, mientras que el cálculo de la frecuencia de p se obtuvo por la relación $p + q = 1$ (Hartl y Clark, 1989). Aproximación 2: Se ha observado que bajo un sistema exclusivo de autofecundación al cabo de 10 generaciones la heterocigosis de la población es cercana a cero (figura 12) (Eguiarte y Piñero, 1999). Por lo que, en esta aproximación se consideró una análisis para organismos haploides (como las poblaciones clonales y endógamas de bacterias y algunos parásitos) y las frecuencias alélicas se obtuvieron como $q = x$ y $p = z$, donde x y z son las frecuencias de bandas ausentes y presentes respectivamente en la población. Esta aproximación permite además aplicar un programa para evaluar la dependencia estadística de alelos en todos los *loci* presentes (desequilibrio de ligamiento).

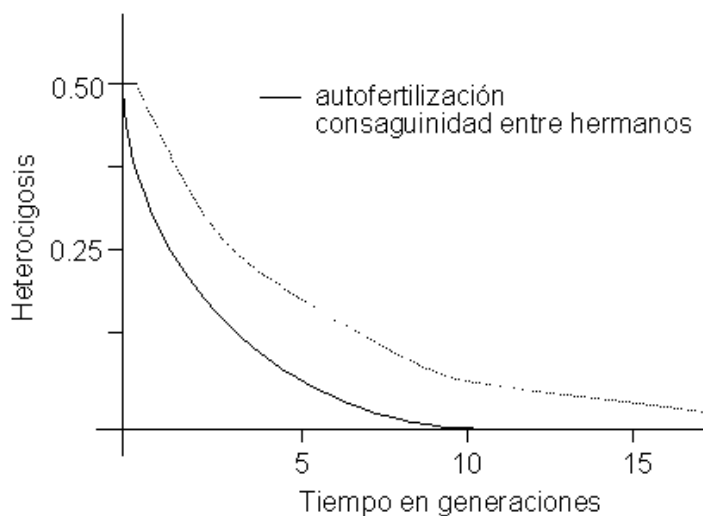


Figura 12. Disminución de la heterocigosis como función del tiempo para dos sistemas de cruce endogámica: entre hermanos y por autofecundación (Descrito por Roughgarden y recopilado por Eguiarte y Piñero en 1999).

La variación genética promedio dentro de cada aislado se calculó como $H = 1 - J_S$, donde $J_S = \sum x_i^2$, donde x_i es la frecuencia promedio del alelo p para todos los *loci* (Hartl y Clark, 1989). Además, se calculó la proporción de *loci* polimórficos (P), pues es un buen índice de la variación cuando se muestrean *loci* al azar (Nevo, 1978 en Eguiarte, 1990) y a partir del cálculo de las distancias de Nei (1972) se construyó un dendograma de UPGMA (del inglés *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), cuyo fundamento se basa en que los organismos más parecidos deben ser los más emparentados. Este método consiste en construir una matriz con las estimaciones de distancias genéticas (en nuestro caso las distancias de Nei) entre pares de patrones de bandeo. Se identifica primero el par de patrones de bandeo con la menor distancia genética y se colocan en un dendograma a una distancia de $\frac{1}{2}$ de la distancia original, de tal forma que la suma de las dos ramas que unen a los dos patrones de bandeo sea igual a la distancia genética en la matriz. Debido a que es un método aglomerativo que asume tasas de cambio constantes, en ocasiones pueden ocurrir sesgos al existir heterogeneidad en la tasa de cambio evolutivo entre los linajes (Eguiarte *et al.*, 1997). Se calculó también el coeficiente de coancestría Θ de Weir y Cockerham (1984) para cada *locus* y por medio de un muestreo llamado de *Jackknife* (que es un algoritmo de relocalización aleatoria sin reemplazo) se obtuvo un intervalo de confianza asimétrico de Θ y considerando el “modelo de islas de Wright” con la corrección de Crow y Aoki (1984):

$$\Theta = 1/[4(n/n-1)^2Nm+1],$$

Donde n es el número de subpoblaciones y el producto Nm es el índice de flujo génico (Hartl y Clark, 1989; Navarro, 1999). Todos estos cálculos se realizaron mediante el programa de computadora TFGA (*Tools For Population Genetics Analysis*; Miller, 1997).

Por otro lado, para determinar si existía una distribución alélica no aleatoria entre los aislados estudiados (desequilibrio de ligamiento), se empleó un índice multilocus, que se desarrolló con base en los estudios realizados por Brown *et al.* (1980) en poblaciones endógamas y silvestres de cebada *Hordeum spontaneum*, y que se basa en un algoritmo que analiza la diferencia entre alelos o *mismatches*. De este procedimiento se obtiene un cociente entre la varianza de todos los *mismatches* entre pares de individuos observados en una población (V_O) y la varianza esperada en la población correspondiente, es decir, la asociación aleatoria de alelos debida a *mixis* o segregación azarosa de alelos en ausencia de alguna fuerza evolutiva (V_E). Este cociente proporciona una medida del desequilibrio de ligamiento, por lo que cuando $V_O/V_E=1$ indica que hay una recombinación libre de alelos y no hay desequilibrio de ligamiento. Cuando V_O/V_E es significativamente mayor a 1, los alelos están asociados en un sentido no aleatorio y por lo tanto no hay recombinación alélica en la población, lo que sugiere una estructura clonal y una probable selección hacia cierta combinación de alelos (Souza *et al.*, 1992; Silva *et al.*, 1999). Debido al carácter dominante de los RAPD, en el que la presencia de una banda no permite identificar entre el homocigoto y el heterocigoto, para fines prácticos se empleó la aproximación 2 para desarrollar el análisis del desequilibrio de ligamiento. Para evaluar la probabilidad de rechazar la hipótesis nula que plantea la recombinación alélica en este índice multilocus, se desarrolló la distribución de V_O/V_E utilizando un algoritmo de Monte Carlo con 10,000 iteraciones. Las simulaciones de Monte Carlo consisten en generar, a partir de los alelos de la muestra 10,000 nuevos arreglos alélicos con los mismos datos reordenados al azar y sin reemplazo, este procedimiento elimina los efectos del desequilibrio de ligamiento y simula un estado recombinante. La fracción de las varianzas iniciales (obtenidas a partir de la matriz de datos originales) se comparó luego con el rango V_O/V_E obtenido a partir de las 10,000 simulaciones de Monte Carlo (LDV program, Souza *et al.*, 1992).

RESULTADOS

ELECTROFORESIS DE ISOENZIMAS

De las 20 enzimas examinadas solamente ARK, G3PD, G6PD, GPI, GOT, MDH, ME y MPI mostraron patrones de corrimiento electroforético con buena resolución y definición en las bandas (*loci*) isoenzimáticas. El resto de las enzimas mostraron un corrimiento difuso a pesar de que fueron ensayadas bajo diferentes condiciones de voltaje, tiempo y soluciones amortiguadas de corrimiento. Por esta razón se consideró para el análisis de los parásitos, las 8 enzimas que mostraron la mejor resolución y definición y se registraron sus movilidades relativas (cuadro 6).

Cuadro 6. Movilidad relativa promedio de los alelos en los *loci* enzimáticos del adulto y el cisticercos de *T. solium*.

Locus(-subunidad)	Cisticercos		Adulto	Alelos/ <i>loci</i>
	Mexicanos	Colombianos		
ARK	0.20	0.20	0.20	1
G3PD	0.29	0.29	0.29	1
G6PD	0.29	0.29	0.29	1
GPI-1	0.28	0.29	0.28	2
GPI-2	A	A	0.31	
GPI-3	A	A	0.34	
GOT	0.25	0.25	0.25	1
MDH-1	0.21	0.25	0.21	2
MDH-2	0.31	0.35	0.31	
ME-1	A	A	0.16	1
ME-2	A	A	0.44	
MPI-1	0.31	0.31	0.31	1*
MPI-2	0.73	0.73	0.73	
MPI-3	0.83	0.83	A	

^A Ausente. * Para *T. taeniaeformis* fue 0.5

Arginina cinasa

El perfil isoenzimático para ARK, exhibió un solo *locus* idéntico en todos los parásitos analizados, con una banda de actividad con un Rf de 0.20, lo que sugiere que tiene un perfil homocigótico “a,a” y que se trata de una enzima con actividad independiente del

estadio parasitario (adulto o metacéstodo), la región geográfica y la especie de *Taenia*. El extracto soluble de carne de cerdo mostró un perfil trimérico diferente (figura 13a carril 1).

Glucosa 3-fosfato deshidrogenasa y glucosa 6 fosfato deshidrogenasa

La G3PD y la G6PD presentaron un solo *locus* con una banda cuya movilidad relativa fue la misma (0.29). Para ambas enzimas se observó un perfil homocigótico “a,a” para los cisticercos y tenia de México y Colombia. El perfil isoenzimático de la carne de cerdo en esta enzima también mostró un *locus* con un alelo diferente al de los parásitos (figuras 13b y 13c carril 1).

Transaminasa glutámico-oxalacética

El electromorfo de la GOT reveló un *locus* correspondiente a los alelos “a,a” para los cisticercos mexicanos y colombianos con un Rf de 0.25. Las tenias adultas también mostraron un *locus* con una banda definida y con un perfil homocigoto “a,a” (figura 13d). El perfil del control mostró una banda de actividad enzimática única.

Glucosa-6-fosfato isomerasa

Todos los parásitos mostraron actividad en esta enzima trimérica (GPI). Se observó en un *locus* 2 alelos con una banda para los cisticercos mexicanos y colombianos, siendo el perfil para los cisticercos mexicanos, “a,a” (Rf = 0.28) y para los colombianos “b,b” (Rf = 0.29), ya que migraron ligeramente más rápido que los mexicanos. El patrón isoenzimático del cerdo mostró una sola banda con un alelo diferente (figura 13e carril 1). Por otra parte, el perfil isoenzimático de los adultos estudiados mostró el patrón trimérico característico reportado previamente para *T. solium* y otros ténidos por Le Riche y Sewell (1977), Okamoto *et al.* (1995) y Turčeková *et al.* (2003). Cada especie de *Taenia* mostró su propio electromorfo (figura 13f).

Malato deshidrogenasa

Las movilidades electroforéticas de la MDH en los cisticercos mexicanos mostraron 2 bandas que corresponderían a los alelos “a,a” mientras que en los colombianos se observaron los alelos “b,b” los cuales migraron más rápido que los “a,a”. Ninguno de los metacéstodos estudiados mostró un perfil heterocigoto. El extracto del parásito adulto mostró un corrimiento homocigoto y dimérico similar al de los cisticercos mexicanos. (figura 13g). Asimismo, el perfil isoenzimático de la carne de cerdo fue diferente al de los parásitos.

Enzima málica

Esta enzima solo mostró actividad para el estadio adulto de *Taenia*, ya que en nuestro sistema ninguno de los cisticercos estudiados reveló alguna banda. El adulto de *T. solium* mostró 2 *loci* con una banda cada uno, mientras que el de *T. saginata* y el de *T. taeniaeformis* presentaron solo un *locus* con un alelo propio que se observó como bandas únicas con diferente movilidad (figura 13h).

Manosa-6 fosfato isomerasa

En los perfiles isoenzimáticos de la MPI se observó un *locus* con 3 bandas y un solo alelo “a,a” para los cisticercos mexicanos y el colombiano, mientras que para el adulto de *T. solium* se observaron alelos diferentes, la primera y segunda banda (MPI-1, MPI-2), mostraron una movilidad relativa de 0.31 y 0.73 y MPI-3 solo estuvo presente en los cisticercos. El adulto de *T. saginata* mostró un *locus* con un alelo propio de dos bandas, mientras que el adulto de *T. taeniaeformis* mostró dos *locus* con un alelo homocigoto que se observó como un electromorfo de 8 bandas (4 bandas por *locus*) (figura 13i).

Debido a que no se observó ningún perfil heterocigoto, esto sugiere que no hay variación a nivel de isoenzimas, resumiéndose en el cuadro 6 la proporción alelo/*loci*. Asimismo, la Heterocigosis observada $H_{OBS} = 0$ y la proporción de loci polimórficos $P = 0$.

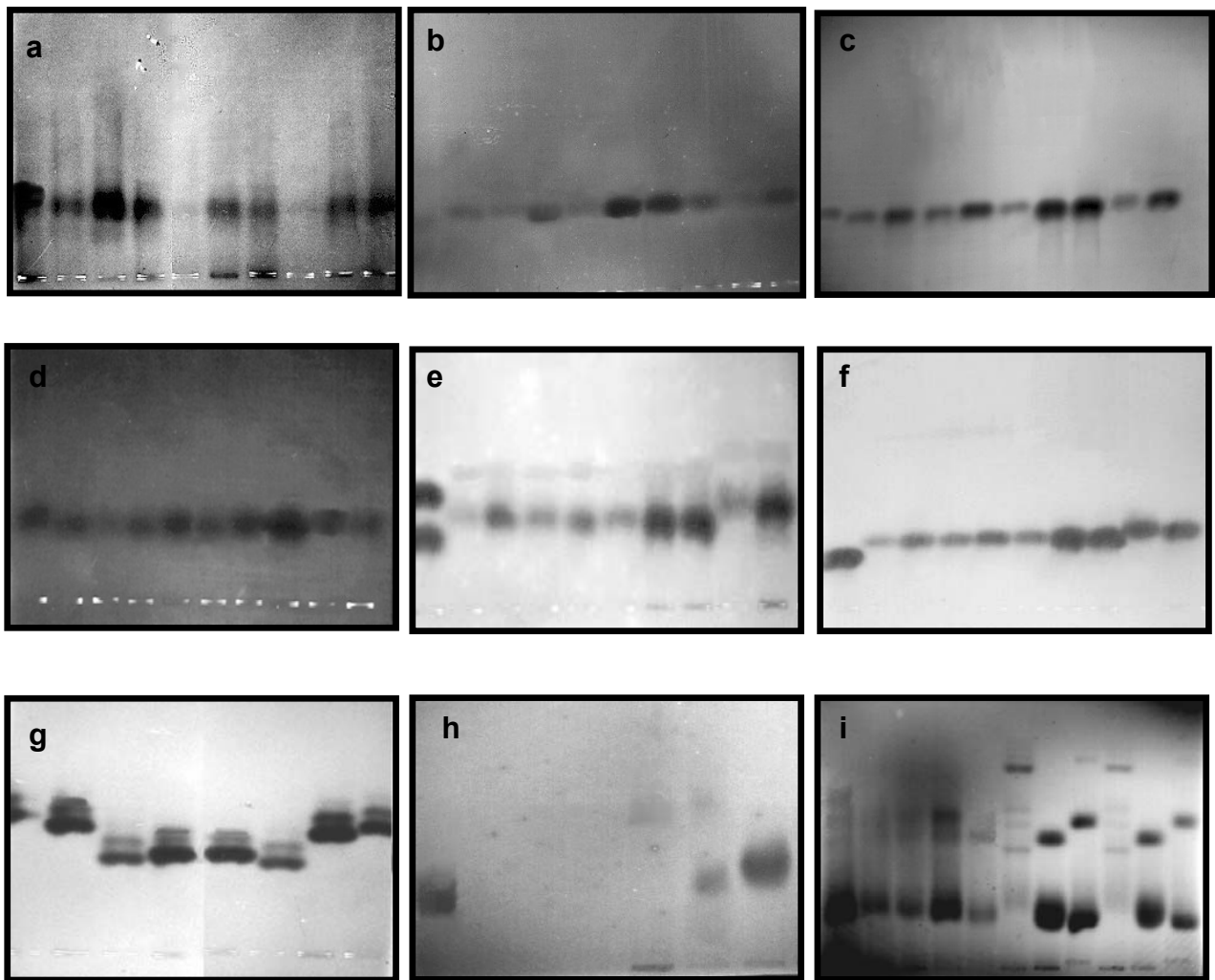


Figura 13. Perfiles isoenzimáticos en acetato de celulosa para cisticercos mexicanos y colombianos, así como varias especies de *Taenia*; En a) ARK, b) G3PD, c) G6PD, d) GOT, e) MDH, f) GPI, carriles 1 extracto soluble de carne de cerdo (control), carriles 2-8 cisticercos mexicanos, carriles 9-10 cisticercos colombianos; g) GPI para tenias adultas, carriles 1 y 8 *T. taeniaeformis*, carriles 2 y 7 *T. crassiceps*, carriles 3 y 6 *T. solium*, carriles 4 y 5 *T. saginata*; h) carril 1 control, carriles 2-5 cisticercos mexicanos, carril 6 adulto *T. taeniaeformis*, carril 7 adulto *T. solium*, carril 8 adulto *T. saginata*; i) MPI carril 1 control, carriles 2-5 cisticercos mexicanos, carriles 6 y 9 adulto *T. taeniaeformis*, carriles 7 y 10 adulto *T. solium*, carriles 8 y 11 adulto *T. saginata*

RAPD

El análisis de los seis aislados mostró 49 *loci* de los cuales 88% resultaron polimórficos (figura 14; cuadro 7). El iniciador OPB 3 reveló 3 *loci* no-polimórficos y 13 polimórficos, así como 3 *loci* como alelos dominantes fijos y exclusivos para los aislados “a” y “c” (figura 15A).

Cuadro 7. Frecuencias alélicas y *loci* obtenidos por RAPD para 6 aislados de *T. solium*

Iniciador	Locus No.	Tamaño (pb)	Frecuencia alélica					
			Aislado a Guerrero	Aislado b Morelos	Aislado c Morelos	Aislado d Mérida	Aislado e Honduras	Aislado f Tanzania
OPB 3	1	1480	0.000	1.000	0.000	1.000	1.000	0.000
	2	1425	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000
	3	1400	0.483	0.000	1.000	0.000	0.000	0.684
	4	1200	0.000	0.000	0.087	0.000	0.016	0.051
	5	1183	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	6	1117	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000
	7	1022	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	8	850	0.000	0.000	0.000	0.105	0.087	0.051
	9	825	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	10	688	1.000	1.000	1.000	0.316	0.452	0.684
	11	650	1.000	1.000	0.000	0.204	0.422	0.051
	12	570	0.683	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	13	525	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	14	471	0.552	0.000	0.483	0.000	0.000	0.452
	15	400	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	16	350	0.552	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
OPB11	17	1500	0.517	0.000	0.591	0.000	0.000	0.000
	18	1230	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000
	19	1040	1.000	1.000	1.000	0.817	1.000	1.000
	20	900	0.000	0.000	0.000	0.000	0.051	0.000
	21	845	1.000	0.000	1.000	0.225	0.591	0.000
	22	770	0.000	0.000	0.143	0.591	1.000	0.000
	23	693	0.143	0.000	1.000	1.000	1.000	0.000
	24	636	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	1.000
	25	545	1.000	0.000	0.163	0.000	0.000	0.000
	26	520	0.367	0.000	0.517	0.000	0.000	0.293
	27	482	1.000	0.741	1.000	0.817	0.817	0.684
	28	417	1.000	0.000	1.000	0.016	0.000	1.000
	29	375	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000
	30	182	1.000	0.741	1.000	0.000	0.000	1.000
	31	161	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000
	OPB 14	32	1500	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000
33		1300	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.684
34		900	1.000	0.634	1.000	1.000	1.000	0.684
35		645	1.000	1.000	1.000	0.741	1.000	1.000
36		530	0.517	0.204	0.341	0.016	0.051	0.684
37		500	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.293
38		445	0.000	0.552	0.000	0.000	0.000	0.225
OPB 18		39	1500	0.000	0.000	0.000	0.000	0.483
	40	1250	0.422	0.422	0.394	0.517	0.817	1.000
	41	1100	0.000	0.000	0.000	0.000	0.069	0.000
	42	915	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	43	783	0.394	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	44	695	0.483	0.000	0.163	0.000	0.000	1.000
	45	525	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.293
	46	477	1.000	1.000	1.000	0.817	1.000	1.000
	47	393	1.000	1.000	1.000	0.817	1.000	0.051
	48	352	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	49	215	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	1.000

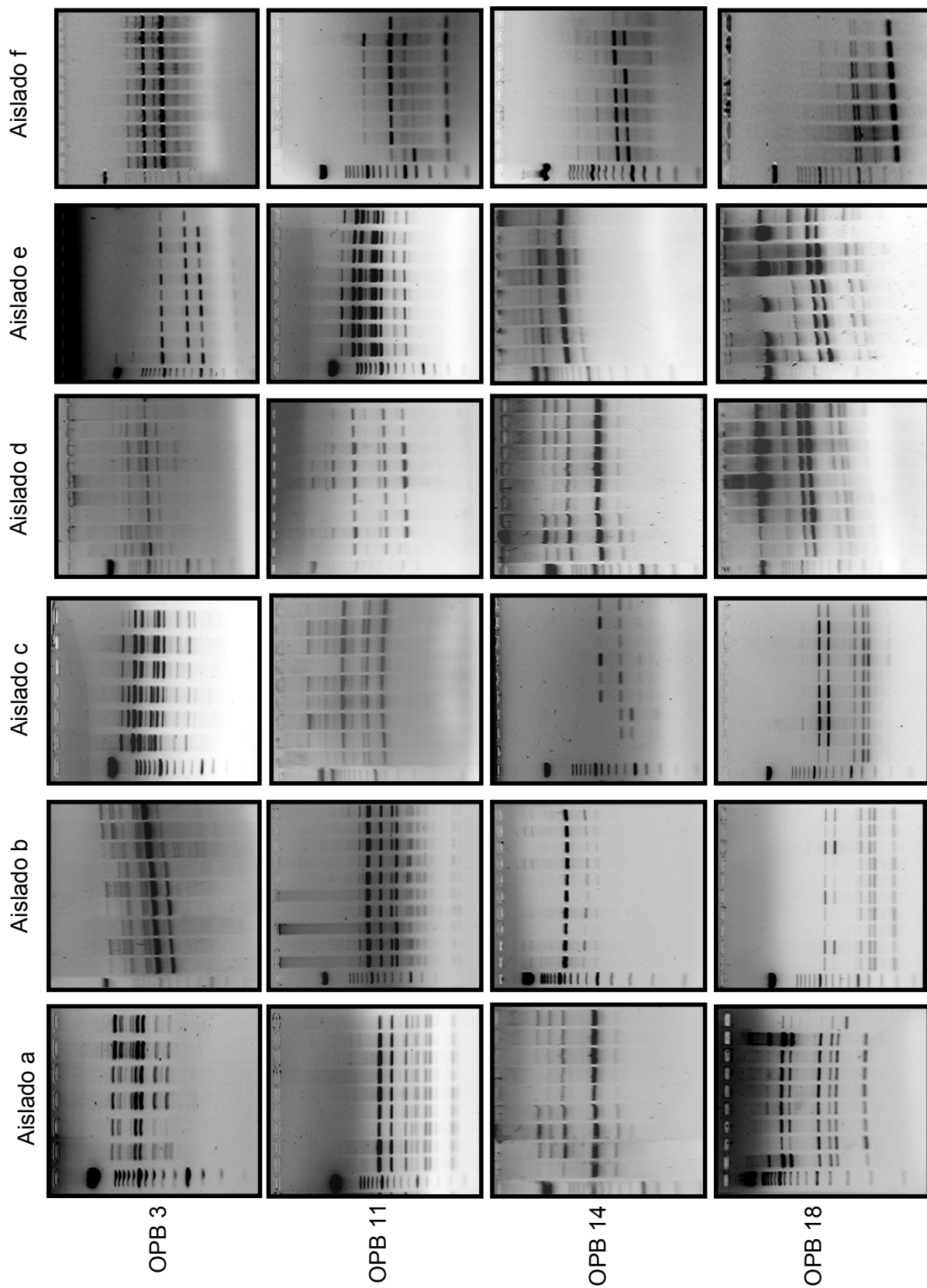


Figura 14. Algunos perfiles de RAPD para los seis aislados de *T. solium* estudiados

OPB 11 presentó un *locus* no-polimórfico y 14 polimórficos con dos *loci* como alelos dominantes fijos y exclusivos para el aislado “c” (figura 15B). OPB 14 mostró 7 *loci* polimórficos con distintos alelos dominantes fijos para todos los aislados (figura 15C). Finalmente, OPB 18 exhibió dos *loci* no-polimórficos y 9 polimórficos (figura 15D). Las heterocigosis promedio de los seis aislados fueron: la heterocigosis esperada en poblaciones diploides en equilibrio de Hardy-Weinberg $H = 0.077$; la heterocigosis esperada en poblaciones haploides $H_c = 0.067$. Los valores de heterocigosis, *loci* polimórficos e índice multilocus V_O/V_E para cada aislado se presentan en el cuadro 8.

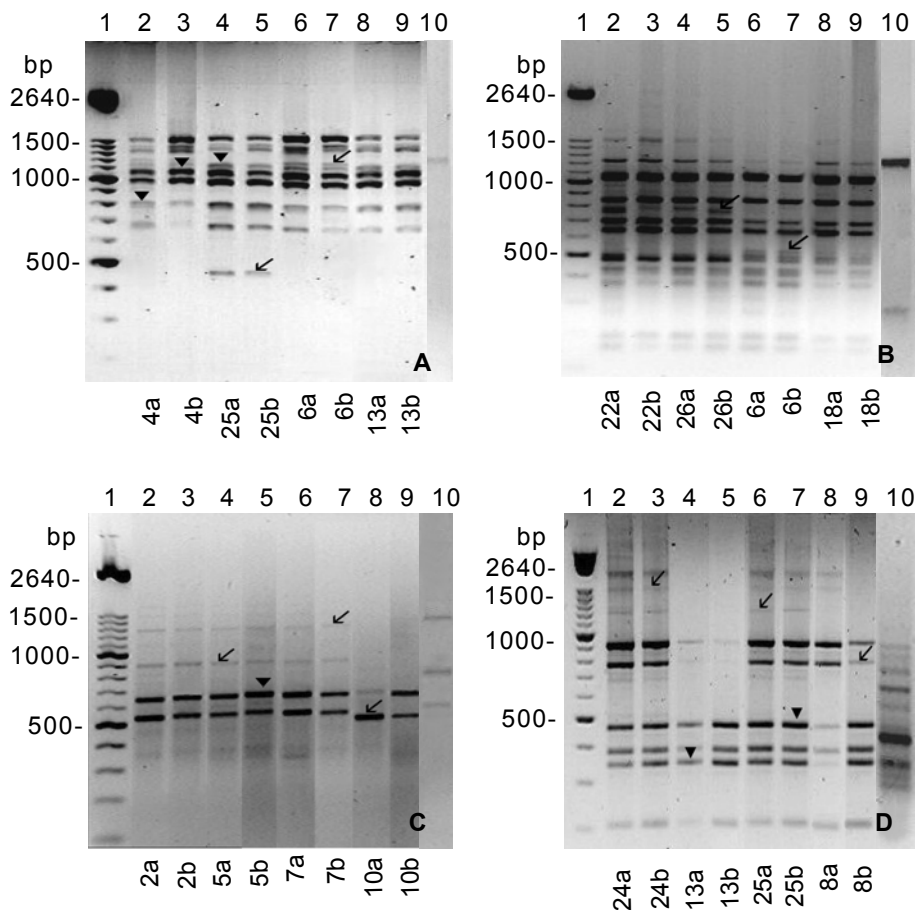


Figura 15. Perfiles de RAPD de cisticercos individuales por duplicado, el número en la base de los geles corresponde a la identificación del cisticercos y las letras a y b a los duplicados. A) OPB 3, aislado c; B) OPB 11, aislado c; C) OPB 14, aislado f; D) OPB 18, aislado e. En la figura se señalan las bandas constantes para los seis aislados (▼) y las polimórficas (↘); los carriles 1 muestran los pesos moleculares en pares de bases (bp), los carriles 10 corresponden al perfil del DNA de cerdo.

Cuadro 8. Índices de variabilidad genética para los 6 aislados de *Taenia solium*

Aislado	H	Hc	P	V _O /V _E ‡
a (Guerrero)	0.107	0.033	0.245	1.375§
b (Morelos)	0.052	0.073	0.122	1.475
c (Morelos)	0.068	0.063	0.184	1.119
d (Yucatán)	0.070	0.080	0.204	1.301§
E (Honduras)	0.063	0.060	0.204	1.112§
f (Tanzania)	0.103	0.087	0.305	1.195

H: heterocigosis esperada en poblaciones diploides en equilibrio de Hardy-Weinberg; Hc: heterocigosis esperada en poblaciones haploides; P: proporción de *loci* polimórficos; ‡ Cociente de la varianza observada/ varianza esperada para el análisis de desequilibrio de ligamiento; § diferencia estadística significativa de $V_O \gg V_E$, por lo que hay desequilibrio de ligamiento.

La distribución de V_O/V_E por el algoritmo Monte Carlo para los aislados “a” “d”, y “e”, presentó un valor de $p < 0.001$, sugiriendo una estructura clonal, mientras que para los aislados “b” “c” y “f” no se encontró una diferencia estadísticamente significativa, sugiriendo que estas poblaciones no presentan desequilibrio de ligamiento, por lo que los individuos de estas poblaciones tienen eventos genéticos de recombinación con mixis. El índice Θ promedio de los 49 *loci* fue de 0.718, con un intervalo de confianza de 0.630 a 0.796 con una confiabilidad del 95%. El valor de Nm fue calculado para los seis aislados con la fórmula de Crow y Aoki (1984), así: $Nm = (\Theta^{-1} - 1) / 4\alpha$, donde $\alpha = [n/(n-1)]^2$ y n significa el número de subpoblaciones. Sustituyendo los valores en la fórmula, $Nm = 0.068$.

Por otra parte, la relación genética de los 160 cisticercos analizados se muestra en un dendograma de UPGMA (figura 16). Como se podrá ver se formaron 5 clados, los cuales a su vez se subdividieron hasta llegar a cada cisticerco, en todos los aislados se observaron parásitos (de 2 hasta 13 cisticercos) con la misma identidad genética.

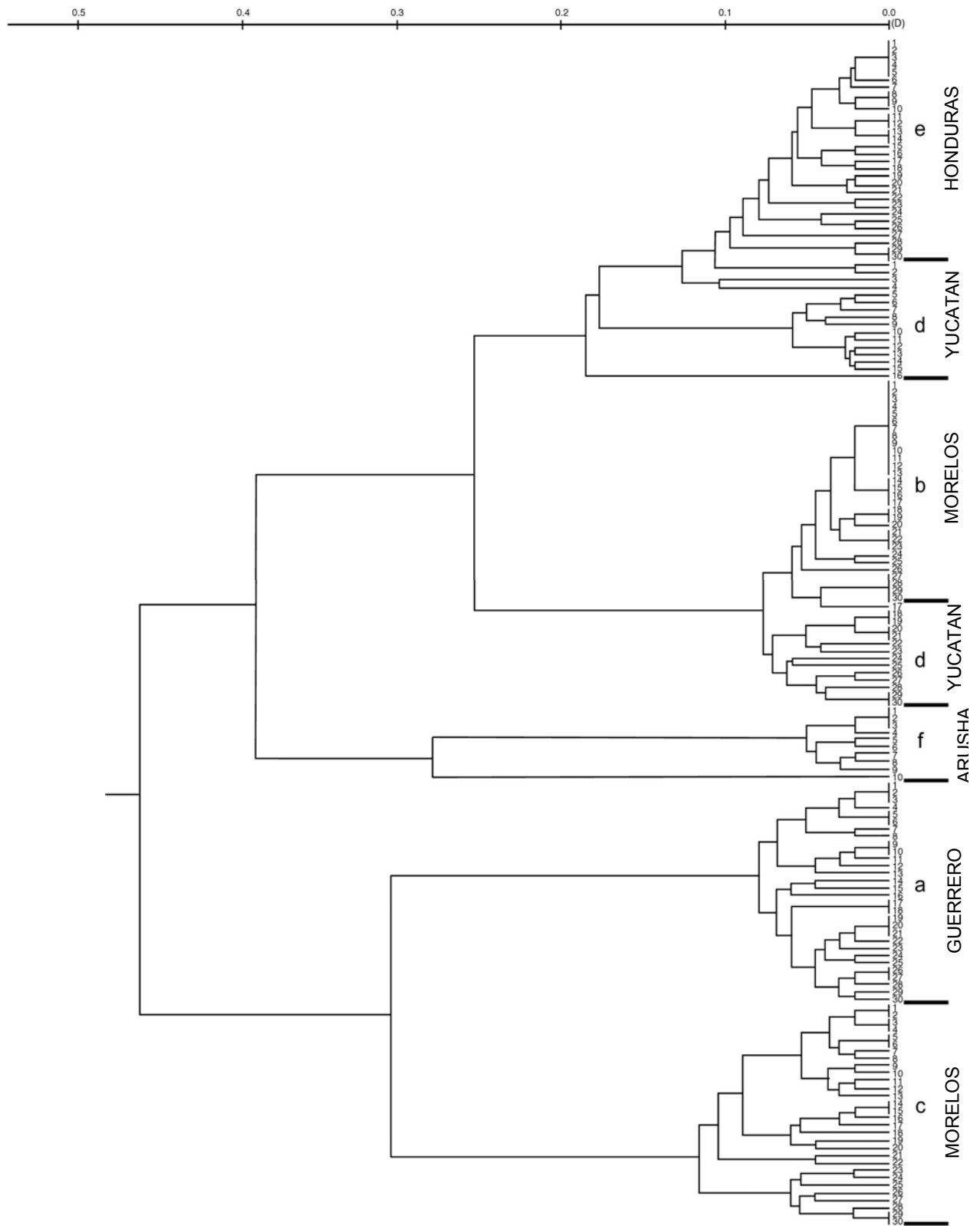


Figura 16. Árbol de UPGMA para los 160 cisticercos estudiados de seis aislados de *T. solium*: Morelos (a y b), Guerrero (c), Yucatán (d), Honduras (e) y Tanzania (f). (D) distancia genética de Nei.

DISCUSIÓN

El interés creciente por conocer aspectos ecológicos y poblacionales de los céstodos que afectan al ser humano, en conjunto con el avance en bioquímica y biología molecular, han aportado conocimientos importantes sobre su origen, distribución y transmisión. Thompson y Lymbery (1995) han sustentado que el conocimiento de la estructura genética y poblacional de los céstodos tiene una implicación directa en la epidemiología y en el control de las enfermedades provocadas por estos parásitos, porque es la diversidad genética dentro y entre las poblaciones de parásitos la que determinará los cambios genéticos futuros y los procesos de diferenciación, adaptación y especiación.

Al realizar observaciones en el microscopio óptico de cisticercos de *T. solium* recuperados de un mismo cerdo, se llegan a detectar diferencias morfológicas en el tamaño y número de ganchos (figuras 16 y 17) y presencia de pigmento en el rostelo (figura 18). Estos rasgos sugieren plasticidad fenotípica (variación del fenotipo por influencia del ambiente). Aunque inicialmente este tipo de variación motivó la presente tesis, el estudio de caracteres cuantitativos tiene bases no sólo genéticas, por lo que su estudio no fue considerado para la conclusión del presente estudio.

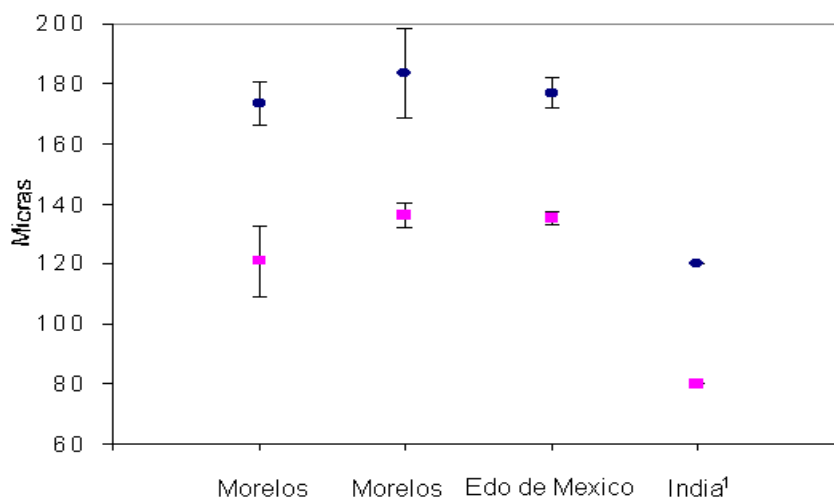


Figura 16. Longitud de los ganchos largos (●) y cortos (■) de 10 cisticercos evaginados de *T. solium* recuperados de cerdos de Morelos, Estado de México (datos no publicados) y la India (Varma y Ahluwalia, 1992) ¹Solo reportan el promedio sin datos de desviación estándar.

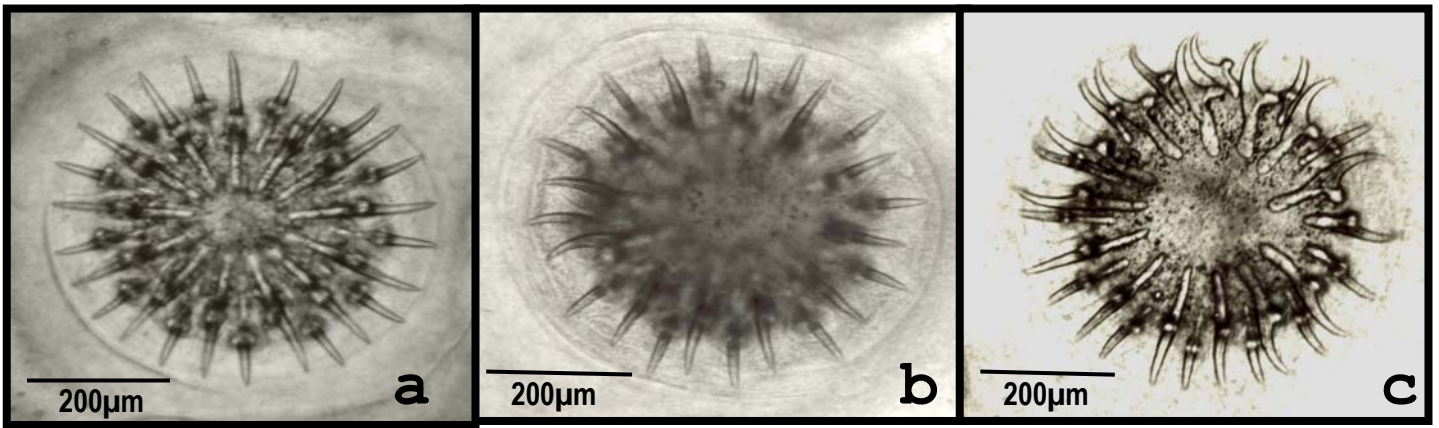


Figura 17. Ganchos largos y cortos del rostellum de cisticercos evaginados recuperados de un mismo cerdo de Guerrero. En "a" se observan 26 ganchos, en "b" 24 ganchos y en "c" 27 ganchos. Datos no publicados.

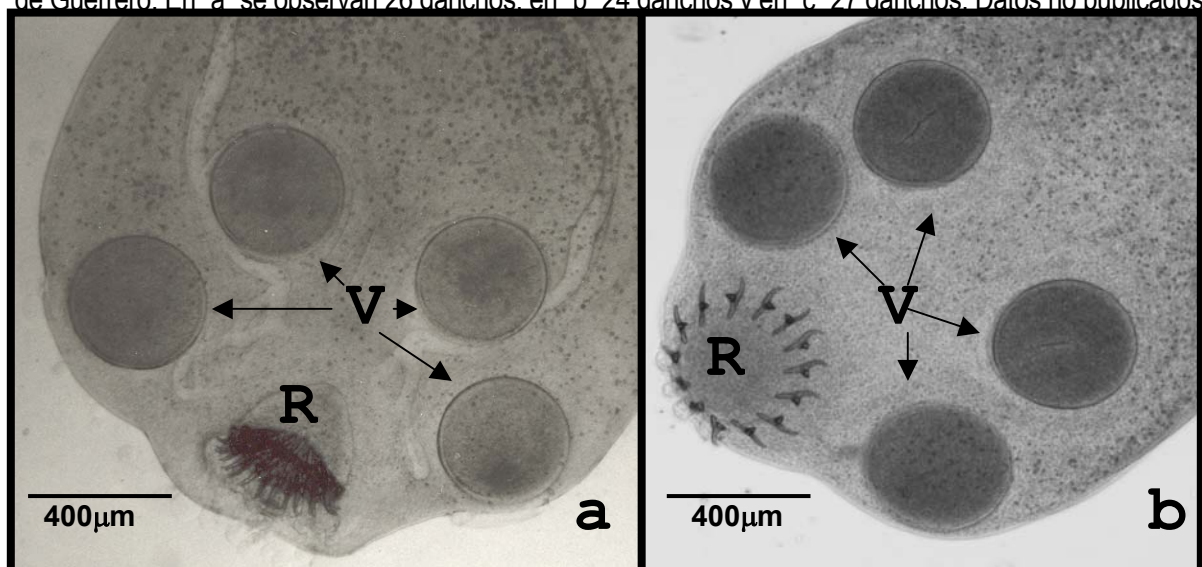


Figura 18. Escólices de cisticercos evaginados de *T. solium* de Guerrero y Puebla ("a" y "b" respectivamente), en los que se identifican el rostellum con ganchos (R) y 4 ventosas (V). En "a" se observa además un rostellum pigmentado. Datos no publicados.

Se emplearon las técnicas de electroforesis de isoenzimas y RAPD para evaluar la variabilidad genotípica en aislados de *T. solium*, ya que con la primera técnica se puede analizar la variación genética, pero solo la que cambia la movilidad de las proteínas. Los cambios silenciosos o de aminoácidos que no modifican la movilidad no se detectan. De esta forma, se evita caer en sesgos implícitos de los análisis morfológicos y morfométricos, debidos al procesamiento de las muestras, desarrollo del parásito y plasticidad fenotípica del mismo. Por otro lado, las técnicas moleculares que analizan el

DNA y especialmente las que emplean marcadores neutros como los RAPD, deben producir mayores niveles de diferenciación genética, además esta técnica tiene la ventaja de analizar un gran número de *loci* a través del genoma entero. Nei (1987) recomienda que para estimar óptimamente las distancias genéticas se debe utilizar un gran número de *loci*. Por lo tanto, la técnica de RAPD es una herramienta útil para la caracterización de relaciones intra e inter-específicas, así como para identificar cepas y especies en numerosos organismos, incluidos los céstodos y los tremátodos (Siles-Lucas *et al.*, 1993; Verneau *et al.*, 1995; Král'ová y Špakulová, 1996; Brouwer *et al.*, 2001; Eom *et al.*, 2002; Vega *et al.*, 2003).

Existen pocos estudios que describen la diversidad de *T. solium* (McManus *et al.*, 1989; Bowles y McManus 1994; Hancock *et al.*, 2001; Nakao *et al.*, 2002; Vega *et al.*, 2003), no obstante que diversos análisis genotípicos y de isoenzimas se han empleado para establecer diferencias entre especies, cepas, clonas y aislados en otros céstodos (Lymbery y Thompson 1988; Okamoto *et al.*, 1995; Siles-Lucas *et al.*, 1996; Eom *et al.*, 2002; Turčeková *et al.*, 2003). El empleo simultáneo de electroforesis de isoenzimas y RAPD para la identificación de cepas en poblaciones de *Echinococcus* mostró resultados similares, aunque no se cuantificó la variabilidad intra-especie detectada con ambas técnicas (Siles-Lucas *et al.*, 1996; Turčeková *et al.*, 2003). Para otros organismos los RAPD han mostrado ser un mejor marcador de variabilidad (heterocigosis) que las isoenzimas entre individuos de diferentes regiones geográficas, ya que las técnicas moleculares que analizan regiones neutras del DNA producen mayores niveles de diferenciación genética. (Peakall *et al.*, 1995).

Un índice de variabilidad empleado en isoenzimas son las proporciones alelos/*loci* las cuales se obtienen visualmente a partir del número de alelos exhibidos en cada enzima y con los que se puede calcular el número de electromorfos posibles

multiplicando sucesivamente el número de alelos de cada *loci*; entonces, al multiplicar las proporciones alelo/*loci* del cuadro 6 se tiene que: $1 \times 1 \times 1 \times 2 \times 1 \times 2 \times 1 \times 1 = 4$, lo que indica que si todos los alelos de la población se asociaran de manera aleatoria entonces solo se podrían encontrar 4 combinaciones alélicas distintas, lo que comparativamente con otros organismos, como las plantas o las bacterias, es muy bajo ya que en estas pueden obtenerse hasta millones de combinaciones alélicas distintas (Bouchet, 1997), por lo que nuestros datos sugieren que existe una homogeneidad genética en *T. solium*. Además, la ausencia de cisticercos heterocigotos refuerza la existencia de un linaje único a nivel de isoenzimas, en el centro de México. Como solo se muestro un cerdo proveniente de Colombia no se puede extrapolar esta propuesta. Sin embargo, es probable que la ausencia de variabilidad se deba a que esta técnica pudiera no ser lo suficientemente sensible para detectar diferencias dentro de este único linaje. Llama la atención que los electromorfos de las enzimas GPI y MDH permitan diferenciar cepas de *Echinococcus* (Turčeková *et al.*, 2003) y, en nuestro caso, a cisticercos mexicanos de colombianos. La GPI y MDH son enzimas conservadas que siempre están activas con funciones de mantenimiento o constitutivas, que integran las rutas bioquímicas de obtención de energía por excelencia (la glucólisis y el ciclo de Krebs) y que en algunos céstodos sufrieron sustituciones nucleotídicas que son evidentes por su movilidad electroforética diferente. Por otra parte, la detección de electromorfos estadio específicos muestran que para mantenerse en diferentes ambientes *T. solium* debe contar con rutas alternas de obtención de energía. Los cisticercos que se localizan en el músculo esquelético del cerdo reciben un aporte rico en oxígeno, estimulando la actividad de ciertas enzimas como la MDH. Sin embargo, en el parásito adulto que se localiza en el intestino, donde la concentración de oxígeno es baja, la actividad de la ME se ve estimulada. Un fenómeno parecido podría ocurrir para la MPI, que es una enzima

que interviene en las glicosilaciones que se llevan a cabo en el aparato de Golgi (Smyth y McManus, 1989), ya que las glicosilaciones que se presentan para que pueda sobrevivir el metacéstodo pueden ser diferentes y mucho más rápidas para el estadio adulto.

Dentro de los parámetros poblacionales propuestos para estimar la diferenciación entre las poblaciones están los índices G_{ST} y el coeficiente de coancestría Θ , este último se define como la relación que existe entre un par de genes entre individuos dentro de una o más poblaciones (Weir, 1996). La coancestría se incrementa con el tiempo e indica que tan diferenciadas están las poblaciones. Asimismo Θ da una idea de la divergencia entre dos poblaciones y es un buen estimador del flujo génico bajo el sistema de dos alelos por *locus* (como en los RAPD) y considera el número de individuos y de localidades o subpoblaciones (Slatkin 1999). Θ se relaciona con G_{ST} , y si se muestrea un número muy grande de subpoblaciones puede considerarse que $\Theta \sim G_{ST}$. Así, cuando Θ y $G_{ST} = 0$ se considera que las poblaciones están en equilibrio de Hardy-Weinberg, mientras que si Θ y $G_{ST} = 1$, todas las poblaciones son diferentes entre sí (Weir, 1996; Hedrick, 1999).

Cuando una población se ha subdividido, la deriva génica puede conducir a divergencias genéticas entre las subpoblaciones, mientras que el movimiento de individuos (migración) como un sistema de flujo génico, tiende a reducir las frecuencias alélicas y su ausencia promueve la formación de diferentes alelos entre las subpoblaciones (Hartl y Clark, 1989). Básicamente, se pueden considerar dos modelos principales que explican el proceso de flujo génico: el “modelo de islas” de Wright y el “modelo de piedras de paso” o *stepping-stones* (figura 19), ambos modelos consideran el producto Nm , donde N representa a un número de individuos que integran a un gran número de poblaciones locales (subpoblaciones) y m es una fracción de estos

individuos que en cada generación son remplazados al azar por otros del resto de las poblaciones. De esta manera sí $Nm > 4$ la población es tan grande que todas las subpoblaciones se comportan como una unidad panmíctica, pero si $Nm \ll 1$, la población estará diferenciada fuertemente. (Hartl y Clark, 1989; Slatkin, 1999).

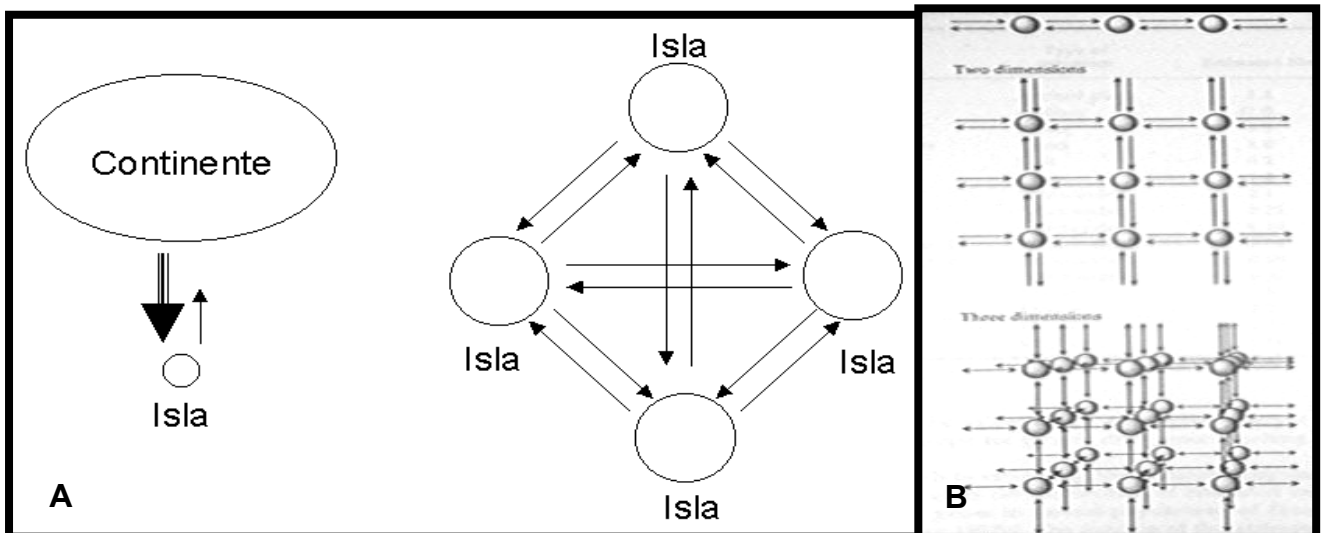


Figura 19. (A) Modelo del continente-isla: Los alelos que llegan a la isla desde el continente representan una fracción relativamente grande del conjunto de genes de la isla, mientras que los alelos que llegan al continente desde la isla representan una fracción relativamente pequeña del conjunto de genes continentales (Freeman y Herron, 2002); Modelo de Islas: La migración es la misma desde y hacia cada subpoblación (isla), independientemente de la distancia (figura tomada de Slatkin, 1999). (B) Modelo de piedras de paso (*stepping-stones*) uni-, bi-, y tridimensional: La migración se da exclusivamente entre subpoblaciones vecinas o adyacentes (figura tomada de Hartl y Clark, 1989)

Recientemente, se llevó a cabo el análisis por RAPD de 90 cisticercos (37 cisticercos provenientes de 13 cerdos infectados de manera natural en dos comunidades de Morelos y una de Puebla; 16 cisticercos de 6 cerdos de Yucatán y 39 cisticercos de 2 cerdos de dos comunidades de Madagascar), correspondientes a 21 aislados, con 9 iniciadores, entre los cuales 2 tuvieron secuencias homólogas a los iniciadores OPB 1 y OPB 11 (Vega *et al.*, 2003). Estos autores encontraron 113 *loci* con 16 patrones de bandeo diferentes, de los cuales se obtuvieron los índices poblacionales de heterocigosis esperada total (H_T), proporción de *loci* polimórficos (P), índice de

diferenciación genética (G_{ST}) y flujo génico (Nm) (cuadro 8) y un dendograma de UPGMA en el cual los cisticercos se agruparon en 3 *clusters* separados que correspondieron a la región geográfica de la cual provenían los aislados (centro de México, sureste de México y Madagascar) sin que se agruparan cisticercos de una región con otra. Sin embargo, solamente en los aislados del centro de México, se detectaron cisticercos con patrones de bandeo diferentes dentro de cada cerdo infectado. Con base en sus resultados de genética poblacional, Vega *et al.* (2003) sugieren que la divergencia entre las poblaciones de cisticercos de México y Madagascar podría explicar las diferencias entre las manifestaciones clínicas que se presentan en la neurocisticercosis en ambos países.

Cuadro 8. Parámetros de estructura poblacional para aislados de *T. solium* reportados por Vega *et al.* (2003).

	H_T	P	G_{ST}	Nm
Entre países (México-Madagascar)	0.163	0.433	0.758	0.160
Entre aislados de distintas regiones geográficas	0.046-0.160	0.133-0.407	0.794-0.868	0.076-0.129
Entre aislados de las distintas comunidades mexicanas pareadas	0.008-0.046	0.026-0.124	0.094-0.874	0.072-4.798

H_T : Heterocigosis esperada total; P: Proporción de *loci* polimórficos; G_{ST} : Índice de diferenciación genética entre poblaciones; Nm : Parámetro de flujo génico.

En esta tesis, los perfiles de RAPD revelaron variaciones dentro y entre aislados. Esto es una característica importante porque indica que *T. solium* mantiene un fondo genético polimórfico, aunque “silencioso”, debido principalmente a eventos de mutación y posiblemente por intercambio genético durante su reproducción sexual. Además, se hallaron alelos exclusivos, lo que abre la posibilidad en un muestreo más amplio para distinguir cisticercos de diferentes aislados y consecuentemente identificar linajes en este parásito. También nuestros resultados mostraron mayores diferencias que las obtenidas por Hancock *et al.* (2001), probablemente porque nosotros usamos un marcador polimórfico y ellos usaron marcadores más conservados (el DNA mitocondrial

del COI y el del antígeno diagnóstico Ts14). Con base en el bajo grado de diversidad genética encontrada en los cisticercos analizados, estos autores concluyen que las variaciones en los aislados no tienen un papel importante en los aspectos clínicos de la neurocisticercosis. Esta observación se opone al hallazgo de variabilidad inter-específica y la presencia de genotipos de México y Madagascar (Vega *et al.*, 2003) así como afro-americanos y asiáticos (Ito *et al.*, 2002), los cuales podrían explicar las manifestaciones clínicas que se presentan en la neurocisticercosis; sin embargo es importante evaluar con mayor detalle este tipo de estudios, ya que individuos con el mismo genotipo pueden variar fenotípicamente y esta variación está determinada por el ambiente y se conoce como plasticidad fenotípica (Hartl y Clark, 1989). Sin embargo, para la comprobación de esto se requieren de análisis de secuencias de genes metabólicos y regiones silenciosas para someterlas a un análisis molecular de selección y pruebas de neutralidad (Pruebas de Tajima, Ewens-Watterson, etc) (Comunicación personal con el Dr. Eguiarte).

Con respecto a los valores de heterocigosis, nuestros datos están acordes con los reportados en aislados japoneses de *Taenia taeniaeformis* (Okamoto *et al.*, 1995) que van de 0.00 a 0.09, a los de aislados australianos de *Echinococcus granulosus* (Thompson y Lymbery, 1995) que van de 0.02 a 0.06, a los de Brouwer *et al.* (2001) con poblaciones de *Schistosoma haematobium* quienes, usando RAPD, mostraron una heterocigosis promedio de 0.11, con 53 *loci* identificados y de estos 22 fueron polimórficos. Aunque no es correcto comparar directamente los parámetros de la literatura con los obtenidos en el presente trabajo ya que no coinciden en técnicas o en el cálculo de los índices poblacionales, puede realizarse una aproximación considerando los posibles sesgos por las metodologías empleadas. Así, para *T. solium* se encontró una H_T de 0.046 a 0.160 y una P de 0.133 a 0.407 entre aislados de

distintas regiones de México y Madagascar, con 113 *loci*, de los cuales 49 fueron polimórficos (Vega *et al.*, 2003). Los valores de H obtenidos en nuestro estudio van de 0.052 a 0.107 cuando se analizan como organismos diploides bajo equilibrio de Hardy-Weinberg y de 0.033 a 0.087 cuando se calculan como organismos haploides, mientras que los valores de P van de 0.122 a 0.305 con 49 *loci*, de los cuales de 12 a 30 fueron polimórficos para cada aislado. Respecto al cálculo de la heterocigosis esperada promedio como organismos diploides bajo equilibrio de Hardy-Weinberg y como organismos haploides, no se observó una gran diferencia, ya que la primera fue de $H = 0.077$ y la segunda de $H_c = 0.067$; sin embargo al analizar ambas heterocigosis por aislado (cuadro 8), algunas fueron marcadamente diferentes como en el caso del aislado "a" ($H = 0.107$ y $H_c = 0.033$), por lo que considerando el carácter endogámico y clonal de *T. solium*, así como para que tome sentido el análisis de desequilibrio de ligamiento, es adecuado considerar la aproximación de un análisis de heterocigosis como un organismo haploide y clonal.

Inicialmente los RAPD fueron considerados de gran utilidad para estudios poblacionales, sin embargo actualmente muchos grupos de investigación evitan emplear esta técnica, ya que pueden obtener bandas en exceso y artefactos experimentales lo que ha cuestionado su reproducibilidad (Majerus, *et al.*, 1996; Karp, *et al.*, 2002; la revista *Molecular Ecology* no acepta trabajos de RAPD para su publicación salvo que vengán acompañados de otras técnicas y no gire sobre los RAPD la discusión principal). Para ilustrar lo anterior, la Red de Laboratorios Europeos de la Comunidad Europea, realizó una prueba sobre la reproducibilidad de los RAPD, para ello se distribuyeron hojas y DNA de álamo a distintos laboratorios de la Red, se enfatizó en emplear el mismo modelo de termociclador y las mismas condiciones de extracción, amplificación y corrimiento de los perfiles, así como el uso de la misma

marca de *Taq*. Los laboratorios enviaron los perfiles obtenidos previamente comprobada su reproducibilidad por ellos mismos. Al comparar los resultados se observaron ciertas diferencias en presencia e intensidad de bandas, por ello se concluyó que los perfiles de RAPD no tienen la suficiente reproducibilidad a pesar de los esfuerzos por mantener condiciones de reacción constantes. Sin embargo, pueden emplearse para estudios de diversidad si los datos son obtenidos por un solo laboratorio (Karp et al., 2002).

Se puede hablar de *loci* polimórficos cuando la frecuencia del alelo más común es de 0.99 o menor (Hedrick, 2000), sin embargo se ha observado que cuando se muestrean menos de 50 individuos por subpoblación, los alelos cuya proporción es de 0.01 podrían no estar representados en la muestra (Nei, 1987), por ello es probable que nuestros resultados de P y los de Vega *et al.* (2003) estén subvalorados, ya que nosotros analizamos de 10 a 30 cisticercos por aislado y Vega analizó de 1 a 7 cisticercos por cerdo. Por otra parte, nuestros resultados y los de Vega muestran *loci* exclusivos para ciertos aislados; estos alelos se les denominan “raros” ya que se ha observado en diversos estudios poblacionales que eventualmente aparece este tipo de alelos que se fijan en todos los individuos de una misma especie o subespecie como consecuencia de la deriva génica o selección natural (Hartl y Clark, 1989; Navarro, 1999). Además, la fijación de alelos solo sucede cuando no hay (o es muy bajo) el flujo génico, lo cual esta acorde al comportamiento del parásito como se analiza más adelante.

El análisis genético mostró que los aislados “a” de Guerrero, “d” de Yucatán y “e” de Honduras tuvieron una estructura clonal debido al desequilibrio de ligamiento que presentaron, lo que permite explicar como el fondo de DNA polimórfico de un parásito hermafrodita con auto-fertilización hereda y mantiene alelos asociados sin una

segregación aleatoria. Por otro lado, la ausencia de diferencias estadísticas en V_O/V_E de los aislados de Morelos (“b” y “c”) y Tanzania sugieren una asociación aleatoria de alelos como en algunas poblaciones de *E. granulosus* (Thompson y Lymbery, 1995) que podría ser debida a eventos de mutación y recombinación como eventos biológicos capaces de romper el desequilibrio de ligamiento (Hedrick, 1999).

Ha sido bien documentado que el flujo génico puede romper el desequilibrio de ligamiento (Hart y Clark, 1989). Vega *et al.* (2003) reportan valores de $G_{ST} = 0.757$ y $Nm = 0.159$ entre los aislados de México y Madagascar, nuestros resultados muestran un índice de coancestría $\Theta = 0.717$ y $Nm = 0.068$ para los 49 *loci* de los 6 aislados analizados. Los resultados de ambos grupos sugieren que las poblaciones de cisticercos están muy diferenciadas y que es improbable que pueda llevarse a cabo algún tipo de migración o de flujo génico entre los cisticercos de los aislados de distintas regiones geográficas. Es probable que un flujo génico lo puedan llevar a cabo los individuos portadores del gusano adulto y no los cerdos cisticercosos que son transportados para su comercialización. Sin embargo existen otras formas alternativas de recombinación, que aunque poco probables o en menor proporción, pudieran presentarse: (1) Por ejemplo, podría ocurrir fecundación cruzada entre estróbilos diferentes cuando eventualmente más de una tenia parasita a un individuo o (2) Si se considera a cada aislado como una subpoblación, existe la posibilidad de que los cerdos que deambulan libremente en las comunidades, puedan comer huevos de dos tenias diferentes, aumentando la heterocigosis y la proporción de *loci* polimórficos, sin embargo, este evento se ve restringido por la presencia de inmunidad concomitante (Mitchell, 1982; Flisser *et al.*, 2002). Para que esto ocurra se necesita que un cerdo ingiera en cuestión de días huevos de más de una tenia de diferente linaje clonal. Para corroborar esto, es necesario llevar a cabo más estudios respecto al flujo génico en *T.*

solium, tales como la infección experimental de cerdos con huevos de este parásito de un solo linaje y una mezcla de varios linajes, llevando a cabo la cinética de detección de anticuerpos durante la infección. Asimismo, observaciones realizadas por nuestro grupo con el modelo experimental de teniosis por *T. solium* en hámster dorado se ha observado que cuando se infectan experimentalmente los roedores con 4 cisticercos y se inmunosuprimen con glucocorticoides, a las pocas semanas postinfección (SPI) se pueden recuperar 4 gusanos adultos, los cuales generalmente varían en su tamaño y desarrollo, conglomerándose los estróbilos de estos parásitos lo que podría favorecer la fecundación cruzada. Como un evento fortuito al realizar la necropsia de un hámster parasitado, se observaron 2 ejemplares de tenia que se encontraban unidos entre si por algunos proglótidos presumiblemente maduros, ya que se localizaban en una sección intermedia de los estróbilos, desafortunadamente los ejemplares fueron mal procesados para su montaje por lo que se perdió esta información, pero muestra que efectivamente puede ocurrir esporádicamente la fecundación cruzada al menos en los modelos experimentales. Esto implica además, la posibilidad de un conflicto sexual en *T. solium*, ya que cuando dos tenias se establecen y empiezan a crecer y desarrollarse en el mismo nicho intestinal, es posible que al alcanzar la madurez lleven a cabo un fecundación cruzada, por lo que deben de superar un posible conflicto sexual sobre la inclinación para comportarse como macho u hembra como se ha observado en *Schistocephalus solidus* (Lüscher y Milinski, 2003), al continuar creciendo por competencia de espacio y recursos, la mayor parte de los parásitos son eliminados, sin embargo los gusanos que sobreviven (en general solo uno), pudieron llevar a cabo una fecundación cruzada, lo que redundaría en un incremento en la variabilidad genética de sus huevos. Complementariamente, se ha observado que los gusanos hermafroditas *Schistocephalus solidus* y *Caenorhabditis elegans* pueden llevar a cabo tanto auto-

fecundación (*selfing*) como fecundación cruzada (*outcrossing*). En el caso de *S. solidus* los huevos producidos por *selfing* eclosionan 10 veces menos que los desarrollados por *outcrossing*, además la progenie derivada de *selfing* presentan una homogeneidad genética que se ha asociado a bajas tasas de infección y un crecimiento y desarrollo reducido en sus hospederos, fenómenos que sugieren un efecto de depresión por endogamia en este céstodo (Wedekin *et al.*, 1998; Christen *et al.*, 2002, Lüscher y Milinski, 2003). Por otra parte, se ha observado que en las poblaciones del nemátodo hermafrodita *C. elegans* se pueden encontrar algunos machos, siendo los cromosomas sexuales de los gusanos hermafroditas XX y el de los machos XO, estos últimos derivados de un fenómeno espontáneo de no-disyunción (*nondisjunction*) durante la meiosis normal, por lo que su frecuencia en la población es muy baja, además de que el apareamiento de los machos sólo lo realizan con pocos gusanos hermafroditas (Chasnov y Chow, 2002). Sobre el mantenimiento de estos machos en poblaciones hermafroditas se han planteado dos hipótesis: 1) Solamente una pequeña cantidad de *outcrossing* podría ser requerida para que la reproducción sexual produzca cierta ventaja, y 2) un hermafrodita que realiza solo *selfing* y que no produce machos puede tener una selección negativa cuando compite con hermafroditas que producen machos en baja frecuencia y que realizan *outcrossing* (Hurst y Peck, 1996; Graustein *et al.*, 2002).

La reproducción por *selfing* puede ser considerada como un caso extremo de endogamia que genera altos niveles de homocigosis. Según la teoría neutralista, establecida por Motoo Kimura, sostiene que las mutaciones ventajosas son muy raras y que la mayor parte de los alelos de la mayoría de los genes son selectivamente neutros, así, la “tasa de evolución” será igual a la “tasa de mutación neutra” (Freeman y Herron, 2002). Asimismo, la variabilidad neutra también debe ser

proporcional al tamaño de la población efectiva (N_e), por lo que el modelo neutral predice que una población que exclusivamente se reproduce por auto-fecundación (*selfers*) contendrá ~ 50% de la diversidad presente en una población similar que realice fecundación cruzada (Graustein *et al.*, 2002). La disminución de la variabilidad genética en *selfers* puede resumirse en tres modelos básicos (Graustein *et al.*, 2002): 1) Fenómenos de “cuello de botella” extremos en el tamaño poblacional, que pueden ser más frecuentes en poblaciones que exclusivamente se reproduce por auto-fecundación. Además debido a que el efecto de “cuello de botella” en las poblaciones generan una pérdida de la variación genética, “cuellos de botella” repetitivos podrían explicar la baja diversidad observada en especies de *selfers*. 2) Si hay polimorfismos balanceados que sean favorecidos por selección sobredominante (ventaja a favor del heterocigoto), estos se pueden perder fácilmente en poblaciones de *selfers*, en las que hay muy pocos heterocigotos que puedan beneficiarse de la heterocigosis misma. 3) Al haber un incremento en la homocigosis que resulta del *selfing*, puede esperarse una disminución en la efectividad de recombinación, ya que esta se ve afectada fuertemente por la frecuencia de dobles heterocigotos. La reducción en la tasa de recombinación efectiva, en cambio, incrementaría el impacto del *hitch-hiking* genético y el fondo de selección que tiene en los niveles de variación. El fenómeno de *hitch-hiking* se refiere a que cuando dos *locus* se encuentran en desequilibrio de ligamiento; suponiendo un *locus* con dos alelos, en donde A es un alelo neutro con respecto a un efecto de selección, pero el genotipo del otro *locus*, el B, tiene diferente grado de adecuación, entonces la frecuencia alélica en el *locus* neutro se verá afectada por la acción de la selección que actúa en el otro *locus* (Majerus *et al.*, 1996).

Llama la atención el hallazgo de que varios cisticercos comparten la misma identidad genética, como se presentó con 13 cisticercos idénticos del aislado “b” y en varios cisticercos de los otros aislados (la misma observación fue reportada por Vega *et al.* 2003). Como se mencionó anteriormente, se ha observado que individuos con el mismo genotipo pueden variar fenotípicamente, esta variación está determinada por el ambiente y se conoce como plasticidad fenotípica, y es estudiada por la genética cuantitativa (Hartl y Clark, 1989). De esta forma, cisticercos genéticamente idénticos podrían mantener una relación hospedero-parásito variable como consecuencia de factores propios del hospedero como su estado inmunológico, nutricional, fondo genético, edad etc. Por otra parte, los individuos con genotipos idénticos podrían ser el resultado de una selección en los cisticercos, ya que la *Taenia* desarrolla una sola generación de cisticercos en un hospedero intermediario definido. Los cisticercos que llegan a establecerse y a desarrollarse en el cerdo podrían presentar alelos exitosos o seleccionados que les facilita su perpetuación en la naturaleza mostrando una “estructura epidémica”. En este sentido Maynard-Smith *et al.* (1993) sugieren que el desequilibrio de ligamiento puede aparecer en poblaciones en las cuales la recombinación es frecuente debido a la reproducción sexual.

Todos los eucéstodos son hermafroditas con reproducción sexual; sin embargo, actualmente se desconoce el modo exacto de transferencia de esperma entre ellos (Smyth, 1994). Aunque la auto-inseminación y la inseminación cruzada han sido estudiadas en varias especies desde hace tiempo (Smyth y Smyth, 1969; Schiller, 1974; Smyth y McManus, 1989), en *Taenia solium* aún no se ha establecido su capacidad de inseminación intra-proglótido e inter-proglótido (auto-fecundación) y ocasionalmente entre proglótidos de estróbilos diferentes (fecundación cruzada). La presencia de un alto grado de auto-fecundación en organismos hermafroditas, tales como los céstodos,

implicaría necesariamente que estos organismos sean homocigóticos, en los que dicha condición es generalmente considerada en “detrimento de la evolución” (Smyth, 1994), por lo que podrían estar operando otros mecanismos para asegurar la diversidad genética. Asimismo, múltiples autores han señalado que la reproducción sexual es complicada, costosa y riesgosa (Freeman y Herron, 2002). Buscar pareja toma tiempo y energía, y puede aumentar el riesgo del que busca de ser cazado por un depredador. Una vez encontrada una pareja potencial, puede pedir un esfuerzo o inversión adicional antes de consentir y copular y el cruce puede ser estéril. En el caso de *T. solium* ¿Porque mantiene una reproducción sexual con una alta endogamia si otros ténidos relacionados como *Taenia crassiceps* y *Echinococcus* puede reproducirse asexualmente por “gemación”? En una revisión realizada por Heath (1977) sobre las ventajas de los hermafroditas simultáneos, establece que en estos organismos, las células sexuales masculinas y femeninas maduran al mismo tiempo y su fecundación la realizan internamente, lo que les confiere la ventaja de evitar pérdidas de gametos y evita un gasto de energía para la sobreproducción de gametos, ya que las especies hermafroditas invierten menos energía que las especies dioicas, lo cual concluyó mediante el siguiente análisis:

R = Recursos disponibles para la reproducción en un individuo, pueden estar repartidos en: 1) Producción y mantenimiento de aparatos reproductivos, como son los órganos copulatorios, gónadas, conductos asociados, secreciones, etc., y 2) La producción de gametos.

a = energía requerida para la producción y mantenimiento de estructuras reproductivas masculinas,

b = energía requerida para la producción y mantenimiento de estructuras reproductivas femeninas.

Entonces los recursos disponibles en las especies dioicas para la producción de gametos serían: Para la producción de espermatozoides en los machos, $R - a$; para la producción de óvulos en las hembras, $R - b$. Así, el total de energía disponible para los organismos dioicos es $2R - (a + b)$. Asumiendo que el sistema reproductivo de los hermafroditas es la suma de las partes presentes de ambos sexos de su contraparte dioico, entonces la energía disponible de un hermafrodita para la producción de gametos es: $R - (a + b)$, y la energía disponible para un par de hermafroditas sería por lo tanto $2R - 2(a + b)$. En otras palabras, hay mayor energía disponible para la producción de gametos en las especies dioicas porque realizan un menor desembolso para las estructuras reproductivas. Cada hermafrodita producirá la mitad de huevos que una hembra dioica, aunque la energía es optimizada ya que el sistema reproductor de los hermafroditas no consiste en dos partes separadas de funciones macho y hembra, por lo que pueden utilizar conductos en común (Heath, 1977).

Por otra parte, una de las hipótesis sobre la evolución del sexo por ventajas en ambientes temporalmente heterogéneos (como puede ser el intestino para la *Taenia*) llamado modelo de la "lotería" muestra que si bien en especies sexuales se producen homocigotos para genes deletéreos y se rompen condiciones óptimas, su varianza también es mayor y se pueden producir algunos individuos con adecuación notablemente alta, aún cuando el ambiente sea impredecible, aunque posiblemente la media de la adecuación de su progenie sea menor que las progenies asexuales, por la llamada "carga recombinacional" generada (Williams, 1975 tomado de Eguiarte *et al.*, 1999). En otras palabras, mientras que en especies asexuales toda una clona tiene un solo boleto de la lotería, en las especies sexuales cada hijo (que para *T. solium* sería un huevo) tiene un número distinto y alguno puede "pegarle al gordo" en la próxima generación (que este huevo sobreviva en el ambiente, sea ingerido por un cerdo, evada

el sistema inmune del hospedero, logre madurar y se mantenga viable hasta que sea consumido por su hospedero definitivo, el ser humano, para generar una nueva tenia). Los parámetros de Wright conocidos como F_{IS} (coeficiente de endogamia o consanguinidad) y F_{IT} (coeficiente de endogamia total) para ser calculados requieren de la heterocigosis observada y debido a que en el presente estudio se emplearon RAPD que no la cuantifican, el impacto de la autofecundación en este parásito no pudo ser valorado, por lo que se deben emplear otras herramientas para su análisis.

Perspectivas

- La presencia de enzimas estadio-específicas como la GPI, ME y MPI pueden tener varias aplicaciones: en el diagnóstico diferencial de especie en ensayos de coproantígenos, como tratamiento anticestocida, inhibiendo la actividad de la MDH en los cisticercos, y como vacuna.
- Debido a que se encontró un adulto heterocigoto de *T. taeniaefromis* en el perfil isoenzimático de la MPI, su gen podrían ser candidato a ser analizado por otros marcadores moleculares como los RFLP o su secuenciación para la detección de probables parásitos heterocigotos de los que se podrán estimar los índices F_{IS} y F_{IT} a partir de la heterocigosis observada,
- Es posible clonar y secuenciar los *loci* que presentan alelos raros exclusivos de ciertos aislados para construir sondas o iniciadores específicos, los cuales permitan estudiar la dinámica de transmisión de la cisticercosis en cerdos infectados de manera natural, contribuyendo a la epidemiología molecular que remunerará en el control de este parásito.
- La hipótesis de que un cerdo puede infectarse con huevos de más de una tenia de diferente linaje e incrementar los valores de heterocigosis y *loci* polimórficos,

el sistema inmune del hospedero, logre madurar y se mantenga viable hasta que sea consumido por su hospedero definitivo, el ser humano, para generar una nueva tenia). Los parámetros de Wright conocidos como F_{IS} (coeficiente de endogamia o consanguinidad) y F_{IT} (coeficiente de endogamia total) para ser calculados requieren de la heterocigosis observada y debido a que en el presente estudio se emplearon RAPD que no la cuantifican, el impacto de la autofecundación en este parásito no pudo ser valorado, por lo que se deben emplear otras herramientas para su análisis.

Perspectivas

- La presencia de enzimas estadio-específicas como la GPI, ME y MPI pueden tener varias aplicaciones: en el diagnóstico diferencial de especie en ensayos de coproantígenos, como tratamiento anticestocida, inhibiendo la actividad de la MDH en los cisticercos, y como vacuna.
- Debido a que se encontró un adulto heterocigoto de *T. taeniaefromis* en el perfil isoenzimático de la MPI, su gen podrían ser candidato a ser analizado por otros marcadores moleculares como los RFLP o su secuenciación para la detección de probables parásitos heterocigotos de los que se podrán estimar los índices F_{IS} y F_{IT} a partir de la heterocigosis observada,
- Es posible clonar y secuenciar los *loci* que presentan alelos raros exclusivos de ciertos aislados para construir sondas o iniciadores específicos, los cuales permitan estudiar la dinámica de transmisión de la cisticercosis en cerdos infectados de manera natural, contribuyendo a la epidemiología molecular que remunerará en el control de este parásito.
- La hipótesis de que un cerdo puede infectarse con huevos de más de una tenia de diferente linaje e incrementar los valores de heterocigosis y *loci* polimórficos,

puede probarse infectando experimentalmente a cerdos con huevos de tenias diferentes y analizar el perfil genético de los cisticercos que se recuperen, empleando marcadores moleculares como los RFLP, SSPC y microsatélites para registrar la heterocigosis real (heterocigosis observada).

- *Taenia solium* se presenta como un modelo evolutivo interesante, ya que su estructura poblacional muestra que los cisticercos de cada cerdo parasitado se comportan como una subpoblación diferenciada y con escasa variabilidad y flujo génico, por lo tanto la reproducción de su ciclo de vida en animales de laboratorio puede conducir al estudio de fenómenos de coevolución, evolución experimental y fenómenos de “costo” o depuración por endogamia, los cuales podrán remunerar en modelos de conservación biológica.
- Resulta fascinante el estudio de la fecundación cruzada en cestodos, particularmente en *T. solium*, ya que con el empleo de los modelos experimentales de teniosis en hámster y chinchilla y el uso de microsatélites, ensayando las secuencias reportadas para *Schistocephalus solidus*, se podría para profundizar en la variabilidad genética, aclarar fecundación cruzada, establecer posibles perfiles de paternidad y linajes, así como la descripción de un dilema del hermafrodita por posibles conflictos sexuales para este parásito.
- En agosto de este año, el grupo del Dr. Akira Ito publicó la presencia de un cisticerco cerebral de *T. solium* del genotipo asiático en una mujer japonesa (Yamasaki, *et al.*, 2004). El diagnóstico se realizó por serología y por imagen, mientras que la caracterización molecular se realizó por la secuencia de del gen de COI. Esto sugiere al advenimiento de una nueva forma integral de realizar estudios clínicos y epidemiológicos, por lo que seguramente en el futuro próximo se publicarán estudios sobre los genotipos y cepas en *T. solium*.

- BIBLIOGRAFÍA

Avila, G., L. Aguilar, S. Benitez, L. Yépez-Mulia, I. Lavenat, y A. Flisser. 2002. Inflammatory responses in the intestinal mucosa of gerbils and hamsters experimentally infected with the adult stage of *Taenia solium*. *International Journal for Parasitology* **32**: 1301-1308.

Avila, G., M. Benitez, L. Aguilar-Vega, y A. Flisser. 2003. Kinetics of *Taenia solium* antibodies and antigens in experimental taeniosis. *Parasitology Research* **89**: 284-289.

Avila, G. 2003. Participación de las células cebadas en la expulsión del estadio adulto de *Taenia solium* en los modelos experimentales del hámster dorado y el jergo mongol. Tesis de Doctorado, Facultad de Medicina, UNAM. 64 p.

Awise, J.C. Protein Electrophoresis en: *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall. NY. EU. 47-53.

Axelrod R y Hamilton W.D. 1981. The evolution of cooperation. *Science* **211**: 1390-1396

Bouchet, V.B. 1997. Estructura genética de *Rhizobium etli*, durante un ciclo de siembra (1994), en Calpan, Puebla. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. 82p.

Bowles, J. y D.P. McManus. 1994. Genetic characterization of the Asian *Taenia* a newly described taeniid cestode of humans. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **50**: 33-44

Brown A.H.D., M.W. Feldman y E. Nevo. 1980. Multilocus structure of natural populations of *Hordeum spontaneum*. *Genetics* **96**: 523-536.

Brouwer, K.C., P. Ndhlovu, A. Munatsi, y C. Shiff. 2001. Genetic diversity of a population of *Schistosoma haematobium* derived from schoolchildren in East Central Zimbabwe. *Journal of Parasitology* **87**: 762-769.

Chasnov, J.R., y K.L. Chow. 2002. Why are there males in the hermaphroditic species *Caenorhabditis elegans*?. *Genetics* **160**: 983-994.

Crow, J.F. y F. Aoki. 1984. Group selection for a polygenic behavioral trait: Estimating the degree of population subdivision. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **81**: 6073-6077.

Charnov, E.L., J. Maynard-Smith, J.J. Bull. 1976. Why be an hermaphrodite?. *Nature* **263**: 125-126.

Charnov E.L. 1985. Natural selection and the evolutionary ecology of sex allocation En: *Evolution, Essays in honour of John Maynard Smith*. Greenwood PJ, Harvey PH y Slatkin M (eds). Cambridge University Press. U.K. 269-271.

Christen, M., J. Kurtz, y M. Milinski. 2002. Outcrossing increases infection success and competitive ability: experimental evidence from a hermaphrodite parasite. 2002. *Evolution* **56**: 2243-2251.

De Queiroz A y Alkire N.L. 1998. The phylogenetic placement of *Taenia* cestodes that parasitize humans. *Journal of Parasitology* **84**: 379-383.

Del Brutto, O.H., V. Rajshekhar, Jr. A.C. White, V.C. Tsang, T.E. Nash, O.M. Takayanagui, P.M. Schantz, C.A. Evans, A. Flisser, D. Correa, D. Botero, J.C. Allan, E. Sarti, A.E. Gonzalez, R.H. Gilman y H.H. García. 2001. Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis. *Neurology* **57**: 177-183.

Dugatkin A.L. 1998. Cooperation among animals. Oxford University Press. 411p.

García, H.H., C.A.W. Evans, T.E. Nash, O.M. Takayanagui, A.C. White, D. Botero, V. Rajshekhar, V.C.W. Tsang, P.M. Schantz, J. Allan, A. Flisser, D. Correa, E. Sarti, J. Friedland, S.M. Martinez, A.E. Gonzalez, R.H. Gilman y O.H. Del Brutto. 2002. Consensus: current guidelines for treatment of neurocysticercosis. *Clinical Microbiology Review*, **15**: 747-756.

Eguiarte, L.E. 1990. Genética de poblaciones de *Astrocaryum mexicanum* Liebm. en los Tuxtlas, Ver. Tesis de Doctorado. Centro de Ecología. UNAM. 215p.

Eguiarte, L.E., Souza V., Núñez-Farfan J. y Hernández-Baños B. 1997. El análisis filogenético: métodos, problemas y perspectivas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. **60**: 169-178.

Eguiarte, L.E., J. Núñez-Farfan, C. Domínguez y C. Cordero. 1999. La Biología evolutiva de la reproducción en plantas. En Eguiarte, L.E y J. Núñez-Farfán (compiladores) 1999. La evolución biológica. Facultad de Ciencias, Instituto de Ecología, UNAM; CONABIO. Margen Servicios Editoriales. 117-151 pp.

Eguiarte, L.E., y Piñero D. 1999. Genética de la conservación: leones vemos, genes no sabemos. En Eguiarte, L.E y J. Núñez-Farfán (compiladores) 1999. La evolución biológica. Facultad de Ciencias, Instituto de Ecología, UNAM; CONABIO. Margen Servicios Editoriales. 380 pp.

Eom, K.S., H.K. Jeon, Y. Kong, U.W. Hwang, X. Li, L. Xu, Z. Feng, Z.S. Pawlowski, y H.J. Rim. 2002. Identification of *Taenia asiatica* in China: molecular, morphological, and epidemiological analysis of a Luzhai isolate. *Journal of Parasitology* **88**: 758-764.

Flisser, A., I. Madrazo, y H. Delgado. 1997. Cisticercosis humana. Ed. Manual Moderno, México, DF., 176p.

Flisser, A., y M.W. Lightowers. 2001. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **96**: 353-356.

Flisser, A., E. Sarti, M. Lightowers, y P. Schantz. 2003. Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. *Acta Tropica* **87**: 43-51.

Flisser, A., D. Correa, C.A.W. Evans. 2002. *Taenia solium* cysticercosis: new and revisited immunological aspects. En *Taenia solium* Cysticercosis from Basic to Clinical Science, Gangandee Singh y Sudesh Prabhakar (editores) CABI Publishing, Wallingford, UK. 15-24.

Flisser, A., A.E. Viniegra, L. Aguilar-Vega, A. Garza-Rodríguez, P. Maravilla y G. Avila. 2004. Portrait of human tapeworms. *Journal of Parasitology* **90**: 914-916.

Freeman S y Herron J.C. 2002. Análisis Evolutivo, 2da Edición. Prentice Hall Barcelona, España 703p.

García, H.H., R.H. Gilman, A.E. González, R. Pacheco, M. Verastegui, V.C.M. Tsang. 1999. Human and porcine *Taenia solium* infection in a village in the highlands of Cusco. Peru. *Acta Tropica* **73**: 31-36.

Graustein, A., J.M. Gaspar, J.R. Walters, y M. F. Palopoli. 2002. Levels of DNA polymorphism vary with mating system in the nematode genus *Caenorhabditis*. *Genetics* **161**: 99-107.

Grosberg, R.K., D.R. Levitan y B.B. Cameron. Characterization of genetic structure and genealogies using RAPD-PCR markers: A Random Primer for the Novice and the Nervous on Ferraris En *Molecular Zoology: Advances, Strategies and Protocols*. J.D. Palumbi y S.R. Palumbi (editors). Wiley-Liss. USA 1112-1145.

Hancock, K., D.E. Broughel, I.N.S. Moura, A. Khan, N.J. Pieniazek, A.E. Gonzalez, H.H. García, R.H. Gillman, y V.C.W. Tsang. 2001. Sequence variation in the cytochrome oxidase I, internal transcribed spacer 1, and Ts 14 diagnostic antigen sequences of *Taenia solium* isolates from South and Central America, India, and Asia. *International Journal for Parasitology* **31**: 1601-1607.

Hartl, D.L y A.G. Clark 1989. *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates Publisher. Sunderland Massachusetts, EU. 682p.

Heath D.J. 1977. Simultaneous hermaphroditism; cost and benefit. *Journal of Theoretical Biology* **64**: 363-373.

Hebert, P.D.N., y M.J. Beaton. 1993. *Methodologies for allozyme analysis using cellulose acetate electrophoresis: a practical handbook*. Helena Laboratories, Beaumont, Texas, 39 p.

Hedrick P.W. 1999. *Genetics of Populations*. Jones and Bartlett Publishers. Boston EU. 553p.

Herwerden van L., R.B. Gasser, D. Blair. 2000. ITS-1 ribosomal DNA sequence variants are maintained in different species and strains of *Echinococcus*. *International Journal of Parasitology*. **30**:157-169.

Huerta, M., A.S. de Aluja, G. Fragoso, A. Toledo, N. Villalobos, M. Hernández, G. Gevorkian, G. Acero, A. Diaz, I. Alvarez, R. Avila, C. Beltrán, G. García, J.J. Martínez, C.

- Larralde, y E. Sciutto. 2001. Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. *Vaccine* **20**: 262-266.
- Hurst, L.D., y J.R. Peck. 1996. Recent advances in understanding the evolution and maintenance of sex. *Trends in Ecology and Evolution* **11**: 46-52.
- Hormaza, J.I., K. Pinney, y V.S. Polito. 1998. Genetic diversity of pistachio (*Pistacia vera*, Anacardiceae) germplasm based on randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) Markers. *Economic Botany* **52**: 78-87.
- Ito, A., M. Nakao, M. Okamoto, Y. Sato y H. Yamasaki. 2002. Mitochondrial DNA of *Taenia solium*: from basic to applied science. En *Taenia solium* Cysticercosis from Basic to Clinical Science, Gangandee Singh y Sudesh Prabhakar (editores) CABI Publishing, Wallingford, UK. 47-56.
- Johnston, D.A. y M.A. Fernando. 1997. Isoenzymes of *Eimeria* from the domestic fowl: Electrophoretic variants among species, strains and clones. *Parasitology Research* **83**: 464-470.
- Karp, A., P. Isaac. y D. S. Ingram. 2002. Molecular tools for screening biodiversity in plants and animals. Chapman y Hall. Londres 498 p.
- Khandka D.K., M. Tuna, M. Tal, A. Nejidat, y A. Golan-Golhirsh. 1997. Variability in the pattern of random amplified polymorphic DNA. *Electrophoresis*. 1997. **18**: 2852-2856.
- Král'ová, I. y M. Špakulová. 1996. Intraspecific variability of *Proteocephalus exiguous* La Rue, 1911 (Cestoda: Proteocephalidae) as studied by the random amplified polymorphic DNA method. *Parasitology Research* **82**: 542-545.
- LeRiche, P.D. y M.M.H. Sewell. 1977. Differentiation of *Taenia saginata* and *Taenia solium* by enzyme electrophoresis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **71**, 4: 327-328.
- Lewontin, R.C. y J.L. Hubby. 1966. A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural population II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural population of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* **54**: 595-609.
- Lymbery, A.J. y R.C.A. Thompson. 1988. Electrophoretic analysis of genetic variation in *Echinococcus granulosus* from domestic hosts in Australia. *International Journal of Parasitology* **18**: 803-811.
- Majerus, M., W. Amos y G. Hurst. 1996. *Evolution: The four billion year war*. Longman, Londres 340p.
- Maravilla, P., G. Avila, V. Cabrera, L. Aguilar, y A. Flisser. 1998. Comparative development of *Taenia solium* in experimental models. *Journal of Parasitology* **84**: 882-886.
- Maravilla P., R.C.A. Thompson, J.A. Palacios-Ruiz, A. Estcourt, E. Ramirez-Solis, C. Mondragon-de-la-Pena, M. Moreno-Moller, A. Cardenas-Mejia, P. Mata-Miranda, M.T.

- Aguirre-Alcantara, C. Bonilla-Rodriguez, y A. Flisser. 2004. *Echinococcus granulosus* cattle strain identification in an autochthonous case of cystic echinococcosis in central Mexico. *Acta Tropica* **92**:231-236
- Maynard-Smith J. 1978. The evolution of sex. Cambridge University Press. U.K. 221p.
- Maynard-Smith J., N.H. Smith, M. O'Rourke y B. G. Spratt. 1993. How clonal are bacteria?. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **90**: 4384-4388.
- McManus, D.P., E. Garcia-Zepeda, A. Reid, A.K. Rishi, y A. Flisser. 1989. Human cysticercosis and taeniosis: molecular approaches for specific diagnosis and parasite identification. *Acta Leidensia* **57**: 81-91.
- Miller, M.P. 1997. Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA) 1.3. A windows program for the analysis of allozyme and population genetic data. Computer software distributed by the autor, Northern Arizona University.USA
- Mitchell, G.F. 1982. Genetic variation in resistance of mice to *Taenia taeniaeformis*: analysis of host-protective immunity and immune evasion. En *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspective*, A. Flisser, K. Willms, J.P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridaura, F. Beltran (eds.) Academic Press, NY, USA., p. 575-584.
- Müller-Starck, 1998. RAPD En *Molecular Tools for screening biodiversity* Karp, A., P.G. Isaac, D. S. Ingram (editors). Chapman and Hall. London. 498 p.
- Moss, D.W. 1982. Isoenzymes. Chapman and Hall. London. 5-9.
- Nakao, M., Y. Sako, N. Yokoyama, N. Fukunaga y A. Ito. 2000. Mitochondrial genetic code in cestodes. *Molecular and Biochemical Parasitology* **111**: 415-424.
- Nakao, M., M. Okamoto, Y. Sako, H. Yamasaki, K. Nakaya, y A. Ito. 2002. A phylogenetic hypothesis for the distribution of two genotypes of the pig tapeworm *Taenia solium* worldwide. *Parasitology* **124**: 657-662
- Navarro, A. 1999. Estructura genética y procesos de especiación de *Agave cerulata* (Trel.) y *Agave subsimplex* (Trel.) en el desierto sonorense a partir de RAPD's. Tesis de Licenciatura. Fac. Ciencias UNAM. 96p.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* **106**: 283-292.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **70**: 3321-3323.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. USA. 512p.
- Okamoto M., A. Ito, T. Kurosawa, Y. Oku, M. Kamiya, y T. Agatsuma. 1995. Intraspecific variation of isoenzymes in *Taenia taeniaeformis*. *International Journal for Parasitology* **25**: 221-228.

- Pawlowski, Z.S. 2002. *Taenia solium*: Basic biology and transmission En *Taenia solium* Cysticercosis from Basic to Clinical Science, Gangandee Singh y Sudesh Prabhakar (editores) CABI Publishing, Wallingford, UK. 1-15.
- Peakall, P., P.E. Smouse y D.R. Huff. 1995. Evolutionary implications of allozyme and RAPD variation in diploid populations of dioecious buffalograss *Buchloë dactyloides*. *Molecular Ecology* **4**: 135-147
- Petkeviciute R. 1996. A chromosome study in the progenetic cestode *Cyathocephalus truncatus* (Cestoda:Spathebothriidea). *International Journal of Parasitology*. **26**: 1211-1216.
- Plancarte, A., A. Flisser, CG. Gauci, M.W. Lightowers. 1999. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in pigs using native and recombinant oncosphere antigens. *International Journal of Parasitology* **29**: 643-647.
- Prabhakar S. y G. Singh. 2002. Neurocysticercosis: an overview of clinical presentations En *Taenia solium* Cysticercosis from Basic to Clinical Science, Gangandee Singh y Sudesh Prabhakar (editores) CABI Publishing, Wallingford, UK. 169-176.
- Rausch V.R y R.L. Rausch. The karyotype of *Echinococcus multilocularis* (Cestoda: Taeniidae). *Canadian Journal of Genetic Cytology*. **23**: 151-154.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA. Apéndice C.1.
- Sarti, E.J., P.M. Schantz, R. Lara-Aguilera, H. Gómez, y A. Flisser. 1988. *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in a Mexican village. *Tropical Medicine and Parasitology*, **39**: 194-198.
- Sarti, E.J., P.M. Schantz, A. Plancarte, M. Wilson, O. Gutiérrez, A.S. Lopez, J. Roberts y A. Flisser. 1992. Prevalence and risk factors for *Taenia solium* Taeniasis and cysticercosis in humans and pigs in a Village in Morelos, Mex. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **46**: 677-685.
- Sarti, E.J. y V. Rajshekhar. 2003. Measures for the prevention and control of *Taenia solium* taeniosis and cysticercosis. *Acta Tropica*, **87**: 137-143.
- Schiller, E.L. 1974. The inheritance of x-irradiation-induced effects in the rat tapeworm, *Hymenolepis diminuta*. *Journal of Parasitology*, **60**: 35-46.
- Scott, J.C. y D.P. McManus. 1994. The random amplification of polymorphic DNA can discriminate species and strains of *Echinococcus*. *Tropical Medicine and Parasitology*. **45**: 1-4.
- Siles-Lucas, M., C. Cuesta-Bandera, and M. Cesar-Benito. 1993. Random amplified polymorphic DNA technique for speciation studies of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology Research* **79**: 343-345

- Siles-Lucas, M., M. Cesar-Benito y C. Cuesta-Bandera. 1996. *Echinococcus granulosus*: genomic and isoenzymatic study of Spanish strains isolated from different intermediate hosts. *Veterinary Parasitology* **63**: 273-282.
- Silva, C., L.E. Eguiarte, y V. Souza. 1999. Reticulated and epidemic population genetic structure of *Rhizobium etli* biovar *phaseoli* in a traditionally managed locality in Mexico. *Molecular Ecology* **8**: 227-287.
- Slatkin, M. 1999. Flujo génico. En la evolución biológica, Eguiarte, L.E y J. Núñez-Farfán (compiladores). Fac. Ciencias e Instituto de Ecología UNAM, CONABIO, Margen Servicios Editoriales. 51-61.
- Smyth, J.D. 1994. *Introduction to Animal Parasitology*. Cambridge University Press Londres 549p.
- Smyth, J.D. y M.M. Smyth. 1969. Self-insemination in *Echinococcus granulosus in vivo*. *Journal of Helminthology* **43**: 383-388.
- Smyth, J.D. y D.P. McManus. 1989. *The Physiology of Cestodes*. Cambridge University Press Londres 487p.
- Souza, V., T.T. Nguyen, R.R. Hudson, D. Piñero, y R.E. Lenski. 1992. Hierarchical analysis of linkage disequilibrium in *Rhizobium* populations: evidence for localized sex? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **89**: 8389-8393.
- Stewart, C.N.. Jr. y D.M. Porter. 1995. RAPD profiling in biological conservation: An application to estimating clonal variation in rare and endangered *Illiamna* in Virginia. *Biological Conservation*. **74**: 135-142.
- Thanh H.L., D. Blair y D.P. McManus. 2002. Mitochondrial genomes of parasitic flatworms. *Trends in Parasitology*. **18**:206-213.
- Turčeková, L., y V. Šnábel, S. D'Amelio, M. Busi. y P. Dubinský. 2003. Morphological and genetic characterization of *Echinococcus granulosus* in the Slovak Republic. *Acta Tropica*. **85**: 223-229.
- Thompson, R.C.A. 1995. *Biology and Systematics of Echinococcus*. En *Echinococcus and Hydatid Disease* Thompson R.C.A y Lymbery A.J. (Editores) CABI Publishing, Wallingford, UK. 1-37.
- Vega, R., D. Piñero, B. Ramanankandrasana, M. Dumas, B. Bouteille, A. Fleury, E. Sciutto, C. Larralde, y G. Fragoso. 2003. Population genetic structure of *Taenia solium* from Madagascar and Mexico: implications for clinical profile diversity and immunological technology. *International Journal of Parasitology*. **33**: 1479-1485.
- Verneau, O., F. Thomas, y A.M.F. Catzeflis, F. Renaud. 1995. Evidence of two genetic entities in *Bothriocephalus funiculus* (cestoda) detected by arbitrary-primer polymerase chain reaction random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Parasitology Research* **81**: 591-594

- Varma, T.K., y S.S. Ahluwalia. 1992. Development of *Taenia solium* Linnaeus 1758 in golden hamsters. Indian Journal of American Sciences **62**: 48-49.
- Wedekind, C., D. Strahm., y L. Schärer. 1998. Evidence for strategic egg production in a hermaphroditic cestode. Parasitology **117**: 373-382.
- Weir, B.S. 1996. Genetic Data Analysis II. Sinauer Associates, Mass. USA. 445p.
- Weir, B.S. y C.C. Cockerham. 1973. Mixed self and random mating at two *loci*. Genetic Research, **21**: 247-262.
- Weir, B.S. y C.C. Cockerham. 1984. Estimating F statistics for the analysis of population structure. Evolution **38**: 1358-1370.
- Wikipedia on line: game theory free encyclopedia En www.wikipedia.org/Game_Theory
- Willms, K., J.A. Caro, y L. Robert. 2003. Ultrastructure of spermatogonia and spermatocyte lobules in *Taenia solium* strobilae (Cestoda, Cyclophyllidea, Taeniidae) from golden hamsters. Parasitology Research **90**: 479-488.
- Williams, G.C. 1975. Sex and Evolution. Princeton University Press. New Jersey. USA. 647p.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, y S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research **18**: 6531-6535.
- Welsh, J. y M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research **18**: 303-306.
- Yamasaki, H., S. Matsunaga, K. Yamamura, C.C. Chang, S. Kawamura, Y. Sako, M. Nakao, K. Nakaya, y A. Ito. 2004. Solitary neurocysticercosis case caused by Asian genotype of *Taenia solium* confirmed by mitochondrial DNA analysis. Journal of Clinical Microbiology **42**:3891-3893.

Anexo 1

La Teoría de Juegos se desarrolló en 1940 para analizar estrategias contrarias en juegos como el *poker* o el ajedrez. Más tarde, la aproximación se aplicó por los economistas a una variedad de problemas en economía de mercados y competencia entre negocios (Freeman y Herron, 2002). En la Teoría de Juegos una situación de “suma cero” (*zero sum*), es aquella en la que la ganancia del participante vencedor esta exactamente balanceada por la pérdida del otro participante, es decir, que si a la ganancia total de los participantes se le subtrae la pérdida total, el resultado será cero. Asimismo, situaciones contrarias en las que la suma total muestra que todos los participantes ganan o pierden se denominan cuya “suma no es cero” (*non zero sum*). Una matriz de recompensa muestra la recompensa que cada jugador recibirá al final del juego, la ganancia y pérdida dependerá de las acciones combinadas de todos los jugadores y se puede representar gráficamente como una matriz de 2 x 2 (Wikipedia on line).

Dilema del Prisionero

El modelo clásico del “Dilema del Prisionero” es un ejemplo de un sistema cuya suma no es cero, en el que se plantea el siguiente problema: 2 sospechosos (prisioneros) que han sido acusados como cómplices del mismo crimen son encerrados en celdas diferentes para su interrogatorio y la policía no tiene suficiente evidencia para sentenciarlos. El castigo que reciban dependerá de si cooperan entre ellos en mantener su inocencia o implicar al otro en el crimen (traición). Cada prisionero tiene que elegir su estrategia sin saber la elección del otro. Así, si uno confiesa y el otro guarda silencio, el que traiciona saldrá libre en breve tiempo mientras que su compañero pasará 10 años en la cárcel; si ambos permanecen en silencio (cooperan) pasarán en la cárcel seis

meses por un delito menor y si ambos confiesan culpando al otro del crimen, ambos pasarán seis años en la cárcel. La matriz de recompensa sería:

		Acción del jugador B	
		Cooperación	Traición
Acción del jugador A	Cooperación	R. Recompensa por cooperación: ambos reciben penas ligeras de 6 meses (3,3)	S¹. El que recibe una sentencia larga de 10 años si es traicionado (0,5)
	Traición	T. Tentación: sentencia reducida o liberación inmediata para el traidor (5,0)	P¹. Castigo por traición mutua: ambos reciben sentencias intermedias de 6 años (1,1)

Se emplea la nomenclatura de Axelrod y Hamilton (1981). Las iniciales S y P vienen de las palabras inglesas *sucker* y *punish*. En paréntesis se marcan valores arbitrarios relativos a la recompensa o ganancia de acuerdo a la estrategia seleccionada.

El beneficio individual del jugador A puede escribirse: $T > R > P > S$ y $R > (S + T)/2$. La mayor recompensa en el juego surge cuando los jugadores A y B cooperan manteniendo el silencio, pero al jugador A le va mejor cuando A traiciona y B coopera. Cuando los jugadores A y B interactúan sólo una vez, la mejor estrategia para cada jugador es traicionar (Freeman y Herron, 2002; Wikipedia on line).

Juego de la Gallina

El sistema de este juego, cuya suma no es cero, consiste en no perder ya que nadie gana. Una metáfora de esto se ilustra cuando dos jugadores manejan sus automóviles uno contra el otro, perdiendo el primero que para evitar el choque vira su carro y es señalado como “gallina”. Debido a que la pérdida de “virar” resulta trivial comparada al choque de frente que ocurriría si ambos “continúan” y no viran, supone que la estrategia razonable sería virar antes de chocar. La matriz en este juego sería:

		Acción del jugador B	
		Vira	Continúa
Acción del jugador A	Vira	Ninguno pierde (0,0)	El jugador A es tachado de gallina (-1,+1)
	Continúa	El jugador B es tachado de gallina (+1,-1)	Ambos jugadores mueren en el choque (-20,-20)

En paréntesis se marcan valores arbitrarios relativos sobre las posibles pérdidas de los jugadores según la estrategia seleccionada.

El juego de la gallina también se conoce como el juego del halcón y la paloma. En este sistema biológico dos jugadores pueden escoger dos estrategias con la finalidad de determinar como compartir un recurso en común: pueden elegir si actúan como un halcón agresivo o como una paloma pacífica. Si ambos jugadores seleccionan el papel de halcón, ambos lucharán y se dañarán, si solo uno escoge el papel de halcón y el otro el de paloma, el halcón vencerá a la paloma. Si ambos jugadores juegan como palomas, habrá un empate hacia beneficio, pero este beneficio es más bajo que la recompensa bajo un papel de halcón. En este sistema biológico la estrategia del juego de halcón o paloma es análoga a cooperar o huir respectivamente (Wikipedia on line).

Como las dan las tomo

Axelrod y Hamilton (1981) y Dugatkin (1998) sugirieron que durante la reproducción de algunos peces serránidos (espinocillos) y guppies se puede llevar a cabo una solución “Como las dan las tomo” o TFT (de sus siglas en inglés *tit for tat*) para sus interacciones. Un individuo jugando TFT comienza cooperando, luego simplemente hace aquello que hizo su oponente en la ronda anterior. Esta estrategia tiene tres características

importantes: (1) Nunca es la primera en traicionar, (2) es provocada como represalia directa a la traición y (3) está dispuesta a cooperar inmediatamente después de una represalia por traición. Para analizar los resultados de juegos como los anteriores, se emplea el concepto de estrategia evolutivamente estable (EEE). Una estrategia es una EEE si una población de individuos que la usan no puede ser invadida por un mutante raro que adopte otra estrategia. Axelroad y Hamilton además mostraron que la TFT es una EEE con respecto a otras estrategias empleadas. Sus resultados ofrecen una explicación para la evolución del comportamiento cooperativo en individuos no relacionados (Freeman y Herron, 2002).

ANEXO 2

Artículos publicados derivados de la presente tesis:

Maravilla, P., V. Souza, A. Valera, M. Romero-Valdovinos, Y. López-Vidal, J.L. Domínguez-Alpizar, J. Ambrosio, S. Kawa y A. Flisser. (2003). Detection of genetic variation in *Taenia solium*. *Journal of Parasitology*, **89**: 1250-1254.

Maravilla P., A. Valera, V. Souza, M. Martínez-Gordillo y A. Flisser. (2003). Isozyme analysis of *Taenia solium* isolates from Mexico and Colombia. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **98**: 1049-1050.

of South America because they were introduced by slave transports from West Africa (Morgan et al., 2001). In capturing the new intermediate host snail *B. glabrata*, the parasites could have lost their original specificity.

This work was carried out at the Institute for Zoology, University Erlangen-Nuernberg, and it was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft and by the Egyptian Government with a grant within the Channel System for A.H.M.H.

LITERATURE CITED

- ADEMA, C. M., AND E. S. LOKER. 1997. Specificity and immunobiology of larval digenean-snail association. In *Advances in trematode biology*, B. Fried and T. K. Graczyk (eds.). CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 229–263.
- BASCH, P. F. 1976. Intermediate host specificity in *Schistosoma mansoni*. *Experimental Parasitology* **39**: 150–169.
- . 1991. *Schistosomes: Development, reproduction, and host relations*. Oxford University Press, New York, 248 p.
- BAYNE, C. J., U. K. HAHN, AND R. C. BENDER. 2001. Mechanisms of molluscan host resistance and of parasite strategies for survival. *Parasitology* **123**: S159–S167.
- COMBES, C., AND H. MONÉ. 1987. Possible mechanisms of the decoy effect in *Schistosoma mansoni* transmission. *International Journal for Parasitology* **17**: 971–975.
- HAAS, W., AND B. HABERL. 1997. Host recognition by trematode miracidia and cercariae. In *Advances in trematode biology*, B. Fried and T. K. Graczyk (eds.). CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 197–227.
- , ———, M. KALBE, AND M. KÖRNER. 1995. Snail-host finding by miracidia and cercariae: Chemical host cues. *Parasitology Today* **11**: 468–472.
- HABERL, B., AND W. HAAS. 1992. Miracidium of *Schistosoma mansoni*: A macromolecular glycoconjugate as signal for the behaviour after contact with the snail host. *Comparative Biochemistry and Physiology A* **101**: 329–333.
- , M. KALBE, H. FUCHS, M. STRÖBEL, G. SCHMALFUSS, AND W. HAAS. 1995. *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium*: Miracidial host-finding behavior is stimulated by macromolecules. *International Journal for Parasitology* **25**: 551–560.
- , M. KÖRNER, Y. SPENGLER, J. HERTEL, M. KALBE, AND W. HAAS. 2000. Host-finding in *Echinostoma caproni*: Miracidia and cercariae use different signals to identify the same snail species. *Parasitology* **120**: 479–486.
- KALBE, M., B. HABERL, AND W. HAAS. 1996. *Schistosoma mansoni* miracidial host-finding: Species specificity of an Egyptian strain. *Parasitology Research* **82**: 8–13.
- , ———, AND ———. 1997. Miracidial host-finding in *Fasciola hepatica* and *Trichobilharzia ocellata* is stimulated by species-specific glycoconjugates released from the host snails. *Parasitology Research* **83**: 806–812.
- , ———, AND ———. 2000. Snail host finding by *Fasciola hepatica* and *Trichobilharzia ocellata*: Compound analysis of “miracidia attracting glycoproteins.” *Experimental Parasitology* **96**: 231–242.
- KOCK, S. 2001. Investigations of intermediate host specificity help to elucidate the taxonomic status of *Trichobilharzia ocellata* (Digenea: Schistosomatidae). *Parasitology* **123**: 67–70.
- MONSIGNY, M., C. PETIT, AND A. C. ROCHE. 1988. Colorimetric determination of neutral sugars by a resorcinol sulphuric acid micro-method. *Analytical Biochemistry* **175**: 525–530.
- MORGAN, J. A. J., R. J. DEJONG, S. D. SNYDER, G. M. MKOJI, AND E. S. LOKER. 2001. *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria*: Past history and future trends. *Parasitology* **123**: S211–S228.
- SAPP, K. K., AND E. S. LOKER. 2000. Mechanisms underlying digenean-snail specificity: Role of miracidial attachment and host plasma factors. *Journal of Parasitology* **86**: 1012–1019.
- WRIGHT, C. A. 1971. *Flukes and snails*. Georg Allen & Unwin Ltd., Plymouth, U.K., 168 p.

Detection of Genetic Variation in *Taenia solium*

Pablo Maravilla*§, Valeria Souza†, Aldo Valera†, Mirza Romero-Valdovinos*, Yolanda Lopez-Vidal§, Jose Luis Dominguez-Alpizar‡, Javier Ambrosio§, Simon Kawa*, and Ana Flisser*§||, §Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico, DF, Mexico; *Dirección de Investigación, Hospital General “Dr. Manuel Gea González,” SSA, 11400 Mexico, DF, Mexico; †Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico, DF, Mexico; ‡Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, 97100 Merida, Yucatán, Mexico; ||To whom correspondence should be addressed. e-mail: flisser@servidor.unam.mx

ABSTRACT: Genetic variability among *Taenia solium* isolates was studied in 160 cysticerci from 6 pigs, 4 from Mexico, 1 from Honduras, and 1 from Tanzania. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis performed with 4 commercial primers showed 88% polymorphic loci and an average heterozygosity of 0.077; however, several alleles were fixed within each isolate. Linkage disequilibrium analysis indicated that 3 of the 6 isolates had a random association of alleles, whereas the other 3 had a clonal structure. These results suggest the existence of local lineages in *T. solium*, with events of genetic recombination within them.

Little is known about the evolution, ecology, and population genetics of cestodes. Thompson and Lymbery (1995) suggested that knowledge of the genetic structure of cestodes can be applied to the epidemiology and the control of these parasites because genetic variation within and between populations determines future evolutionary changes, genetic differentiation, and speciation. Polymerase chain reaction (PCR)-based molecular techniques such as random amplified polymorphic DNA (RAPD) have been used for differential diagnosis of species and strains and to gain knowledge of genetic diversity in parasite populations (Si-

les-Lucas et al., 1993; Král'ová, 1996; Brouwer et al., 2001; Eom et al., 2002). To study genetic variability within and among *Taenia solium* isolates as well as to evaluate genetic relationships between them, genomic DNA from cysticerci of this cestode was analyzed individually by RAPD.

Cysticerci from 6 pigs were evaluated in this study. Three pigs were acquired from the central states of Mexico: 1 in November 1997 from Guerrero (isolate a) and the other 2 in March and September 1998 from a village in Morelos (isolates b and c); the 4th pig came from the southeastern state of Yucatán in March 2001 (isolate d), the 5th pig was obtained from central Honduras in August 2001 (isolate e), and the last pig (isolate f) from Arusha, Tanzania, Africa, in August 2002. Thirty *T. solium* cysticerci were recovered from the skeletal muscle of each pig, rinsed with 0.01 M phosphate-buffered 0.15 M saline, pH 7.2 (PBS), dried over filter paper, and frozen (–70 °C) individually. Ten cysticerci from the Tanzanian pig were preserved in 96% ethanol. Each tissue cyst was homogenized with 100 µl DNazol isolation reagent (Life Technologies, Grand Island, New York) and centrifuged in an Eppendorf microfuge at 14,000 rpm for 10 min at 4 °C, and the viscous supernatant was transferred to a fresh tube. Genomic DNA was precip-

itated with isopropanol, centrifuged, and resuspended in 30–50 μ l of 8 mM NaOH. To obtain DNA from ethanol-fixed Tanzanian cysticerci, the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, Madison, Wisconsin) was used according to the protocol recommended by the supplier. DNA concentrations were determined spectrophotometrically in a Gene Quant ribonucleic acid–DNA calculator (Pharmacia® Buckinghamshire, U.K.).

All DNA samples were kept individually frozen and used to obtain the amplification products by RAPD assay. The protocol of Williams et al. (1990), modified by Siles-Lucas et al. (1993), was followed. The primers chosen from the series Operon B (Operon Technologies Inc., Alameda, California) were 5'-CATCCCCCTG (OPB3), 5'-GTA-GACCCGT (OPB11), 5'-TCCGCTCTGG (OPB14), or 5'-CCACA-GCAGT (OPB18). Assays were performed with 20 ng of genomic DNA. Reactions were carried out in a Perkin–Elmer thermal cycler (GeneAmp PCR System 2400) programmed for 45 cycles of 2 min at 94 C, 1 min at 36 C, and 2 min at 72 C. DNA products were separated by agarose gel electrophoresis, observed on a UV transilluminator, and photodocumented in a video system (Chemi System, UVP Bioimaging Systems, Upland, California). RAPD banding patterns were classified as nonpolymorphic or polymorphic (Hadrys et al., 1992; Král'ová and Špakulová, 1996). Because this technique does not allow for the direct estimation of allele frequencies, the following was assumed: (1) each band represents a distinct genetic locus; (2) each band represents the dominant allele of a locus; and (3) the absence of a specific band in another individual corresponds to the homozygous recessive allele according to Hardy–Weinberg proportions (Brouwer et al., 2001; Fonseca et al., 2001; Yue et al., 2002).

RAPD banding profiles were analyzed for all 160 cysticerci by LabWorks Analysis Software 3.0.02 (Corporate HQ, UVP Inc., Upland, California), whereby a value of 1 (present) or 2 (absent) was assigned to each fragment. RAPD bands larger than 1,500 bp were excluded because they could be due to more than 1 PCR product. To assure reproducibility of amplification, RAPD of each cysticercus with polymorphic bands was repeated once or twice. Controls without DNA as well as DNA from pork meat were evaluated using the same methodology. The proportion of polymorphic alleles, the mean heterozygosity, Nei genetic distances D (Nei, 1972), and the unweighted pair-group method with arithmetic averages (UPGMA) dendrogram were obtained using the Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA) program (Miller, 1997). To determine the extent to which isolates exhibited non-random association of alleles, a multilocus index was used on the basis of the distribution of allelic mismatches between pairs of individuals over all alleles. By this procedure, the ratio of the variance in mismatches observed in a population (V_0) to the expected variance in a corresponding population, i.e., random association of alleles due to mixis (V_E), provides a measure of multilocus linkage disequilibrium. $V_0/V_E = 1$ indicates free recombination and no linkage disequilibrium. When V_0/V_E is significantly higher than 1, alleles are associated in a non-random way, and no recombination (clonal structure) or selection to a certain combination of alleles is suspected (Souza et al., 1992; Silva et al., 1999). To assess the probability of rejecting the null hypothesis (recombination), the distribution of V_0/V_E was obtained by performing 10,000 iterations using the Monte Carlo procedure (LDV program, Souza et al., 1992).

The primers chosen allowed an evaluation of 49 loci, of which 88% were polymorphic with an average heterozygosity of 0.077. Primer OPB 3 gave 3 nonpolymorphic loci (5, 7, and 9) and 13 polymorphic loci. Loci 13 (525 bp) and 15 (400 bp) had fixed dominant alleles only for isolate a, whereas locus 2 (1,425 bp) had a fixed dominant allele for isolate c. OPB 11 presented locus 24 (636 bp) as nonpolymorphic and 14 polymorphic loci, whereas only isolate c showed 1 fixed dominant allele for locus 18 (1,230 bp) and 1 for locus 31 (161 bp). OPB 14 showed 7 polymorphic loci, where all cysticerci from each isolate had several fixed alleles. OPB 18 displayed 2 nonpolymorphic loci (42 and 48) and 9 polymorphic loci. (Table I).

Isolate a (from Guerrero) presented a proportion of 0.245 polymorphic loci, a mean heterozygosity of 0.107 and a V_0-V_E ratio of 1.375. Isolates b and c (from Morelos) gave values of 0.122 and 0.184 of polymorphic loci, mean heterozygosity values of 0.052 and 0.068, and V_0/V_E ratios of 1.475 and 1.119, respectively. Isolate d (from Yucatan) showed a proportion of polymorphic loci of 0.204, a mean heterozygosity of 0.070, and a V_0-V_E ratio of 1.301. Isolate e (from Honduras)

exhibited values of polymorphic loci of 0.204, a mean heterozygosity of 0.063, and a V_0-V_E ratio of 1.112. Finally, isolate f (from Tanzania) presented a proportion of 0.305 polymorphic loci, a mean heterozygosity of 0.103, and a V_0-V_E ratio of 1.195.

The distribution of V_0-V_E by the Monte Carlo procedure for isolates a, d, and e gave a P value of <0.001, suggesting a clonal structure, whereas for isolates b, c, and f no statistical significance was found, indicating that linkage disequilibrium was not present, and, therefore, individuals had genetic events of recombination with random mixis. The genetic relationship between the 160 cysticerci from the 6 isolates based on the 49 loci defined in Table I is estimated in a UPGMA dendrogram (Fig. 1). The initial divisions of the dendrogram were at 0.47 D units, separating the isolates into 2 clades, one clustering isolates b, d, e, and f and the other clustering isolates a and c. Subsequent divisions were present at 0.39 and 0.30 units of D , the first one separated the African isolate (f) from isolates b, d, and e, whereas the other one separated isolates a and c into 2 clusters. Finally, at 0.26 units of D , 2 groups were subsequently divided: isolate e from the Honduras and 16 cysticerci from isolate d in 1 cluster and isolate b and the remaining 14 cysticerci from isolate d in another cluster. This last result is not due to experimental error because all cysticerci from group d, as all others, were processed and submitted to PCR at one time. Besides, this last cluster was interesting because, added to the shared genetic information, it contained 13 identical cysticerci for isolate b.

There are few studies that deal with genetic diversity within *T. solium*. McManus et al. (1989), while assaying methods for egg detection by DNA dot-blot hybridization, reported that intraspecific DNA variability occurs in *T. solium* isolates from India, Mexico, and Zimbabwe. However, their work did not search for strains and did not evaluate heterozygosity. In another article, Bowles and McManus (1994) studied sequence variation within a 366-nucleotide portion of DNA coding for mitochondrial cytochrome *c* oxidase I (COI) from *T. solium* isolates recovered from India, China, and Zimbabwe and found slight differences in 3 conservative changes in the third base position of codons of the isolate from Zimbabwe. Hancock et al. (2001) examined the genetic variability in *T. solium* by sequencing the DNA coding for COI, the internal transcribed spacer 1 (ITS1), and the diagnostic antigen Ts 14 and found low variability. Recently, Nakao et al. (2002) sequenced the entire COI and cytochrome *b* from 13 isolates of *T. solium* from various regions, detecting 1.7 and 2.9% variant nucleotide positions, respectively, among all isolates. The phylogenies obtained showed that the isolates from Asia (China, India, Irian Jaya, and Thailand) formed a single cluster, whereas the isolates from Latin America (Bolivia, Brazil, Ecuador, Mexico, and Peru) combined with those from Africa (Cameroun, Mozambique, and Tanzania) formed a second cluster. In the present study, RAPD was chosen because it permits the analysis of a large number of loci throughout the entire genome. In addition, it has proven useful in characterizing both inter- and intraspecific relationships as well as in identifying strains and species in several organisms, including cestodes and trematodes (Siles-Lucas et al., 1993; Verneau et al., 1995; Král'ová, 1996; Brouwer et al., 2001; Eom et al., 2002). RAPD data presented in this study revealed variations among and within isolates, with several fixed alleles in each isolate. These features may have important epidemiological implications in defining parasite developmental rate, pathogenesis, or drug susceptibility, for example. Such was the case in *Echinococcus granulosus*, where the knowledge of variation in populations of this parasite contributed to the identification of distinct strains and the elucidation of transmission patterns useful in epidemiological studies (Thompson and Lymbery, 1995). Regarding heterozygosity values, our data are in accordance with those found within parasite populations using RAPD. *Schistosoma hematobium* exhibited a mean heterozygosity of 0.110 (53 loci), 41% of which were polymorphic (Brouwer et al., 2001), whereas *T. solium* exhibited a mean heterozygosity from 0.052 to 0.107 (49 loci), where 12–30% were polymorphic. The RAPD analysis showed that isolates a (Guerrero), d (Yucatan), and e (Honduras) have a clonal structure based on significant linkage disequilibrium, whereas isolates from Morelos (b and c) and Tanzania (f) suggest a more random association of alleles. The latter are in agreement with those of Nakao et al. (2002) described above.

Genomic and mitochondrial (mt) DNA was probably present in our samples because of the extraction methods used. Hancock et al. (2001) reported variation in the ITS1 sequence and minimal variation in the genes encoding COI (mtDNA) and the diagnostic antigen Ts 14. This



FIGURE 1. Dendrogram generated by the distance method, UPGMA. Nei's genetic distances (D units) were estimated using the data from the 49 loci from Table I and include all 160 cysticercci analyzed from 6 *Taenia solium* isolates.

information allowed Hancock to conclude that strain variation does not play a role in the variation in disease presentation and that minimal genetic diversity exists within the *T. solium* species where populations within limited geographic areas are homogeneous. Our results and the variation found in ITS1 point to the existence of genetic variation; there-

fore, the conclusions of Hancock stated above should be reevaluated. As demonstrated elsewhere, in some natural populations of *E. granulosus* (Thompson and Lymbery, 1995), this variation can be the result of self or cross-fertilization between adult parasites. Our data suggest that *T. solium* has local lineages or descendant lines with different char-

TABLE I. Single-locus diversity obtained from RAPD analysis of 6 *Taenia solium* isolates.

Primer used	Locus no.	Size (bp)	Allele frequencies*					
			Isolate a	Isolate b	Isolate c	Isolate d	Isolate e	Isolate f
OPB3	1	1,480	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000
	2	1,425	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000
	3	1,400	0.483	0.000	1.000	0.000	0.000	0.684
	4	1,200	0.000	0.000	0.087	0.000	0.016	0.051
	5	1,183	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	6	1,117	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000
	7	1,022	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	8	850	0.000	0.000	0.000	0.105	0.087	0.051
	9	825	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	10	688	1.000	1.000	1.000	0.316	0.452	0.684
	11	650	1.000	1.000	0.000	0.204	0.422	0.051
	12	570	0.683	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	13	525	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	14	471	0.552	0.000	0.483	0.000	0.000	0.452
	15	400	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
OPB11	16	350	0.552	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
	17	1,500	0.517	0.000	0.591	0.000	0.000	0.000
	18	1,230	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000
	19	1,040	1.000	1.000	1.000	0.817	1.000	1.000
	20	900	0.000	0.000	0.000	0.000	0.051	0.000
	21	845	1.000	0.000	1.000	0.225	0.591	0.000
	22	770	0.000	0.000	0.143	0.000	0.000	0.000
	23	693	0.143	0.000	1.000	1.000	1.000	0.000
	24	636	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	25	545	1.000	0.000	0.163	0.000	0.000	0.000
	26	520	0.367	0.000	0.517	0.000	0.000	0.293
	27	482	1.000	0.741	1.000	0.817	0.817	0.684
	28	417	1.000	0.000	1.000	0.016	0.000	1.000
	29	375	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000
	30	182	1.000	0.741	1.000	0.000	0.000	1.000
OPB14	31	161	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000
	32	1,500	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000
	33	1,300	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.684
	34	900	1.000	0.634	1.000	1.000	1.000	0.684
	35	645	1.000	1.000	1.000	0.741	1.000	1.000
	36	530	0.517	0.204	0.341	0.016	0.051	0.684
	37	500	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.293
OPB18	38	445	0.000	0.552	0.000	0.000	0.000	0.225
	39	1,500	0.051	0.000	0.000	0.000	0.483	0.000
	40	1,250	0.422	0.422	0.394	0.517	0.817	1.000
	41	1,100	0.000	0.000	0.000	0.000	0.069	0.000
	42	915	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	43	783	0.394	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	44	695	0.483	0.000	0.163	0.000	0.000	1.000
	45	525	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.293
	46	477	1.000	1.000	1.000	0.817	1.000	1.000
	47	393	1.000	1.000	1.000	0.817	1.000	0.051
	48	352	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	49	215	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	1.000

* Data obtained using TFPGA software by Miller (1997).

acteristics because the hermaphrodite worm in its definitive host has undergone genetic drift and inbreeding effects and has therefore fixed several alleles. Furthermore, this parasite could maintain and inherit a polymorphic genetic pool generated by sexual reproduction, mutation, and occasionally by cross-fertilization between different adults.

This study was partly supported by grant 28094-B from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) and project 102344 from the Programa de Apoyo a Estudiantes de Posgrado (PAEP-UNAM). We thank Dante Zarlenga for critical comments to the man-

uscript and Claudia Silva, Alvaro Peniche, and Gumersindo Sánchez for help in the laboratory.

LITERATURE CITED

- BOWLES, J., AND D. P. MCMANUS. 1994. Genetic characterization of the Asian *Taenia* a newly described taeniid cestode of humans. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **50**: 33–44.
- BROUWER, K. C., P. NDHLOVU, A. MUNATSI, AND C. SHIFF. 2001. Genetic

- diversity of a population of *Schistosoma haematobium* derived from schoolchildren in East Central Zimbabwe. *Journal of Parasitology* **87**: 762–769.
- EOM, K. S., H. K. JEON, Y. KONG, U. W. HWANG, X. LI, L. XU, Z. FENG, Z. S. PAWLOWSKI, AND H. J. RIM. 2002. Identification of *Taenia asiatica* in China: Molecular, morphological, and epidemiological analysis of a Luzhai isolate. *Journal of Parasitology* **88**: 758–764.
- FONSECA, D., S. CAMPBELL, W. CRANS, M. MOGI, I. MIYAGI, T. TOMA, M. BULLIANS, T. G. ANDREADIS, R. L. BERRY, B. PAGAC, M. R. SARDELIS, AND R. C. WILKERSON. 2001. *Aedes (Finlaya) japonicus* (Diptera: Culicidae), a newly recognized mosquito in the United States: Analyses of genetic variation in the United States and putative source populations. *Journal of Medical Entomology* **38**: 135–146.
- HADRYN, H., M. BALIK, AND B. SCHIERWATER. 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* **47**: 55–63.
- HANCOCK, K., D. E. BROUGHEL, I. N. S. MOURA, A. KHAN, N. J. PIENIAZEK, A. E. GONZALEZ, H. H. GARCÍA, R. H. GILLMAN, AND V. C. W. TSANG. 2001. Sequence variation in the cytochrome oxidase I, internal transcribed spacer 1, and Ts 14 diagnostic antigen sequences of *Taenia solium* isolates from South and Central America, India, and Asia. *International Journal for Parasitology* **31**: 1601–1607.
- KRÁL'OVÁ, I. 1996. A total DNA characterization in *Proteocephalus exiguus* and *P. percae* (Cestoda: Proteocephalidae): Random amplified polymorphic DNA and hybridization techniques. *Parasitology Research* **82**: 668–671.
- KRÁL'OVÁ, I., AND M. ŠPAKULOVÁ. 1996. Intraspecific variability of *Proteocephalus exiguus* La Rue, 1911 (Cestoda: Proteocephalidae) as studied by the random amplified polymorphic DNA method. *Parasitology Research* **82**: 542–545.
- MCMANUS, D. P., E. GARCIA-ZEPEDA, A. REID, A. K. RISHI, AND A. FLISSER. 1989. Human cysticercosis and taeniosis: Molecular approaches for specific diagnosis and parasite identification. *Acta Leidensia* **57**: 81–91.
- MILLER, M. P. 1997. Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3. A windows program for the analysis of allozyme and population genetic data. Computer software distributed by the author, Northern Arizona University, Flagstaff, Arizona.
- NAKAO, M., M. OKAMOTO, Y. SAKO, H. YAMASAKI, K. NAKAYA, AND A. ITO. 2002. A phylogenetic hypothesis for the distribution of two genotypes of the pig tapeworm *Taenia solium* worldwide. *Parasitology* **124**: 657–662.
- NEI, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* **106**: 283–292.
- SILES-LUCAS, M., C. CUESTA-BANDERA, AND M. CESAR-BENITO. 1993. Random amplified polymorphic DNA technique for speciation studies of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology Research* **79**: 343–345.
- SILVA, C., L. E. EGUIARTE, AND V. SOUZA. 1999. Reticulated and epidemic population genetic structure of *Rhizobium etli* biovar *phaseoli* in a traditionally managed locality in Mexico. *Molecular Ecology* **8**: 227–287.
- SOUZA, V., T. T. NGUYEN, R. R. HUDSON, D. PIÑERO, AND R. E. LENSKI. 1992. Hierarchical analysis of linkage disequilibrium in *Rhizobium* populations: Evidence for localized sex? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 8389–8393.
- THOMPSON, R. C. A., AND A. J. LYMBERY. 1995. *Echinococcus* and hydatid disease. CAB International, Wallingford, U.K., 477 p.
- VERNEAU, O., F. THOMAS, A. M. F. CATZELIS, AND F. RENAUD. 1995. Evidence of two genetic entities in *Bothriocephalus funiculus* (cestoda) detected by arbitrary-primer polymerase chain reaction random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Parasitology Research* **81**: 591–594.
- WILLIAMS, J. G. K., A. R. KUBELIK, K. J. LIVAK, J. A. RAFALSKI, AND S. V. TINGEY. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**: 6531–6535.
- YUE, G., Y. LI, F. CHEN, S. CHO, C. L. LIM, AND L. ORBAN. 2002. Comparison of three DNA marker systems for assessing genetic diversity in Asian arowana (*Scleropages formosus*). *Electrophoresis* **23**: 1025–1032.

Identification of Assemblage A *Giardia* in White-Tailed Deer

J. M. Trout, M. Santin, and R. Fayer, Environmental Microbial Safety Laboratory, Animal and Natural Resources Institute, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, Beltsville, Maryland 20705. e-mail: jtrout@anri.barc.usda.gov

ABSTRACT: Fecal samples were collected from hunter-killed white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) during a managed hunt in a central Maryland county. Fecal samples were cleaned of debris and concentrated by CsCl density gradient centrifugation and stained with Mer-IFluor[®] reagents. Stained samples were examined by fluorescent microscopy for the presence of *Giardia* sp. cysts. One of 26 samples was found to be positive for *Giardia* sp. Polymerase chain reaction amplification using primers directed to the β -giardin and TPI genes identified the same sample as the only positive one. Sequencing of the β -giardin and TPI genes revealed that the *Giardia* sp. belonged to assemblage A, a genotype infectious for humans and also reported in a small percentage of cattle. This is the first report of assemblage A *Giardia* sp. in deer and suggests that deer could be a potential source of infectious cysts for humans and cattle.

Giardia spp. are well-recognized intestinal parasites of animals and humans, capable of causing a variety of symptoms including diarrhea and malabsorption of nutrients. *Giardia duodenalis* (syn. *intestinalis*, *lamblia*) infects a wide range of mammalian hosts, but recently molecular analysis has allowed the subtyping of this group into a number of genotypes. Typically, only genotypes in assemblages A and B are found in human infections (Thompson et al., 2000). *Giardia* sp. has been

reported in elk (*Elaphus nonnodes*) (Deng and Cliver, 1999; Heitman et al., 2002), roe deer (*Capreolus capreolus*) (Pavlašek et al., 1993), free-ranging white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) (Rickard et al., 1999), and moose (*Alces alces*) (Heitman et al., 2002). However, these studies did not indicate the *Giardia* sp. genotype, thus it was not clear whether *Giardia* sp. of cervid origin had the potential to infect humans. The present study was conducted to examine the genotypes of *Giardia* sp. present in free-ranging white-tailed deer.

Deer feces were collected from hunter-killed animals during a managed deer hunt in central Maryland. The hunt was conducted under the supervision of county officials as part of a wildlife management program. Age and sex data were recorded for each animal sampled. Fifteen grams of feces were weighed and placed in a 50-ml tube, and water was added to bring the total volume to 50 ml. Feces and water were mixed well, and the suspension was passed through a 45- μ m screen. The screened material was centrifuged at 1,500 g for 10 min. The supernatant was discarded and the pellets resuspended in 25 ml of dH₂O. Twenty-five ml of CsCl (density = 1.4 g/L) was added to each sample and mixed well, and the tubes were centrifuged for 20 min at 500 g. After centrifugation, the top 4 ml of the solution was removed from each tube and placed in 15-ml tubes. Eleven ml of dH₂O was added and mixed well, and the tubes were centrifuged at 1,500 g for 10 min.

SHORT COMMUNICATION

Isozyme Analysis of *Taenia solium* Isolates from Mexico and Colombia

Pablo Maravilla^{*/}, Aldo Valera^{**}, Valeria Souza^{**}, Mario Martinez-Gordillo^{***}, Ana Flisser^{*/⁺}

Hospital General "Dr. Manuel Gea Gonzalez", 14400 México DF, México ^{*}Facultad de Medicina ^{**}Instituto de Ecología, UNAM, México ^{***}Instituto Nacional de Pediatría, México DF, México

Mexican and Colombian Taenia solium cysticerci and some species of Taenia adults were assayed using cellulose acetate electrophoresis to distinguish between isolates. Isozyme patterns for ARK, GOT, G3PD, GPI, and MPI were identical in all cysticerci suggesting homozygotic profiles. G6PD and MDH showed different patterns between Mexican and Colombian cysticerci, suggesting regional differences. ME activity was mainly detected in the adult stage suggesting that this enzyme is active in anaerobic environment, while MDH, detected in cysticerci, could be related to an environment that contains oxygen. Finally, the species of taeniid adults analyzed showed different patterns among them.

Key words: *Taenia solium* - isozymes - cysticerci - Mexico - Colombia

Taeniosis and cysticercosis are two diseases caused by the cestode *Taenia solium*. Thompson and Lymbery (1995) argue that knowledge of genetic structure of cestodes can be applied to the epidemiology and the control of these parasites, because genetic variation within and between populations, determines future evolutionary changes, genetic differentiation, and speciation. In order to distinguish within isolates from *T. solium*, isozyme electrophoresis analysis was performed in parasites recovered from Mexico and Colombia, and in adult tapeworms.

Ten *T. solium* cysticerci were excised from each of seven naturally infected pigs from central states of Mexico and one pig from Colombia, parasites were washed with 0.01 M phosphate-buffered 0.15 M saline, pH 7.2 (PBS), dried over filter paper, frozen (-70°C) and individually analyzed for isozymes. Mexican immature proglottids of *T. solium* and *T. saginata* adult worms from human hosts recovered prior to cestocidal treatment were frozen and similarly analyzed. Immature proglottids from *Taenia taeniaeformis* recovered from experimental cat infections were also used. Cellulose acetate (CA) electrophoresis of enzymes was conducted according to the methods of Hebert and Beaton (1993) and Johnston and Fernando (1997). Eight isoenzymes were tested: ARK, EC. 2.7.3.3; G6PD, EC. 1.1.1.49; GPI, EC. 1.2.1.12; G3PD, EC. 1.2.1.12;

GOT, EC. 2.6.1.1; MDH, EC, 1.1.1.37; ME, EC. 1.1.1.40; MPI, EC. 5.3.1.8. Individual parasites were homogenized in an equal weight-volume ratio of distilled water and centrifuged in at 14,000 rpm for 15-30 s. Supernatants were chilled on ice and loaded onto Titan III 76x76 mm CA plates (Helena Laboratories, Beaumont, TX). Electrode buffers and electrophoresis conditions are outlined in the Table. One "hit" (~ 3 µl) per plate for each enzyme was delivered employing the Super Z-12 applicator kit (Helena Laboratories, Beaumont, TX). Soluble meat extracts from a healthy pig were used as control.

The electrophoretic mobility of G6PD, GPI, GOT, ARK, and G3PD from all cysticerci recovered from the isolates showed only one band of activity, MDH and ME (only for *T. solium* adult) showed 2 bands and MPI presented 3 bands making a total of 10 putative alleles. Enzyme mobility was the same for Mexican and Colombian cysticerci, except for GPI and MDH that were slightly faster with Colombian than Mexican cysticerci (Fig. 1A). Each *Taenia* species tapeworm tested showed its own enzyme pattern, being clearly distinct for GPI, ME (data not shown), and MPI (Fig. 1B). Activity of ME was observed in adult tapeworms but not in cysticerci, suggesting to be stage-specific. To confirm this observation, two other methods were used: isoelectrofocusing and spectrophotometry as described by Ponce-Macotela et al. (1993). The former confirmed this result, while the latter measured 4 times less activity in cysticerci than in adult parasites (0.122 vs 0.512 absorbance values at 570 nm using 20 mg/ml total protein in each extract), indicating that although there is some activity in cysticerci it is higher in adult worms. Isozyme profiles from cysticerci were different from those seen in pig meat (Fig. 1, lane 1) which confirms lack of meat contamination.

The trimeric pattern of GPI from *T. solium*, *T. saginata*, and *T. taeniaeformis* was according to profiles published by Le Riche and Sewell (1977) as well as Okamoto and

Financial partial support: grant 28094-B from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología and project 102344 from the Programa de Apoyo a Estudiantes de Posgrado.

⁺Corresponding author. Fax: +52-55-5623.2382. E-mail: flisser@servidor.unam.mx

Received 14 July 2003

Accepted 19 November 2003

TABLE
Electrophoresis conditions

Enzyme	Tank buffer	Time (min)	Volts
G6PD, MDH, G3PD	CAAPM ^a	120	38
GOT, GPI	TM ^b	120	38
ARK, ME, MPI	TM	20	170

^a: 0.22 M citric acid, 5% (v/v) 4-(3-aminopropyl) morpholine, pH 8.2; ^b: 0.25M TRIS, 0.05 M malic acid, pH 7.8

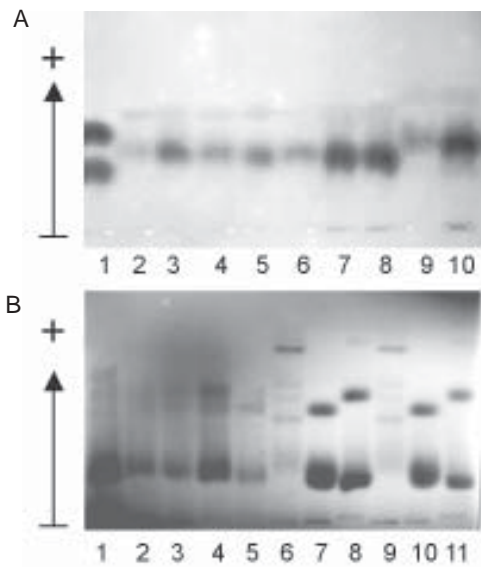


Fig. 1: isoenzyme patterns - A: MDH from Mexican cysticerici (lanes 2-8), and Colombian cysticerici (lanes 9-10); B: MPI from Mexican cysticerici (lanes 2-5) adult *Taenia taeniaeformis* (lanes 6 and 9), adult *T. solium* (lanes 7 and 10), and adult *T. saginata* (lanes 8 and 11). Swine muscle extract was analyzed in lanes 1.

colleagues (1995). Housekeeping enzymes, such as GPI, therefore, confer a phenotypic identity to each parasite, and could be used for differential diagnosis with modern molecular methods. Various enzymes have been tested in order to learn about evolution ecology and population genetics of cestodes (Okamoto et al. 1995, Siles-Lucas et

al. 1996, Turèková et al. 2003). In the present study no differences in the migration of 5 isoenzyme profiles (ARK, GOT, G3PD, GPI, and MPI) were found suggesting homozygotic profiles. On the other hand, the mobility of G6PD and MDH was slightly faster in Colombian than in Mexican cysticerici suggesting regional differences that have to be confirmed with a larger sample of cysticerici from Colombia or from other countries. The presence of detectable ME activity in the adult stage can be explained because this enzyme has high activity in anaerobic environment (like the intestinal lumen), while MDH, that was only detected in cysticerici, has better activity in an environment that contains oxygen (such as skeletal muscle, where the *T. solium* cysticerici develop); this feature could be exploited in studies focused for the treatment and control of this parasite.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Agustín Plancarte (UNAM) for *T. taeniaeformis* material and to Dr Laura Vargas-Parada (Hospital Gea) for critical comment on the manuscript.

REFERENCES

- Hebert PDN, Beaton MJ 1993. *Methodologies for Allozyme Analysis Using Cellulose Acetate Electrophoresis: A Practical Handbook*, Helena Laboratories, Beaumont, TX, 39 pp.
- Johnston DA, Fernando MA 1997. Isoenzymes of *Eimeria* from the domestic fowl: electrophoretic variants among species, strains and clones. *Parasitol Res* 83: 464-470.
- Le Riche PD, Sewell MMH 1977. Differentiation of *Taenia saginata* and *Taenia solium* by enzyme electrophoresis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 4: 327-328.
- Okamoto M, Ito A, Kurosawa T, Oku Y, Kamiya M, Agatsuma T 1995. Intraspecific variation of isoenzymes in *Taenia taeniaeformis*. *Int J Parasitol* 25: 221-228.
- Ponce-Macotela M, Martínez-Gordillo MN, Álvarez-Chacón R 1993. *Giardia duodenalis*: analysis of malic enzyme expression with isoelectric focusing. *Rev Invest Clin (Mexico)* 45: 371-374.
- Siles-Lucas M, Cesar-Benito M, Cuesta-Bandera C 1996. *Echinococcus granulosus*: genomic and isoenzymatic study of Spanish strains isolated from different intermediate hosts. *Vet Parasitol* 63: 273-282.
- Thompson RCA, Lymbery AJ 1995. *Echinococcus and Hydatid Disease*, CAB International, Wallingford, UK, 477 pp.
- Turèková L, Šnábel V, D'Amelio S, Busi M, Dubinský P 2003. Morphological and genetic characterization of *Echinococcus granulosus* in the Slovak Republic. *Acta Trop* 85: 223-229.