



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

VARIABILIDAD GENÉTICA ENTRE CISTICERCOS DE Taenia solium DE MÉXICO Y MADAGASCAR POR MEDIO DE RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA

T E S I S
Que para obtener el título de
B I Ó L O G O
P R E S E N T A:

RODRIGO RAFAEL VEGA BERNAL

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



DIRECTORA DE TESIS
Dra. Gladis del Carmen Fragoso González

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

México, D.F. 2002



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA**  
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

Variabilidad genética entre cisticercos de Taenia solium de México y  
Madagascar por medio de Random Amplified Polymorphic DNA

realizado por RODRIGO RAFAEL VEGA BERNAL

con número de cuenta 9853130.-7 , quién cubrió los créditos de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis	
Propietario	Dra. Gladis del Carmen Fragoso González
Propietario	Dra. Edda Lydia Sciutto Conde
Propietario	Dr. Daniel Piñero Dalmau
Suplente	Dra. Ingeborg Becker Fauser
Suplente	Dr. Guillermo Salgado Maldonado

*Juan Manuel Rodríguez Chávez*  
*Guillermo Salgado Maldonado*

*Guillermo Salgado Maldonado*

Consejo Departamental de BIOLOGIA

FACULTAD DE CIENCIAS  
U. N. A. M.

*Juan Manuel Rodríguez Chávez*  
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

**A mis padres José y Pilar**

**A mis hermanos Javier y Verónica**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia de aquí y de allá por toda su confianza e incondicional apoyo.

A mis queridos amigos de aquí Giuseppe Pasquetti, Andrés Lira, Yoshinori Nakasawa, Juan Pablo Rodríguez, Rodrigo Larrañaga, Alfredo Miguel, Adriana Macias, Julieta Jujnovsky y Mariana Nava, y de allá Ariel Salguero, Ana Sicardi y Alberto Geralnik por su constante motivación y por todos los buenos momentos que pasamos y pasaremos juntos.

A la Dra. Gladis Fragoso G. por todo el apoyo brindado, consejos, ayuda y por todo lo que aprendí realizando esta tesis.

A la Dra. Edda Sciutto C. por todo el entusiasmo y las oportunidades brindadas.

Al Dr. Daniel Piñero D. por su importantísima asesoría en el análisis poblacional y revisión de este trabajo.

A la Dra. Ingeborg Becker F. y al Dr. Guillermo Salgado M. por la revisión y comentarios sobre esta tesis.

A la M. en C. Bienvenue Ramanankandrasana quien me enseñó pacientemente la técnica utilizada en esta tesis.

Al Dr. Bernard Bouteille, al Dr. Michelle Dumas y al Dr. Carlos Larralde por sus consejos y comentarios sobre este trabajo.

A mis amigos del laboratorio Carmen Cruz, Mercedes Baca, Andrea Toledo, Anahí Chavarría, René Segura, Ernesto Acosta, Marisela Hernández, Gabriela Rosas, Nelly Villalobos, Mario Pérez, Brenda Sáenz, Elvira Salazar, Laura Cabello, y en especial a Gabriela Meneses y Constantino Beltrán por crear siempre un ambiente de trabajo más divertido.

El presente trabajo se realizó en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M., bajo la dirección de la Dra. Gladis del Carmen Fragozo González, con la asesoría de la M. en C. Bienvenue Ramanankandrasana, el Dr. Bernard Bouteille, el Dr. Michelle Dumas, el Dr. Daniel Piñero y la Dra. Edda Sciutto, y con el apoyo de CONACyT (Proyecto No. 31378-M), ANUIES CONACyT-ECOS (Proyecto No. M99-S03), DGAPA (Proyecto No. IN 220999) y PROBETEL.

# ÍNDICE

## Página

• <b>Resumen</b>	
• <b>Introducción</b>	1
- Cisticercosis y teniasis	2
- Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i>	3
- Clasificación y características morfológicas de <i>Taenia solium</i>	5
- Características de la parasitosis, factores de riesgo y manifestaciones clínicas	7
- Variabilidad genética y genética de poblaciones	12
- Variabilidad genética de parásitos	17
- Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)	19
• <b>Justificación</b>	26
• <b>Hipótesis</b>	28
• <b>Objetivos</b>	28
• <b>Metodología</b>	29
- Obtención de cisticercos	29
- Extracción de DNA y cuantificación	30
- Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)	33
- Electroforesis en geles de agarosa y fotografía	35
- Análisis de geles	36
- Análisis poblacionales	38
• <b>Resultados</b>	44
• <b>Discusión</b>	60
• <b>Conclusiones</b>	68
• <b>Perspectivas</b>	70
• <b>Apéndice</b>	71
• <b>Anexo 1</b>	79
• <b>Anexo 2</b>	87
• <b>Referencias</b>	92

## RESUMEN

La cisticercosis es una parasitosis causada por el metacéstodo de *Taenia solium*, el cisticerco. Es endémica en países de América Latina, África y Asia, y es un problema reemergente en países desarrollados. Existen diferentes manifestaciones de esta parasitosis en humanos: la neurocisticercosis (NC), en la que el metacéstodo se aloja en el sistema nervioso central, y la cisticercosis en otras regiones del cuerpo, como ojo, músculo esquelético, corazón o tejido subcutáneo (llamada cisticercosis subcutánea o CSC). En África y Asia se han registrado una gran cantidad de casos de NC y CSC tanto de manera conjunta como separada, mientras que en América Latina la CSC es una manifestación poco común o poco documentada. Las diferencias encontradas con respecto a la epidemiología en diferentes países pueden estar basadas en la diversidad genética del parásito de diferentes regiones. En el presente trabajo se pretende determinar si existen variaciones genéticas entre cisticercos de diferentes regiones de México, entre México y Madagascar, y entre cisticercos alojados en diferentes ubicaciones anatómicas del cerdo, el hospedero intermediario, por medio de Random Amplified Polymorphic DNA. Se evaluaron 35 cisticercos de la región central de México, 16 de la región sureste de México y 39 de Madagascar utilizando 9 oligonucleótidos. Los resultados mostraron una baja diversidad genética total y para las tres regiones estudiadas. Sin embargo, la diferenciación genética entre las tres regiones estudiadas fue alta. Los fenogramas creados por los métodos de UPGMA y Neighbor-Joining presentaron básicamente la misma topología. No se encontraron diferencias entre cisticercos alojados en tejido muscular y cerebral del hospedero intermediario pertenecientes a la misma región. En conclusión, las poblaciones de *T. solium* analizadas se encuentran bien diferenciadas y estructuradas genéticamente, pero presentan una baja variabilidad genética, lo cual es lo esperado en especies con reproducción por autofecundación y bajo flujo génico entre sus poblaciones. A pesar de la baja diversidad genética encontrada, la heterogeneidad epidemiológica podría estar ligada a estas variaciones y a las diferencias entre parásitos provenientes de distintos continentes.



## INTRODUCCIÓN

### Cisticercosis y teniasis

La cisticercosis (CC) humana es una parasitosis causada por el estado larvario de *Taenia solium*, el cisticerco, mientras que a la infección por el estado adulto se le conoce como teniasis y es una enfermedad conocida desde la antigüedad [Griesinger, 1862 en Sciutto *et al.*, 2000]. Esta parasitosis es prevalente en países de América Latina, África y Asia, y es un problema reemergente en países desarrollados. Los países de Europa Occidental progresivamente la controlaron y a principios de 1900s la erradicaron por medio del desarrollo social y el implemento de programas de inspección y confiscación de la carne de cerdo contaminada. Sin embargo, en la actualidad esta parasitosis se encuentra ampliamente distribuida en países no desarrollados en donde es capaz de completar su ciclo de vida. Además de afectar principalmente a las clases económicamente bajas, también amenaza a los sectores sociales privilegiados de países endémicos y recientemente incluso a los de países desarrollados debido a los fenómenos de migración [Sciutto *et al.*, 2000].

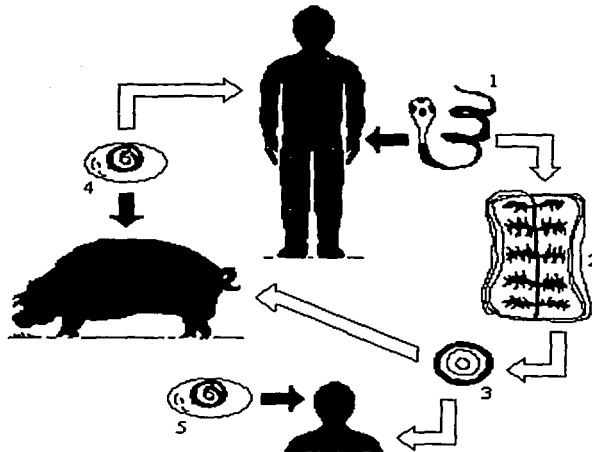
La comunidad científica de los países endémicos, entre ellos México, está consciente de la enfermedad causada por *T. solium* y ha contribuido de manera significativa para su descripción, manejo e investigación [Flisser y Lightowlers, 2001; Huerta *et al.*, 2001; García *et al.*, 2001; Toledo *et al.*, 2001; Sarti *et al.*, 2000; Correa *et al.*, 1999; Plancarte *et al.*, 1999; Rodríguez-Canul *et al.*, 1999; Sciutto *et*

*al.*, 1998; de Aluja *et al.*, 1998; Molinari *et al.*, 1997]. Asimismo, la reemergencia en países desarrollados de Europa y Estados Unidos de Norteamérica ha incrementado la preocupación médica y ha impulsado la investigación, principalmente porque reconocen que este parásito representa un problema de salud pública y tiene importantes repercusiones económicas [White, 2000; Pal *et al.*, 2000; Sciutto *et al.*, 2000; Schantz y McAuley, 1991; Hinz, 1991].

### Ciclo de vida de *Taenia solium*

El humano es el hospedero definitivo de *T. solium*, un gusano plano hermafrodita que se adhiere a la mucosa del primer tercio del intestino delgado. Al alcanzar la madurez sexual, entre 5 y 12 semanas después de que el humano ingirió el cisticerco, el parásito intestinal se reproduce por autofecundación formando una gran cantidad de huevos durante varios años, los cuales son liberados al ambiente por defecación. El cerdo, hospedero intermediario de este parásito, ingiere los huevos al consumir los desechos humanos contaminados, fenómeno que se presenta en lugares donde se practica el fecalismo al ras del suelo. Los huevos eclosionan al ser parcialmente digeridos en el estómago, liberando a las oncósferas. Éstas atraviesan la pared intestinal llegando al sistema de circulación sanguíneo y se establecen en músculo esquelético y en varios órganos (principalmente corazón, hígado y cerebro) en donde finalmente se desarrollan en el metacéstodo, el estado larvario de *T. solium*, conocido como cisticerco. El ciclo de vida se completa cuando el humano ingiere la carne de cerdo infectada con cisticercos, los cuales evaginan y se establecen en el

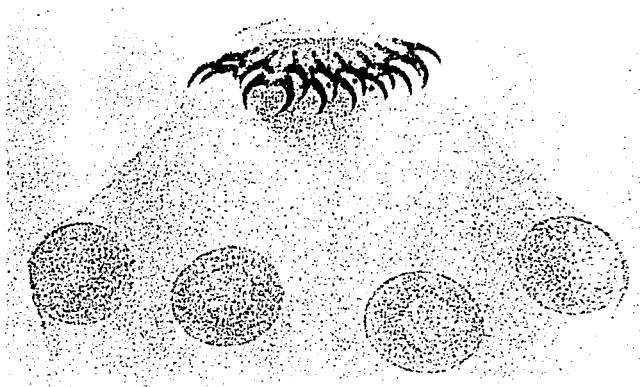
intestino, desarrollándose en el estado adulto o tenia. Ocasionalmente es el humano el que ingiere de manera accidental los huevos formados por el gusano adulto y estos se desarrollan, al igual que en el cerdo, en cisticercos al establecerse en diferentes órganos, causando así la cisticercosis humana (fig. 1) [Olsen, 1986; Cheng, 1986].



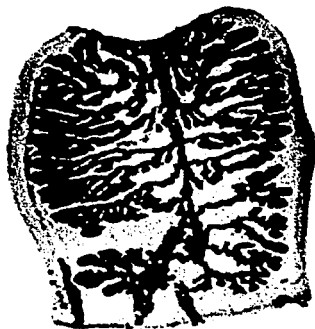
**Figura 1:** Ciclo de vida de *Taenia solium*. El humano es el hospedero definitivo y aloja al estado adulto o tenia (1), la cual, al alcanzar la madurez sexual, se reproduce formando una gran cantidad de huevos. Los huevos presentes en proglótidos grávidos (2) o individuales (3) son liberados al ambiente por defecación. El cerdo, hospedero intermediario, ingiere los alimentos contaminados con los huevos producidos por el estado adulto y éstos se desarrollan en el metacéstodo o larva, en este caso llamada cisticerco (4). El humano, al ingerir la carne de cerdo contaminada con cisticercos, desarrolla la tenia y el ciclo de vida se completa. La cisticercosis humana (5) ocurre accidentalmente cuando el humano ingiere los huevos producidos por la tenia, los cuales se desarrollan en cisticercos.

## Clasificación y características morfológicas de *Taenia solium*

*Taenia solium* pertenece taxonómicamente al Phylum Platyhelminthes o gusanos planos, a la Clase Cestoda, Orden Cyclophyllidea y comparte la Familia Taeniidae con otros céstodos como *Taenia crassiceps*, *Taenia saginata* y *Taenia ovis*. El parásito intestinal o estado adulto está conformado por un escólex no retráctil, con cuatro ventosas y una doble corona de 22 a 32 ganchos de 130 a 180  $\mu\text{m}$  llamada rostellum, característica de la especie (fig. 2). Además, presenta un estróbilo formado tanto por proglótidos inmaduros más cercanos al escólex como por proglótidos maduros más alejados. En general, el estróbilo puede alcanzar una longitud entre 1.8 y 3.0 m, sin embargo, existen reportes de una longitud de hasta 9 m. Cada proglótido cuenta con el aparato reproductor femenino y masculino, así como un único poro genital. Los proglótidos grávidos morfológicamente son más largos que anchos y presentan un útero típico de taeniidos con un tallo medio presentando de 7 a 13 ramificaciones [Schmidt y Roberts, 1996] (fig. 3). Los huevos de *T. solium* y *T. saginata* son indiferenciables entre sí, son redondos o subesféricos, con un diámetro que varía entre 31 a 43  $\mu\text{m}$  y presentan una cubierta gruesa de color marrón estriada de manera radial. Dentro de la cubierta se encuentra el embrión con 6 ganchos y por fuera presentan una membrana primaria que rodea a los huevos en los proglótidos (fig. 4).

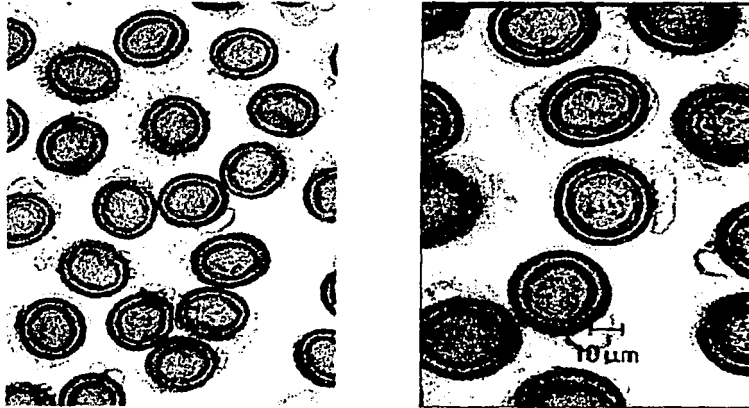


**Figura 2:** Escólex de *Taenia solium*. Pueden observarse las cuatro ventosas circulares y el rostellum conformado por dos hileras de ganchos. Fotografía tomada de [www.ksu.edu/parasitology/625tutorials/tapeworm13.html](http://www.ksu.edu/parasitology/625tutorials/tapeworm13.html).



**Figura 3:** Proglótido grávido de *Taenia solium*. La inyección con tinta de la India permite la visualización de las ramificaciones (entre 7 y 13). Es posible observar el poro genital en la posición media lateral. Fotografía tomada de [www.mc.maricopa.edu](http://www.mc.maricopa.edu).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 4:** Huevos de *Taenia* spp. Los huevos son redondos o subesféricos, su diámetro varía entre 31 y 43  $\mu\text{m}$  y presentan una cubierta gruesa de color marrón estriada radialmente. Dentro de la cubierta se encuentra el embrión con 6 ganchos y por fuera se presenta una membrana que rodea al huevo mientras éstos se encuentran en el proglótido. Fotografía tomada de [www.emedicine.com/neuro/topic654.htm](http://www.emedicine.com/neuro/topic654.htm).

#### Características de la parasitosis, factores de riesgo y manifestaciones clínicas

La parasitosis es frecuente en países donde hay sectores de la población en pobreza y extrema pobreza, que frecuentemente conlleva a factores de riesgo que favorecen el establecimiento y ciclo de vida del parásito. Entre los factores de riesgo se encuentran la residencia en un área endémica, malas condiciones sanitarias en la casa, hábitos de higiene personal deficientes, prácticas de crianza rústica de cerdos, consumo de carne de cerdo sin inspección y mal cocida, la alimentación de los cerdos con heces humanas, el compartir habitación con un teniásico, y el fecalismo al aire libre favoreciendo el consumo de los huevos por los cerdos que deambulan libremente, así como una mayor exposición humana a los huevos [Vázquez-Flores *et al.*, 2001; Carrique-Mas *et al.*, 2001; Widdowson *et*

*al.*, 2000; Cao *et al.*, 1997]. En los países no endémicos la mayoría de los casos son importados o adquiridos por contacto con un inmigrante portador del estado adulto. Los factores de riesgo en países no endémicos se asocian al contacto con inmigrantes de países endémicos, contratados como empleados domésticos, y al turismo hacia los países endémicos [Moore *et al.*, 1995; Ehnert *et al.*, 1992].

Existen diferentes manifestaciones de esta parasitosis en humanos. Una de éstas es la neurocisticercosis (NC) en la que el metacéstodo se localiza en el sistema nervioso central (SNC). En este caso la oncósfera atraviesa o evade la barrera hematoencefálica [Rubin y Staddon, 1999] por medios aún no conocidos y se establece en tejido cerebral, donde posteriormente se desarrolla el cisticerco (fig. 5). La NC es una enfermedad con una alta heterogeneidad clínica [Sciutto *et al.*, 2000; Fleury *et al.*, en prensa]. Puede manifestarse con ausencia o poca sintomatología (entre el 30 y el 40% de los casos son subclínicos), pero también puede tomar la forma clínica severa que puede causar la muerte o fuertes trastornos a las personas como cefalea, mareo, demencia, alteraciones en el estado de conciencia, síntomas neuropsiquiátricos, arteritis, crisis convulsivas, hidrocefalia e hipertensión [Forlenza *et al.*, 1997; Agapejev, 1996; Takayanagui, 1990]. La epilepsia es la manifestación más común causada por la NC [Agapejev, 1996; Takayanagui, 1990]. Cuando el cisticerco se localiza en otras regiones del cuerpo humano, por ejemplo: ojo, músculo esquelético, corazón y tejido subcutáneo (llamada cisticercosis subcutánea o CSC), provoca patologías comparativamente más benignas [Sciutto *et al.*, 2000].



**Figura 5:** Imagen de resonancia magnética de un paciente con neurocisticercosis presentando múltiples lesiones en el cerebro. Fotografía tomada de [www.cdc.gov/ncidod/eid/vol3no3/evans.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol3no3/evans.htm).

Esta parasitosis se encuentra ampliamente distribuida en el mundo y las manifestaciones son variables en diferentes continentes. En África (Benin, Togo, Sudáfrica, Malawi, Rwanda) [Avode *et al.*, 1996; Grunitzky *et al.*, 1995; Thomson, 1993; Ponnighaus *et al.*, 2001; Gascon *et al.*, 1989] y Asia (Japón, Nepal, India, Indonesia) [Ohnishi *et al.*, 1993; Amatya y Kimula, 1999; Ghosh *et al.*, 1999; David y Mathai, 2000; Kamal y Grover, 1995; Veliath *et al.*, 1985; Handali *et al.*, 1997; Muller *et al.*, 1987], así como en países europeos (España, Francia, Alemania, República Checa, Grecia, Italia) [Font Puig *et al.*, 1999; Rousseau *et al.*, 1999; Aghakhani *et al.*, 1998; Wabbels *et al.*, 2000; Vanista *et al.*, 1993; Sabel *et al.*, 2001; Carangelo *et al.*, 2001; Chatel *et al.*, 1999], se han registrado una gran cantidad de casos de NC y CSC presentes tanto de manera conjunta como separada. Por ejemplo, la prevalencia de CSC en pacientes con NC varía de 54% a 78.5% en China [Dixon y Lipscomb, 1961, Yinkun *et al.*, 1979 en Cruz *et al.*, 1994], en una población de Nueva Guinea el 17% de una muestra presentó



nódulos subcutáneos por cisticercosis [Muller *et al.*, 1987 en Cruz *et al.*, 1994], en Togo la prevalencia de nódulos subcutáneos en pacientes con NC fue del 79% [Dumas *et al.*, 1990] y en India la CSC es más frecuente que la NC [Singh, 1997]. En América Latina la CSC es una manifestación poco común y/o poco documentada. Se ha informado que la frecuencia de nódulos subcutáneos en pacientes con NC en América Latina es muy baja y se ha estimado, por ejemplo, que menos del 6% de los pacientes con NC en Colombia presentan nódulos [Botero *et al.*, 1993 en Cruz *et al.*, 1994]. En un estudio realizado en una población hiperendémica para *T. solium* en Ecuador, sólo un paciente (2.9%) de 34 individuos examinados presentó CSC [Cruz *et al.*, 1994]. En la tabla 1 se muestra una búsqueda bibliográfica ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) para ejemplificar las diferencias en el número de reportes, ya sean de estudio o de caso, sobre NC y CSC (u otra manifestación) entre países de diferentes continentes (palabras clave utilizadas: cisticercosis, neurocysticercosis, subcutaneous cisticercosis, cisticercosis Asia, cisticercosis Europe, cisticercosis Africa, cisticercosis Latin America, cisticercosis United States, cisticercosis developed countries). Puede observarse que hay pocos registros de CSC en América (en Brasil se han presentado casos de CC en boca y en Ecuador se presentó un caso de CSC), mientras que en Asia y África son comunes y se presentan frecuentemente de manera conjunta con casos de NC.

Tabla 1. Casos de cisticercosis registrados en distintos países (desde 1975).

País	Reporte	CC en SNC	CSC/otra muscular	Observaciones	Referencia
Brasil	Estudio	38		Diagnóstico más frecuente depresión 52.6%	Forlenza <i>et al.</i> , 1997
Brasil	Estudio	151		Epilepsia 54.3%	Takayanagui, 1990
Brasil	Caso	1			Agapejev <i>et al.</i> , 2000
Brasil	Caso		7	CC oral, tipo de lesión rara	de Souza <i>et al.</i> , 2000
Brasil	Estudio	38/2522 (1.5%)		Autopsias	Chimelli <i>et al.</i> , 1998
México	Estudio	100			Proano-Narvaez <i>et al.</i> , 2002
México	Estudio	122		Niños mexicanos	Ruiz-Garcia <i>et al.</i> , 1997
México	Caso	1		Niño de 6 años	Lara-Aguilera <i>et al.</i> , 1992
México	Estudio	50/100 (50%)			Medina <i>et al.</i> , 1990
Honduras	Estudio	85		En 6 años en niños	Cuellar <i>et al.</i> , 1999
Honduras	Estudio	14/61 (23%)		Con CC activa o anticuerpos en fluido vesicular	Sánchez <i>et al.</i> , 1999
Perú	Estudio	8			García <i>et al.</i> , 1999
Ecuador	Estudio	72		En población rural, urbana, parientes y niños	Cruz <i>et al.</i> , 1999
Ecuador	Estudio	34	1 (2.9%)		Cruz <i>et al.</i> , 1994
EE.UU.	Estudio	15		Pacientes inmigrantes de Centro y Sudamérica	Buitrago <i>et al.</i> , 1995
Italia	Caso	1		Posiblemente inmigrante	Carangelo <i>et al.</i> , 2001
Italia	Caso	1		Turista	Chatel <i>et al.</i> , 1999
España	Caso	4		Inmigrantes de India y América Latina	Font Puig <i>et al.</i> , 1999
Grecia	Caso	1			Sabel <i>et al.</i> , 2001
Alemania	Caso	1		Ocular, Turista a India y sur este de Asia	Wabbels <i>et al.</i> , 2000
Francia	Estudio	29		Turistas, 1988-1999	Rousseau <i>et al.</i> , 1999
Francia	Caso	1			Aghakhani <i>et al.</i> , 1998
R. Checa	Caso	8	2	6 ciudadanos Checos y 4 inmigrantes	Vanista <i>et al.</i> , 1993
Togo	Estudio	5/2064 (0.24%)	33/2064 (1.59%)		Grunitzky <i>et al.</i> , 1995
Benin	Estudio	57/1443 (3.95%)		Epilepsia 22/1443 (1.52%)	Avode <i>et al.</i> , 1996
Malawi	Caso		1		Ponnighaus <i>et al.</i> , 2001
Sudáfrica	Estudio	239		1975-1989	Thomson, 1993
Rwanda	Caso		5		Gascon <i>et al.</i> , 1989
Nepal	Estudio		62	Nódulos cutáneos, mucosa oral y pecho	Amatya y Kimula, 1999
India	Caso	1			Ghosh <i>et al.</i> , 1999
India	Estudio	25		Ocular, 1990-1998	David y Mathai, 2000
India	Caso	1	9	9 CSC, el de NC presentó también CSC	Kamal y Grover, 1995
India	Estudio	23/38 (60.52%)	18/38 (47.36%)	17 ocular, 6 NC	Veliath <i>et al.</i> , 1985
Japón	Caso	1			Ohnishi <i>et al.</i> , 1993
Irian Jaya	Estudio		142	Región pectoral, 1993	Handali <i>et al.</i> , 1997
Irian Jaya	Estudio		42/242 (17.35%)		Muller <i>et al.</i> , 1987
Australia	Caso	2		Inmigrantes de India y Zimbabwe	McKelvie y Goldsmid, 1988
Australia	Caso	5		Turistas a países en desarrollo e inmigrantes	Walker <i>et al.</i> , 1991

Las explicaciones a las diferencias encontradas en las manifestaciones entre continentes pueden estar basadas en las características metabólicas o en otros aspectos poco estudiados como las variaciones debidas a diferencias raciales del hospedero o a la diversidad genética y antigénica del parásito de diferentes continentes [Sciutto *et al.*, 2000; Fleury *et al.*, en prensa; Nakao *et al.*, 2002].

### Variabilidad genética y genética de poblaciones

La variabilidad morfológica dentro y entre grupos de organismos siempre ha sido reconocida. Los primeros naturalistas realizaron numerosas descripciones de las variaciones morfológicas por medio de las cuales separaban a los organismos en grupos o especies distintas. La variabilidad genética es reconocida con los trabajos de G. Mendel, quien descubre la herencia por segregación y distribución independiente de caracteres. Esta variabilidad es más numerosa que la morfológica pero no es visible, por lo que su estudio se ha visto limitado al desarrollo de metodologías adecuadas y confiables. Los estudios de variabilidad genética proveen de información para realizar estudios de genética de poblaciones. La genética de poblaciones pretende conocer cómo las leyes de Mendel y otros principios genéticos se aplican a poblaciones enteras, además trata de entender y predecir los efectos que tienen sobre las poblaciones los fenómenos genéticos, como la recombinación, segregación, transposición, mutación, y los fenómenos ecológicos, como el tamaño poblacional, patrones de apareamiento, distribución geográfica, migración y selección natural [Hartl y Clark,

1989]. Para comprender la influencia de las fuerzas evolutivas, es decir la selección natural, endogamia, deriva génica, flujo génico y mutación, en genética de poblaciones, es necesario describir y cuantificar la variación genética en una población y el patrón de variación genética entre poblaciones.

Una relación importante en genética de poblaciones que permite describir el contenido genético en una población diploide en términos de frecuencias alélicas y no genotípicas fue formulada por G. H. Hardy [1908 en Hedrick, 2000] y W. Weinberg [1908 en Hedrick, 2000], conocida como el principio Hardy-Weinberg. Este principio establece que las frecuencias genotípicas en un locus sencillo después de una generación con entrecruzamiento al azar pueden ser representadas por una función de frecuencias alélicas binomial (con dos alelos) o multinomial (con alelos múltiples). Además, en la ausencia de factores que cambien las frecuencias alélicas (fuerzas evolutivas, i.e. selección natural, flujo génico, deriva génica, endogamia y mutación) las proporciones genotípicas establecidas por el principio Hardy-Weinberg no cambiarán en el tiempo [Hedrick, 2000]. Este modelo para predecir las frecuencias genotípicas se ha establecido bajo los siguientes supuestos: 1) El organismo en cuestión es diploide; 2) La reproducción es sexual; 3) Las generaciones no se sobrelapan; 4) El apareamiento es al azar; 5) El tamaño poblacional es muy grande (infinito); 6) No hay migración; 7) No hay mutación; 8) No hay selección natural. Cuando las proporciones genotípicas se desvían del modelo Hardy-Weinberg entonces deben estar actuando algunas de las fuerzas evolutivas mencionadas anteriormente [Hartl y Clark, 1989].

Entre las diferentes técnicas utilizadas para determinar la variabilidad genética de organismos se encuentran: 1) La hibridación DNA-DNA; 2) La secuenciación de genomas completos y de regiones genómicas; 3) Los análisis de isoenzimas y aloenzimas; 4) Los RFLPs (por sus siglas en inglés, restriction fragment length polymorphisms); 5) Los AFLPs (por sus siglas en inglés, amplified fragment length polymorphisms); 6) Los microsatélites; 7) Los RAPDs (por sus siglas en inglés, random amplified polymorphic DNAs). En el Apéndice se presenta una breve descripción de estas técnicas y sus limitantes. Estos métodos pretenden demostrar polimorfismos en un gen o locus, en el caso de que éstos muestren más de una forma o alelo.

Para comparar variaciones entre diferentes genes y diferentes poblaciones es necesario tener una medida cuantitativa de la variación génica. La variación génica puede ser cuantificada por medio del concepto de frecuencia alélica, que es simplemente la proporción de todos los alelos de ese tipo entre un grupo de individuos. La variación génica dentro de una población se estima comúnmente como la proporción de individuos heterocigos esperados o simplemente como la frecuencia de heterocigos esperados ( $H$ ). Otro estimador de la variabilidad genética utilizado es la proporción de loci polimórficos ( $P$ ) y se refiere sencillamente a la proporción estimada de genes que son polimórficos dentro de especies o poblaciones, pero es menos confiable que  $H$  porque es sensible al número de loci analizados [Hartl y Clark, 1989].

Una población puede estar subestructurada, es decir presentar diferencias en la variación genética entre sus partes constituyentes, por diferentes razones evolutivas, por ejemplo apareamientos no azarosos, migración o selección. Uno de los acercamientos más utilizados para cuantificar el grado de diferenciación en las subdivisiones de una población ha sido el de Wright [1951, 1965b en Hedrick, 2000], el cual contiene tres coeficientes de  $F$  (coeficientes de correlación) utilizados para entender la variabilidad genética. Así,  $F_{ST}$  es una medida de diferenciación genética entre las subpoblaciones,  $F_{IS}$  y  $F_{IT}$  son medidas de la desviación de las proporciones Hardy-Weinberg dentro de subpoblaciones y en la población total, respectivamente. Estos tres valores ( $F_{ST}$ ,  $F_{IT}$ ,  $F_{IS}$ ) se encuentran interrelacionados según:

$$F_{ST} = (F_{IT} - F_{IS}) / (1 - F_{IS})$$

Nei [1973] demostró que estos coeficientes pueden ser expresados en términos de frecuencias alélicas y frecuencias genotípicas observadas y esperadas. Posteriormente, al extender el análisis en múltiples loci, como un estimado de  $F_{ST}$  y suponiendo proporciones Hardy-Weinberg, definió el coeficiente de diferenciación genética como:

$$G_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$$

donde  $H_S$  es la heterocigosidad promedio de la subpoblación en Hardy-Weinberg y  $H_T$  es la heterocigosidad promedio de todas las subpoblaciones, calculados como

$$H = 1 - \sum p_i^2$$

donde  $p_i^2$  es el promedio de las frecuencias para cualquier número de alelos [Hedrick, 2000].

La conexión genética entre subpoblaciones depende de la cantidad de intercambio genético efectivo entre ellas. Si el flujo génico entre las subpoblaciones es alto, entonces va a haber un efecto homogenizador de la variación genética entre los grupos, es decir la diferenciación genética disminuirá. Por el contrario, si la migración entre los grupos es baja, las diferentes fuerzas evolutivas entre las poblaciones pueden llevar a la diferenciación genética. Las medidas indirectas de flujo génico obtenidas utilizando marcadores moleculares son útiles para hacer inferencias poblacionales cuando otro tipo de medidas (observacionales y de comportamiento) no son posibles. Frecuentemente, se utilizan los coeficientes de  $F$  y otras medidas de diferenciación genética ( $G_{ST}$ ) para estimar los valores de flujo génico ( $Nm$ ) entre poblaciones [Hedrick, 2000].

En genética de poblaciones se utilizan las medidas de distancia genética e identidad genética para evaluar la cantidad de variación entre grupos, lo que resulta útil para visualizar sus relaciones y para manejar los datos más fácilmente. Las medidas de distancia genética son generalmente análogas a distancias geométricas (una distancia de cero es equivalente a una distancia genética de cero entre grupos) [Hedrick, 2000]. Un gran número de medidas de distancia genética ha sido sugerido a lo largo de los años [Hedrick, 2000], unas de las medidas más utilizadas posiblemente sean las de Nei [1972, 1978] y de Nei y Li [1979]. Estas medidas pueden ser utilizadas para crear matrices de distancia o identidad genética, las cuales a su vez pueden utilizarse para crear dendrogramas, representaciones gráficas de las distancias o identidades genéticas, utilizando

diferentes métodos de agrupamiento como el UPGMA (Unweight Pair Group Method With Arithmetic Mean) y el de Neighbor-Joining.

Los métodos de agrupamiento representan los datos de distancia (o identidad) en la forma de un árbol ultramétrico y si las distancias son ultramétricas, la representación en el árbol será exacta. El método de UPGMA primero toma los grupos (organismos o poblaciones) con mínima distancia y, a partir de una nueva distancia calculada entre el nuevo grupo y los demás, va creando una nueva matriz hasta completar el dendrograma. El método de Neighbor-Joining está relacionado con los métodos de agrupamiento tradicionales, pero no supone que los datos de distancia sean ultramétricos, es decir que los linajes no han divergido a la misma velocidad. En este método el primer árbol es a manera de estrella, se crea una matriz de distancia modificada en la cual la separación entre cada par de nodos es ajustado con base en su divergencia promedio de los demás nodos y el árbol es construido uniendo los pares de nodos menos distantes definidos por la nueva matriz, finalmente el proceso es completado cuando quedan dos nodos, separados por un sola rama [Hillis *et al.*, 1996].

#### Variabilidad genética de parásitos

Existe un gran número de estudios de variabilidad y caracterización genética de diferentes especies de parásitos por la relevancia de la información que provee este tipo de estudios en el tratamiento, diagnóstico acertado, desarrollo de nuevas vacunas, conocimiento de la interacción hospedero-parásito,



estudios de sistemática, evolución y ecología. A continuación se mencionan algunos trabajos relacionados con estos puntos se mencionan: Chapman y colaboradores [1995] desarrollaron un ensayo diagnóstico específico utilizando sondas de DNA, obtenidas a partir de clonas recombinantes, para la detección de la infección intestinal por *T. solium* y *T. saginata*, seleccionadas por su capacidad de hibridizar específicamente con el DNA genómico de las especies. La secuenciación de las regiones ITS-1 de siete especies de *Trichostrongylus* permitió determinar la variación intra e interespecífica y estimar la utilidad de la región rDNA para la identificación de estas especies. Además, los resultados indicaron que esta región puede ser útil para estudios de sistemática de este grupo [Hoste *et al.*, 1998]. Trabajando con *Trypanosoma evansi*, Ventura y colaboradores [2002] determinaron las relaciones genéticas por medio de RAPDs entre cepas brasileñas y de Etiopía, China y Filipinas, y entre éstas y otras especies de *Trypanosoma*, investigaron los polimorfismos genéticos entre cepas brasileñas obtenidas de diferentes hospederos domésticos y silvestres que mostraban diferente virulencia en el ratón, e investigaron la utilidad de los RAPDs generados como marcadores taxonómicos y especie-específicos para el diagnóstico. Anderson y colaboradores [1996] compararon tres técnicas de caracterización genotípica (RFLPs, hibridaciones por Southern Blot y RAPDs) para *Aspergillus fumigatus*, la combinación de las técnicas resultaron en la discriminación de 10 cepas de un total de 16, estableciendo su relevancia en estudios de epidemiología y ecología de este hongo para su posterior utilidad en procedimientos diagnósticos. Los protozoarios *Trypanosoma brucei* y *Leishmania major* fueron incluidos en proyectos genómicos internacionales cuyo objetivo fue

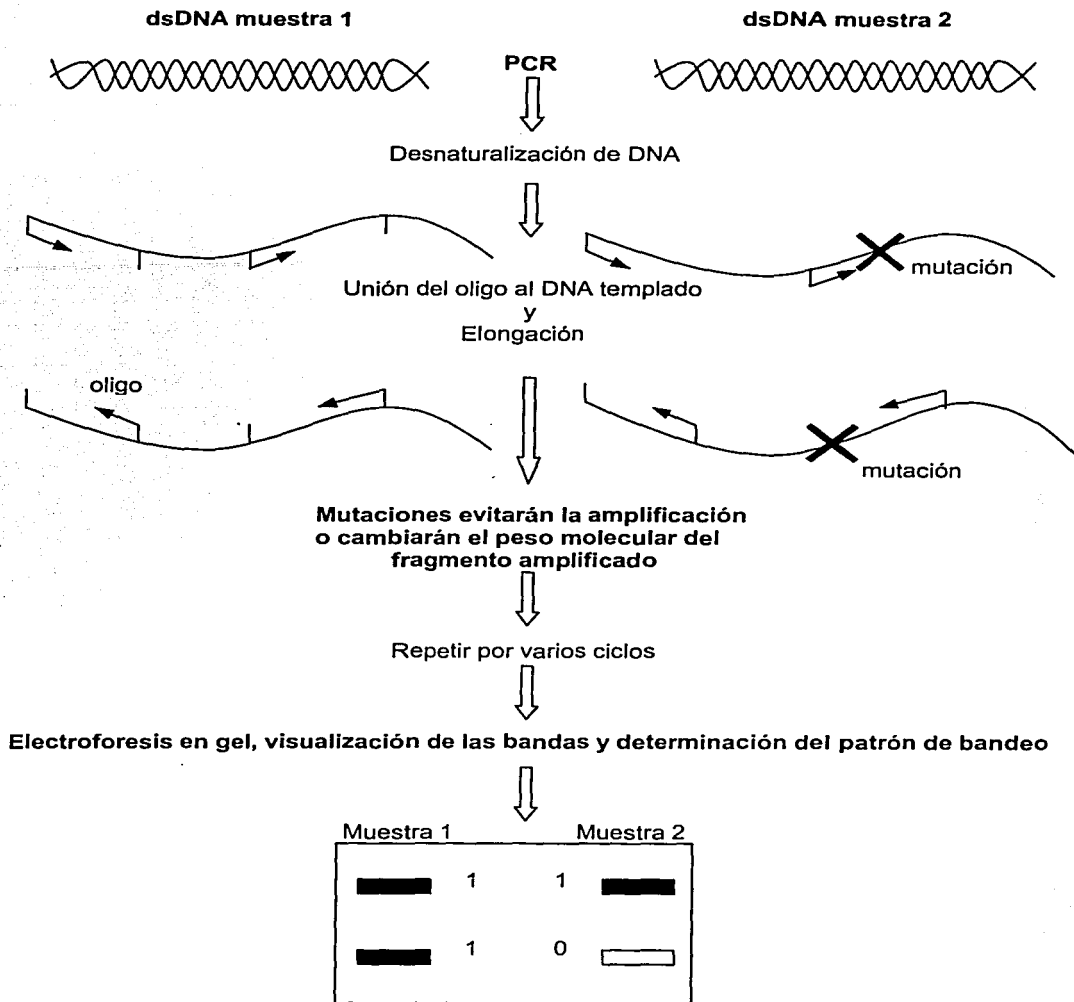
utilizar las más recientes tecnologías de genética molecular y análisis de secuencias para la generación de información que pudiera revolucionar los estudios de estos organismos y la generación de nuevos blancos quimioterapéuticos y de vacunación [Blackwell, 1997]. El desarrollo exitoso de vacunas depende del entendimiento de la variación génica del parásito y cómo esta variación afecta la inmunidad cruzada, tal es el caso para *Borrelia burgdorferi*, causante de la enfermedad de Lyme, en la cual se secuenciaron diversos genes y se encontraron tres clonas comunes y varias clonas raras que son tan divergentes entre sí que el desarrollo de una vacuna contra una tal vez no provea inmunidad contra otras [Dykhuizen *et al.*, 1993].

#### Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

La técnica desarrollada simultáneamente por Williams y colaboradores [1990], denominada RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-PCR), y por Welsh y McClelland [1990], denominada como AP-PCR (Arbitrary Primed-PCR), se basa en la amplificación de segmentos de DNA al azar utilizando oligonucleótidos (oligos) simples o sencillos de secuencia nucleotídica arbitraria que demuestran polimorfismos por la presencia o la ausencia de un segmento de DNA amplificado (fig. 6) [Black, 1996]. Presenta la ventaja de ser de bajo costo con respecto a otras técnicas utilizadas para identificar polimorfismos y de no requerir información previa del genoma del organismo a estudiar.

Puede utilizarse en ecología molecular, taxonomía molecular y genética de poblaciones para determinar identidades taxonómicas, estimar la variabilidad intra e interespecífica, estimar relaciones de parentesco, analizar muestras genómicas mezcladas y para crear sondas específicas [Hadrys *et al.*, 1992]. En el Apéndice se explica de manera más detallada la técnica de los RAPDs, sus ventajas y sus desventajas.

Los RAPDs se han utilizado ampliamente en ecología molecular para conocer la estructura poblacional de varios organismos. Así: Moya y colaboradores [2001] determinaron la estructura genética de seis poblaciones ibéricas de *Bemisia tabaci* (Hemiptera), una plaga de importancia global por su papel como vector de virus que atacan la producción agrícola en zonas tropicales, subtropicales y templadas. En *Scutellaria indica* (Labiatae) se utilizaron RAPDs para conocer la cantidad y distribución de la variación genética en 20 poblaciones silvestres [Sun, 1999]. Mengistu y colaboradores [2000] utilizaron esta técnica para determinar la diversidad genética de *Poa annua*, una hierba que contamina los cultivos de semillas de pasto, y para aprender de la evolución de esta planta con el fin de controlar esta especie retrasando y minimizando su resistencia a herbicidas. Se estudiaron los patrones de variación de RAPDs en siete poblaciones de *Prunus mahaleb* (Rosaceae) con una extensión mayor a 100 km<sup>2</sup> para examinar la diferenciación local en relación con el aislamiento espacial por distancia geográfica y diferencias en elevación [Jordano y Godoy, 2000].



**Figura 6:** Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Esta técnica se basa en la amplificación de pequeñas secuencias de DNA a partir de DNA genómico utilizando oligos escogidos al azar. Los oligos se unirán al DNA templado aleatoriamente y por medio de PCR se amplificarán fragmentos de diferentes pesos moleculares. Mutaciones en el DNA genómico evitarán la amplificación o modificarán el peso molecular del fragmento y aparecerán como polimorfismos al realizar electroforesis en gel. Considerando los fundamentos de los RAPDs, no es posible diferenciar individuos homocigos dominantes de individuos heterocigos, por lo tanto la técnica es considerada dominante.

En cuestiones de genética de la conservación los RAPDs se han utilizado para determinar los niveles de variabilidad genética y diferenciación intra e interpoblacional de *Leucopogon obtectus* (Ericaceae), y proveer de indicadores para su conservación, manejo y restauración ecológica [Zawko *et al.*, 2001]; establecer el nivel de variabilidad genética de *Colubrina oppositifolia* y *Alphitonia ponderosa* (Rhamnaceae), el grado de diferenciación y subdivisión poblacional, la estructura genética poblacional, y la relación entre el tamaño poblacional y el nivel de variación, con el fin de establecer prácticas de manejo para la conservación de ecosistemas de islas en peligro [Kwon y Morden, 2002]. Así también para caracterizar la diferenciación poblacional cuantificando la variabilidad dentro y entre poblaciones de *Limonium dufourii* (Plumbaginaceae), e inferir relaciones entre las poblaciones y entre diferentes fenotipos encontrados en esta especie [Palacios y González-Candelas, 1997]; proveer de un conocimiento inter e intraespecífico de la distribución de la variación genética dentro de los rangos nativos de *Irvingia gabonensis* e *I. wombolu* (Irvingiaceae), esencial para la producción de estrategias de conservación y manejo sustentable [Lowe *et al.*, 2000].

Por medio de esta técnica también se han realizado numerosos estudios de variabilidad genética de varios organismos parásitos: Realizando RAPDs con *Escherichia coli* se diferenciaron cepas de fuentes humanas y no humanas eficientemente [Tseng *et al.*, 2001]. El análisis de treinta cepas de *Salmonella enterica* subesp. *enterica* por medio de RAPDs permitió la correcta diferenciación

de cada cepa y la diferenciación dentro de las cepas, por lo que la técnica puede ser útil para monitorear la epidemiología de infecciones de *Salmonella* en programas de control sanitario [Chansiripornchai *et al.*, 2000]. Gomes y colaboradores [2000] analizaron la variabilidad genética de varias cepas axénicas de *Entamoeba histolytica* por medio de RAPDs obtenidas de pacientes con diferentes manifestaciones clínicas y encontraron cierta divergencia entre las cepas, lo que sugiere la existencia de un gran número de genotipos dentro de la especie que pueden verse reflejados en los fenotipos y pueden explicar los diferentes grados de virulencia. En un estudio realizado con *Giardia duodenalis* se encontraron diez agrupamientos por medio de RAPDs y los resultados obtenidos por esta técnica se correlacionaron significativamente con los obtenidos por medio de isoenzimas [Morgan *et al.*, 1993]. Steindel y colaboradores [1994] compararon dieciséis cepas de *Trypanosoma rangeli* de diferentes países por medio de RAPDs e isoenzimas y encontraron dos grupos distintivos, uno conformado por la cepa de Brasil y el otro por las cepas de otros países sudamericanos, sin embargo, los resultados por RAPDs fueron más complejos por ser un método más sensible y por analizar un mayor número de loci. En nemátodos se presentan dos trabajos con especies de *Trichinella* utilizando RAPDs, en el primero [Bandi *et al.*, 1993], utilizaron los RAPDs para distinguir *T. spiralis* de *T. britovi* a partir de diferentes preparaciones de DNA (preparaciones purificadas y crudas de larvas de músculo individuales o múltiples), en el segundo, Bandi y colaboradores [1995], identificaron una estructura de ocho taxa para el género de *Trichinella* la cual resultó idéntica a las obtenidas por aloenzimas y por características biológicas. Hashmi y Gaugler [1998] analizaron la variabilidad genética dentro de y entre siete

especies de *Heterorhabditis*, nemátodos entomopatogénicos, utilizando RAPDs y encontraron poca variabilidad a pesar de que las muestras provinieron de diferentes regiones geográficas, sin embargo, mencionaron que los resultados no son sorprendentes considerando el ciclo de vida de la especie, donde la primera generación es hermafrodita y los individuos de una población pueden estar cercanamente relacionados. Sandoval y colaboradores [1999] analizaron la variabilidad intra e interespecífica de *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda) obtenidos de diferentes ovejas de diferentes provincias de España y descubrieron que la variabilidad genética es alta, incluso entre parásitos obtenidos del mismo hospedero. El estudio de la estructura genética poblacional entre el caracol de agua dulce *Bulinus globosus* y su parásito tremátodo *Schistosoma haematobium* por medio de RAPDs demostró una alta variabilidad entre caracoles colectados de diferentes sitios, pero las poblaciones de *Schistosoma* solamente mostraron variación a una escala geográfica más amplia [Davies *et al.*, 1999]. Pagès y colaboradores [2001] estudiaron dos poblaciones de *S. intercalatum* de Camerún y la República Democrática del Congo utilizando RAPDs y encontraron suficiente diferenciación como para poder considerarlas dos especies diferentes. En *Echinococcus granulosus* (Cestoda) se estudió la variabilidad genética por medio de RAPDs de cepas provenientes de España y los autores concluyeron que esta técnica es más sensible que otras por demostrar variaciones dentro de las cepas [Siles-Lucas *et al.*, 1993]. Král'ová y Spakulová [1996] encontraron un alto grado de variabilidad genética por medio de RAPDs de *Proteocephalus exiguus* (Cestoda) entre diferentes localidades y hospederos.

La notoria heterogeneidad clínica de la cisticercosis causada por *T. solium* hace suponer que la variabilidad genética del parásito está involucrada. Sin embargo, ha sido poco estudiada la variabilidad genética de *T. solium* de diferentes países pertenecientes a distintos continentes y dentro de México. De hecho, la mayoría de los estudios sobre esta enfermedad no han considerado la diversidad genética del parásito. En este trabajo se determina la variabilidad y diferenciación genética entre cisticercos de *T. solium* obtenidos de Madagascar y de diferentes regiones y localidades de México por medio de RAPDs, una técnica que ha demostrado ser de gran utilidad para analizar un amplio número de individuos y ha resultado ser más sensible a las variaciones génicas con respecto a otras técnicas. Además, este trabajo representa un primer abordaje para evaluar si las distintas manifestaciones clínicas entre continentes y la heterogeneidad clínica en México se encuentran asociadas a la diversidad y diferenciación genética del parásito.



## JUSTIFICACIÓN

A pesar de que la infección por el metacéstodo de *T. solium* es una parasitosis frecuente, peligrosa para el humano y con diferentes manifestaciones clínicas, poco se sabe acerca de la variación intraespecífica entre continentes y de la variación de esta especie en México, su relación con la patogenicidad y la heterogeneidad clínica. En un intento por establecer la variabilidad intraespecífica de *T. solium*, Hancock y colaboradores [2001] secuenciaron una porción de 396 pb del gene mitocondrial citocromo oxidasa 1 (CO1), una porción de 730 pb del primer espaciador transcrito interno (ITS-1) de DNA ribosomal nuclear y una porción de 333 pb de un gene codificante de la proteína diagnóstica Ts14 de DNA nuclear de cisticercos de 11 ubicaciones geográficas dentro de Perú, de cisticercos provenientes de Colombia, México, India, China y Filipinas. Los resultados de las comparaciones de las secuencias mostraron baja variabilidad genética entre países y una homogeneidad entre parásitos de las 11 ubicaciones geográficas dentro de Perú. En este estudio se utilizaron pocos individuos para estimar la variabilidad genética dentro y entre poblaciones; obtener una muestra representativa de las poblaciones a estudiar es importante cuando se va a realizar un análisis de genética de poblaciones. Los RAPDs, al ser una técnica relativamente económica y rápida, permiten analizar un gran número de individuos con respecto a otras técnicas más laboriosas como la secuenciación. Además, a diferencia de la secuenciación de pequeñas regiones genómicas, los RAPDs muestrean todo el genoma al utilizar oligos con secuencias diferentes que pueden asociarse a zonas del genoma en forma aleatoria, y se considera una técnica más

sensible a las variaciones genómicas. Los fragmentos amplificados proveen un gran número de loci polimórficos potenciales, por lo que la técnica de RAPDs es útil en estudios de especies con baja variabilidad genética y ha demostrado evidenciar diferencias entre poblaciones incluso cuando otras técnicas han fallado en revelarlas [Dawson *et al.*, 1993 en Palacios y González-Candelas, 1997].

Como se mencionó anteriormente, los análisis de variabilidad genética son útiles para el desarrollo de vacunas efectivas. En el laboratorio donde se llevó a cabo este estudio, se están evaluando diferentes tratamientos protectores contra la cisticercosis porcina basados en péptidos sintéticos, antígenos de los extractos totales de cisticercos de *T. crassiceps* y *T. solium*, y antígenos recombinantes, por lo que el conocimiento de la diversidad y diferenciación genética de *T. solium* es de interés para saber si los antígenos seleccionados para vacunas pudieran ser eficientes en diferentes regiones del país y también en otros países con cisticercosis. Además de la importancia en el desarrollo de vacunas, este estudio se justifica como un primer abordaje para evaluar si, dado que el parásito presente variabilidad y diferenciación genética entre las poblaciones, estas diferencias pudieran estar asociadas a las distintas manifestaciones clínicas entre continentes y a la heterogeneidad epidemiológica en México.

## HIPÓTESIS

- Los cisticercos de *Taenia solium* provenientes de México y Madagascar presentarán baja variabilidad genética.
- Los cisticercos obtenidos de tejido cerebral y muscular del hospedero intermediario se encontrarán diferenciados genéticamente.
- Los cisticercos provenientes del centro y sureste de México y Madagascar presentarán alta diferenciación y distancias genéticas.

## OBJETIVOS

- Determinar la variabilidad genética de cisticercos de *Taenia solium* provenientes de México y Madagascar por medio de RAPDs.
- Determinar la diferenciación genética entre cisticercos de *Taenia solium* obtenidos de diferentes regiones anatómicas del hospedero intermediario (tejido muscular y cerebral) por medio de RAPDs.
- Obtener las estimaciones de diferenciación genética y distancias genéticas entre cisticercos de *Taenia solium* provenientes del centro y sureste de México y Madagascar.

## METODOLOGÍA

### Obtención de cisticercos

Los cisticercos de México se obtuvieron de cerdos criados de manera rústica, provenientes de diferentes localidades consideradas hiper-endémicas para la cisticercosis: Zacatepec y Cuentepec, Morelos, Huatlatlauca, Puebla y Kochol, Yucatán. Las localidades de Zacatepec, Cuentepec y Huatlatlauca se consideraron como representativas de la región del centro de México, mientras que la de Yucatán se consideró como representativa del sureste. Los cisticercos de Madagascar se obtuvieron de cerdos infectados encontrados en rastros en las ciudades de Antananarivo y Fianarantsoa (otorgados por B. Ramanankandrasana). Estos cisticercos se consideraron como representativos de la región central de Madagascar. Los cisticercos de *T. solium* se extrajeron de diferentes regiones anatómicas del cerdo (extremidad posterior derecha e izquierda, extremidad anterior derecha e izquierda, diafragma y cerebro) utilizando pinzas de disección y bisturí para cortar el tejido muscular. Se colocaron en tubos Falcon de 50 ml estériles (1 tubo para cada región anatómica para cada cerdo), debidamente etiquetados, con aproximadamente 20 ml de solución salina isotónica 0.9%. También se obtuvo para cada cerdo una muestra de tejido muscular libre de parásitos. Posteriormente, los cisticercos se lavaron vertiendo la solución salina y agregando nuevamente 20 ml tres veces para eliminar residuos contaminantes del tejido del hospedero. Los cisticercos se pasaron ligeramente por un papel absorbente y se colocaron individualmente en tubos Eppendorf 0.5 ml

estériles. Se realizó el mismo procedimiento para las muestras de tejido de cerdo. Además, se extrajeron cisticercos de *Taenia crassiceps* ORF, un parásito relacionado con *T. solium* que infecta a ratones [Cheng, 1986] y es utilizado como modelo para estudiar la CC. Esto nos permitió asegurarnos que las muestras de *T. solium* formaran un solo grupo con respecto a otro céstodo a pesar de la variabilidad intraespecífica que se pudiera encontrar. Todas las muestras se guardaron debidamente etiquetadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### Extracción de DNA y cuantificación

La extracción del DNA se realizó por medio del kit comercial GenomicPrep Cells and Tissue DNA Isolation Kit, Protocolo C (Pharmacia). El procedimiento utilizado fue el descrito por el proveedor y se presenta a continuación:

Lisis celular.-

- 1) Enfriar un tubo Eppendorf de 1.5 ml con 600  $\mu\text{l}$  de solución de lisis celular (Tris[hidroximethyl]aminomethane, Ethylenediamine-tetraacetic acid [EDTA] y Sodium Dodecyl Sulfate [SDS]) en hielo y esperar a que la solución se ponga turbia.
- 2) Adicionar 10-20 mg de tejido (1 cisticerco) al tubo con la solución de lisis celular, retirar del hielo, y homogeneizar rápidamente. Mantener las muestras homogenizadas en hielo hasta el paso 3.
- 3) Agregar 3  $\mu\text{l}$  de solución de Proteinasa K (20 mg/ml) al lisado e incubar a  $55^{\circ}\text{C}$  por toda la noche.

#### Tratamiento con RNasa.-

- 1) Agregar 3  $\mu$ l (o 5  $\mu$ l) de solución de RNasa (4 mg/ml [ $>100$  u/mg]) al lisado celular.
- 2) Mezclar la muestra volteando el tubo aproximadamente 25 veces e incubar a 37°C por 30 min.

#### Precipitación de Proteínas.-

- 1) Enfriar la muestra en hielo.
- 2) Agregar 200  $\mu$ l de solución de precipitación de proteínas (acetato de amonio) al lisado tratado con RNasa.
- 3) Agitar vigorosamente por 20 seg para mezclar la solución de precipitación de proteínas uniformemente con el lisado.
- 4) Centrifugar a 13,000 x g por 3 min. Las proteínas precipitadas formarán un botón en el fondo del tubo.

#### Precipitación de DNA.-

- 1) Colocar el sobrenadante en un tubo de 1.5 ml limpio con 600  $\mu$ l de isopropanol al 100%.
- 2) Mezclar la muestra volteando 50 veces hasta que se observen hebras blancas de DNA formando un agregado.
- 3) Centrifugar a 13,000 x g por 2 min, el DNA formará un botón visible en el fondo del tubo.
- 4) Descartar el sobrenadante y secar el tubo en papel absorbente. Agregar 600  $\mu$ l de etanol al 70%. Voltear el tubo varias veces para lavar el botón de DNA.

5) Centrifugar a 13,000 x g por 2 min. Descartar el etanol sin desprender el botón de DNA.

6) Secar el tubo en papel absorbente y dejar secar la muestra por 15 min.

Hidratación del DNA.-

1) Agregar 100  $\mu$ l de solución de hidratación de DNA (Tris[hidroximethyl]aminomethane y EDTA) al tubo con el botón de DNA.

2) Calentar a 65°C por 1 hora, golpear periódicamente el tubo para ayudar a la hidratación del DNA.

3) Guardar las muestras a 2-8°C.

En todo momento se trabajó en campana de flujo laminar para evitar contaminación. Siguiendo el mismo procedimiento, también se extrajo el DNA de tejido de cerdo para su posterior uso como control y de *T. crassiceps* ORF.

La cuantificación del DNA de las muestras de cisticercos de *T. solium* y *T. crassiceps* ORF, y de tejido de cerdo se realizó por medio de espectrofotometría (DU-65 Spectrophotometer, Beckman) a una densidad óptica (DO) de 260 nm, también se cuantificó la concentración de proteína en cada una de las muestras a una DO de 280 nm. Se tomaron 5  $\mu$ l de solución de cada muestra de DNA obtenida, se colocaron en un nuevo tubo Eppendorf debidamente etiquetado y se les agregó la cantidad necesaria de Tris EDTA (10mM Tris 1mM EDTA) pH 8 (TE pH 8) para que quedaran a una concentración final de DNA de 5 ng/ $\mu$ l. Estas muestras diluidas fueron guardadas a 4°C hasta su utilización en los RAPDs.

## Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Los cambios en la concentración de DNA, cloruro de magnesio, oligo, diferente número de ciclos de amplificación, etc., pueden provocar diferentes patrones de bandeo en los RAPDs, por lo que resulta muy importante mantener las condiciones de amplificación bien estandarizadas y dar especial cuidado a cada una de las amplificaciones. Por esto, en este trabajo se utilizó el kit comercial Ready-To-Go RAPD Analysis Kit (Pharmacia), el cual está compuesto por 100 reacciones (Ready-To-Go RAPD Analysis Beads, Pharmacia), prediseñadas y separadas individualmente e incluye un juego de 6 oligos (RAPD Analysis Primer Set, Pharmacia) especialmente diseñados y probados para su uso en RAPDs.

Cada una de las reacciones de RAPDs está compuesta por AmpliTag™ DNA polymerase y Stoffel fragment (dos polimerasas termoestables que producen un patrón de RAPDs más complejo que una sola), dNTPs (0.4 mM de cada dNTP en un volumen de 25  $\mu$ l), Bovine Serum Albumin (2.5  $\mu$ g) y amortiguador (3mM  $MgCl_2$ , 30 mM KCL y 10 mM Tris pH 8.3 en un volumen de 25  $\mu$ l). Los oligos incluidos en el kit son oligómeros de 10 bases de secuencia arbitraria sin extremos complementarios, con un contenido de GC de al menos 60%, en una presentación por tubo de 2.5 nmol de oligo que fueron reconstituidos con 500  $\mu$ l de agua estéril y destilada (libre de DNAsas y RNAsas, Gibco BRL) dando una concentración final de 5 pmol/ $\mu$ l. Además de los oligos incluidos en el kit, se utilizaron 3 oligos de



secuencia arbitraria de Operon Technologies los cuales fueron reconstituidos con TE pH 7 a una concentración final de 5 pmoles/ $\mu$ l. Todos los oligos fueron congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización (tabla 2).

**Tabla 2.** Oligonucleótidos utilizados.

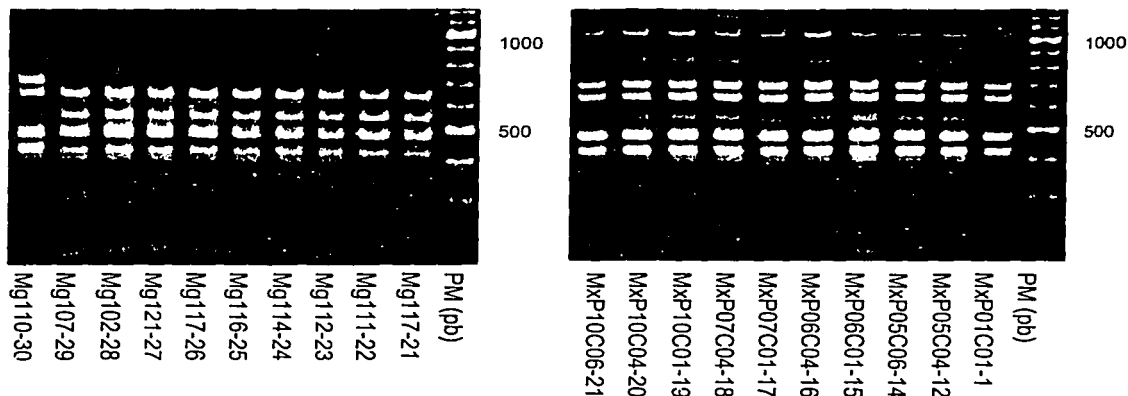
<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>
RAPD Analysis Primer 01 (Pharmacia)	5'-d[GGTGC GGAA]-3'
RAPD Analysis Primer 02 (Pharmacia)	5'-d[GTTTCGCTCC]-3'
RAPD Analysis Primer 03 (Pharmacia)	5'-d[GTAGACCCGT]-3'
RAPD Analysis Primer 04 (Pharmacia)	5'-d[AAGAGCCCGT]-3'
RAPD Analysis Primer 05 (Pharmacia)	5'-d[AACGCGCAAC]-3'
RAPD Analysis Primer 06 (Pharmacia)	5'-d[CCCGTCAGCA]-3'
OP-A03 (Operon)	5'-d[AGTCAGCCAC]-3'
OP-A07 (Operon)	5'-d[GAAACGGGTG]-3'
OP-A13 (Operon)	5'-d[CAGCACCCAC]-3'

Para la obtención de los RAPDs se siguió el protocolo incluido en el kit Ready-To-Go RAPD Analysis Beads. En las reacciones se agregaron: 5  $\mu$ l (25 pmol) de un solo oligo, 4  $\mu$ l (20 ng) de la solución de DNA de cisticerco, 16  $\mu$ l de agua destilada (libre de DNasas y RNasas), dando un total de 25  $\mu$ l por reacción. En los controles de tejido de cerdo y de *T. crassiceps* ORF también se adicionaron 4  $\mu$ l (20 ng) de la solución de DNA, mientras que en los controles negativos no se agregó DNA y la cantidad de agua utilizada fue de 20  $\mu$ l. Además, se adicionó una gota de aceite mineral (Sigma) para evitar la evaporación durante los ciclos de amplificación. Las reacciones de RAPDs se llevaron a cabo en un termociclador E-C 500 (E-C Apparatus Corporation) y las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo a  $95^{\circ}\text{C}$  por 5 min seguido por 45 ciclos a  $95^{\circ}\text{C}$  por 1 min,  $36^{\circ}\text{C}$  por 1 min y  $72^{\circ}\text{C}$  por 2 min. Al terminar el último ciclo las reacciones se mantuvieron a  $4^{\circ}\text{C}$  y posteriormente se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización en electroforesis en geles de agarosa.

## Electroforesis en geles de agarosa y fotografía

Los productos de amplificación del DNA obtenidos por la técnica de RAPDs se separaron por medio de electroforesis en geles de agarosa al 2% (100 ml TBE 1X [Tris borate EDTA 1X] y 2.0 g agarosa) con bromuro de etidio a 0.8  $\mu\text{g/ml}$  (para la visualización de las bandas) en buffer TBE 1X durante 3:30 horas en una cámara horizontal para electroforesis en gel (International Biotechnologies, modelo QSH) a 60 V.

Las muestras de *T. solium* y *T. crassiceps* ORF se corrieron junto a un marcador de pesos moleculares (escalera de 100 pb, Roche) para poder estimar, posteriormente, los pesos moleculares de las bandas. Los controles negativos y de tejido de cerdo se corrieron en otros carriles. Las bandas separadas por electroforesis se visualizaron utilizando un transiluminador de luz UV y se fotografiaron con película Polaroid Polapan 667 ISO 3000 (blanco y negro) utilizando una cámara de fotografía para geles (GelCam, Polaroid). En la figura 7 se presenta una imagen ilustrativa de dos geles con 10 muestras de México y 10 de Madagascar amplificadas con el oligo 03.



**Figura 7:** Figura ilustrativa de electroforesis en gel de agarosa para 10 muestras de cisticercos provenientes de México y 10 de Madagascar amplificadas con el oligo 03. PM = Peso Molecular, escalera de 100 pares de bases; Mx = Muestras provenientes de México; Mg = Muestras provenientes de Madagascar.

### Análisis de geles

Las fotografías de los geles se digitalizaron por medio de un escáner y se guardaron en formato TIF. Para determinar los patrones de bandeo (patrones de presencia/ausencia de una banda) para todas las muestras de cisticercos con todos los oligos se utilizó el programa Gene Profiler (Scanalytics). Este programa está diseñado para el análisis de imágenes de geles de una dimensión con bandas de DNA formadas por PCR, RAPD, RFLP, etc., y con bandas de proteínas. Lleva a cabo un análisis automatizado de la imagen del gel convirtiendo el patrón de bandeo de cada carril en un perfil de densidad y posteriormente crea medidas cuantitativas precisas de tamaño de la banda, densidad de la banda y

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

concentración de la banda, las cuales pueden ser incorporadas en un archivo que después puede ser exportado a otro programa (Database Manager, Scanalytics) en donde se pueden hacer comparaciones con otros geles, crear patrones de presencia/ausencia que pueden ser incorporados a otros programas para hacer dendrogramas, etc. En la figura 8 se presenta una imagen idealizada de dos geles (correspondientes a los de la figura 7) y el patrón de presencia/ausencia respectivo para cada muestra.

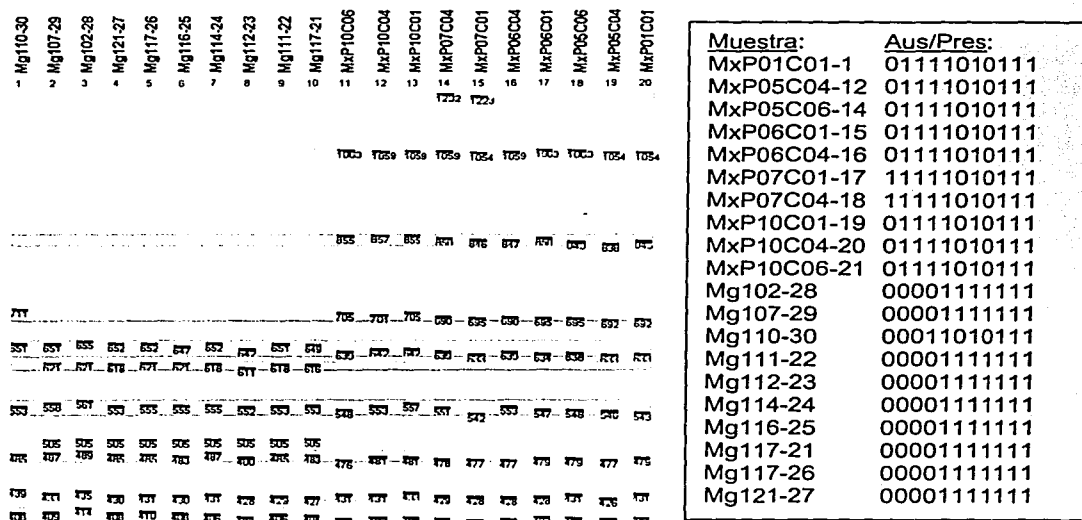


Figura 8: Gel idealizado y pareado obtenido por medio de Database Manager (Scanalytics) para 10 muestras provenientes de México y 10 de Madagascar amplificadas con el oligo 03, los rectángulos muestran aquellas bandas que parearon por presentar más o menos el mismo peso molecular. En Database Manager también se obtienen los patrones de Ausencia/Presencia para cada muestra. Aus = Ausencia (0); Pres = Presencia (1); Mx = Muestras provenientes de México; Mg = Muestras provenientes de Madagascar; P = Número de cerdo; C = Región anatómica del cerdo de donde se obtuvo el cisticerco y número de cisticerco.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Análisis poblacionales

Los RAPDs son marcadores que se comportan de manera dominante, por lo que no pueden diferenciarse homocigos dominantes de heterocigos en organismos diploides. La dominancia en los RAPDs provoca que individuos diploides, aparentemente, compartan un mayor número de bandas de lo esperado, disminuyendo así la diversidad genética obtenida. Teniendo en cuenta esto, deben hacerse modificaciones a los cálculos de las frecuencias alélicas.

Los patrones de presencia/ausencia (1/0) obtenidos por RAPDs se incorporaron al programa PopGene Ver. 1.31 [Yeh *et al.*, 1997], el cual se utiliza para el análisis de variación genética entre y dentro de poblaciones utilizando marcadores co-dominantes, dominantes y caracteres cuantitativos, y realiza la mayoría de los análisis de datos utilizados en genética de poblaciones.

El presente estudio se realizó en tres niveles jerárquicos:

### I.- Al nivel de Países:

- México
- Madagascar

### II.- Al nivel de Regiones:

- Región Centro de México
- Región Sureste de México
- Madagascar (Región central)

### III.- Al nivel de Localidades dentro de México:

- Zacatepec, Morelos (Región Centro)
- Cuentepec, Morelos (Región Centro)
- Huatlatlauca, Puebla (Región Centro)
- Kochol, Yucatán (Región Sureste)

Los estudios sobre las poblaciones en los tres diferentes niveles jerárquicos se llevaron a cabo considerando las poblaciones por separado y de manera conjunta o pareada, con el fin de obtener todos los parámetros poblacionales posibles.

Los análisis poblacionales que se llevaron a cabo en PopGene Ver. 1.31, bajo la opción de marcadores dominantes y datos diploides, fueron:

La obtención de frecuencias génicas para cada locus por medio de la siguiente relación

$$q = (C/N)^{1/2}$$

donde  $q$  es la frecuencia del alelo recesivo,  $C$  es el número de individuos con el alelo recesivo (0) y  $N$  es el número total de individuos en la población; El número de alelos presentes en las poblaciones ( $n_a$ ) con frecuencia diferente a cero; El número efectivo de alelos ( $n_e$ ) para cada loci calculado como el recíproco de homocigosidad [Hartl y Clarck, 1989],

$$n_e = 1/(p_i^2) + (q_i^2)$$

donde  $p_i$  y  $q_i$  son las frecuencias alélicas para cada loci de la banda presente (1) y ausente (0), respectivamente; El número de loci polimórficos ( $P$ ) y su porcentaje sin tomar en cuenta sus frecuencias alélicas; La diversidad genética ( $h$ ) de Nei [1973] para cada loci,

$$h = 1 - (p_i^2 + q_i^2)$$

donde  $p_i$  y  $q_i$  son las frecuencias alélicas para cada loci de la banda presente (1) y ausente (0), respectivamente; El índice informativo ( $I$ ) de Shannon [Shannon y Weaver, 1949] como una medida de diversidad genética,

$$I = -\sum p_i \log_2 p_i$$

siendo  $p_i$  la frecuencia de las bandas presentes y ausentes; El estimador de diferenciación poblacional ( $G_{ST}$ ),

$$G_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$$

donde  $G_{ST}$  es el coeficiente de diferenciación genética en el contexto de loci multialélicos de Nei [1973] calculado a partir de los valores de  $H_T$  y  $H_S$ , siendo

$$H_S = 1 - \sum p_{si}^2 \quad \text{y} \quad H_T = 1 - \sum p_{pi}^2$$

donde  $H_S$  es la heterocigosidad esperada en Hardy-Weinberg en la subpoblación  $s$  y  $p_{si}$  es la frecuencia del alelo  $i$  en la subpoblación  $s$ , y donde  $H_T$  es la heterocigosidad esperada en todas las subpoblaciones y  $p_{pi}$  es la frecuencia del alelo  $i$  promediado sobre las subpoblaciones; El flujo génico ( $Nm$ ),

$$Nm = 0.5 (1 - G_{ST}) / G_{ST}$$

calculado a partir de  $G_{ST}$  [Slatkin y Barton, 1989]; La distancia ( $D$ ) e identidad genética ( $I$ ) de Nei [1972] y la distancia e identidad genética sin sesgo de Nei [1978] entre las localidades y regiones analizadas,

$$D = -\ln(I)$$

donde  $I$  es la identidad genética de Nei [1972] calculada como

$$I = J_{xy} / (J_{xx} J_{yy})^{1/2}$$

y con la corrección de las distancias mínimas de Nei [1978] la identidad genética ( $I$ ) es calculada como

$$I = ((2n - 1)J_{xy}) / ((2n J_{xx} - 1)(2n J_{yy} - 1))^{1/2}$$

siendo  $J_{xy}$  la probabilidad de que dos alelos escogidos al azar, uno de la población X y otro de la población Y, sean idénticos calculado como,

$$J_{xy} = \sum p_i q_i$$

$J_{xx}$  la probabilidad de que dos alelos escogidos al azar de la población X sean idénticos calculado como,

$$J_{xx} = \sum p_i^2$$

y  $J_{yy}$  la probabilidad de que dos alelos escogidos al azar de la población Y sean idénticos calculado como,

$$J_{yy} = \sum q_i^2$$

donde  $p_i$  y  $q_i$  son las frecuencias alélicas para la población X y Y, respectivamente.

A partir de las coordenadas geográficas de las localidades (3 de la región centro de México y 1 de la región sureste) y de las coordenadas de la ciudad de Antananarivo (representante de la región central de Madagascar) se obtuvieron las distancias geográficas entre ellas y se construyeron las matrices de distancias correspondientes. Utilizando el programa Mantel Nonparametric Test Calculator Ver. 2.00 [Liedloff, 1999] se analizaron las matrices de distancias genéticas de Nei



[1978] junto a las de distancias geográficas para encontrar la correlación entre distancias por medio del método de matrices de Mantel [1967]. Este método se basa en el supuesto de que dos matrices de distancias no se encuentran correlacionadas y que la relación que pudiera darse entre éstas se debe al azar. El programa calcula el valor de  $Z$  (coeficiente de Mantel) entre ambas matrices, realiza una permutación azarosa en ambas matrices (repetiendo este proceso entre 100 y 10,000 veces) obteniendo el valor de  $Z$  para cada iteración, y compara el valor obtenido de  $Z$  de la matriz original y los de las iteraciones con una distribución normal estandarizada (utilizando los valores de significancia más comunes). Si las distancias genéticas y geográficas tienen una correlación positiva, es decir se encuentran correlacionadas, el valor de  $Z$  obtenido de la matriz original será mayor que los valores obtenidos por la aleatorización. Además, calcula el valor de  $g$  (variado normal estandarizado) y el de  $r$  (coeficiente de correlación). El valor de  $g$  puede ser comparado con los valores críticos (dados por los niveles de significancia de  $p = 0.01$ ,  $p = 0.025$  y  $p = 0.05$ ) para rechazar o no la hipótesis nula ("no hay asociación entre los elementos de ambas matrices comparadas").

Finalmente, para la creación de fenogramas se utilizó el programa TreeCon Ver. 1.3b [Van de Peer y De Wachter, 1997] el cual ha sido desarrollado para la construcción y dibujo de árboles filogenéticos basados en distancias evolutivas utilizando diversos algoritmos. Por medio de la distancia genética ( $GD$ ) de Nei y Li [1979],

$$GD_{xy} = 1 - (2 N_{xy}) / (N_x + N_y)$$

donde  $N_{xy}$  es el número de bandas compartidas en las muestras X y Y,  $N_x$  es el número de bandas en la muestra X, y  $N_y$  es el número de bandas en la muestra Y, se crearon dendrogramas por el método de agrupamiento UPGMA y por el método de Neighbor-Joining para todas las muestras y para todas aquellas muestras, asociándolas en grupos, con un patrón de bandeo diferente (no redundante) con el fin de simplificar y disminuir el tamaño del dendrograma.

Para demostrar la robustez de los árboles formados por el método de UPGMA y Neighbor-Joining se realizaron análisis de bootstrap, el cual es como un análisis estadístico para probar la confianza de las ramificaciones en los árboles filogenéticos. Los métodos de bootstrap permiten crear pseudoréplicas de los datos cuando el remuestreo verdadero es impráctico o imposible de realizar, y permite saber si la distribución de los caracteres está influenciada por efectos estocásticos. Las pseudoréplicas, del mismo tamaño que las originales, son generadas al muestrear al azar la matriz original de caracteres, y las frecuencias en las que se van encontrando las ramificaciones de estas pseudoréplicas se van guardando como una proporción que puede ser utilizada para demostrar la confianza de las ramificaciones individuales [Hillis *et al.*, 1996]. En este estudio se realizaron 100 pseudoréplicas por el método de bootstrap durante la creación de los fenogramas.

## RESULTADOS

De la región del centro de México se utilizaron en total 35 cisticercos de *T. solium*, de los cuales 16 cisticercos provinieron de 6 cerdos infectados en la localidad de Zacatepec, Morelos, 11 provinieron de 5 cerdos infectados en Cuentepec, Morelos y 8 se obtuvieron de 2 cerdos de Huatlatlauca, Puebla. De los 35 cisticercos obtenidos de la región central, 3 se extrajeron de tejido nervioso cerebral (2 de Zacatepec y 1 de Cuentepec) y el resto (32) se extrajeron de tejido muscular (extremidad posterior derecha e izquierda, extremidad anterior derecha e izquierda y diafragma). De la región sureste de México se utilizaron 16 cisticercos de *T. solium*, todos provenientes de 6 cerdos infectados en la localidad de Kochol, Yucatán. De éstos, 4 cisticercos se extrajeron de tejido nervioso cerebral y 12 de tejido muscular (extremidad posterior derecha y extremidad anterior derecha). Se utilizaron 39 cisticercos obtenidos de 9 cerdos provenientes de la región central de Madagascar. Cuatro cisticercos se obtuvieron de 1 cerdo sacrificado en un rastro de la localidad de Fianarantsoa y 35 cisticercos se obtuvieron de 8 cerdos sacrificados en rastros de la ciudad de Antananarivo, todos se encontraron alojados en tejido muscular (extremidad posterior, lomo, extremidad anterior y lengua). En la tabla 3 se muestran todos los cisticercos obtenidos con su clave correspondiente, su ubicación anatómica, localidad y país del que provinieron.

Tabla 3. Regiones geográficas de donde se obtuvieron los cerdos cisticercos y clasificación de los cisticercos.

País	Región	Localidad/ Coordenada	Tejido muscular					Tejido nervioso
			E.P.* derecha	E.P. izquierda	Diafragma	E.A.* derecha	E.A. izquierda	Cerebro
México	Centro	Zacatepec, Morelos Lat 18°38'N Long 99°12'W	MxP01C01-1	MxP01C02-2	MxP01C03-3			MxP05C06-14
			MxP04C01-4	MxP04C02-5	MxP04C03-6	MxP04C04-7		
			MxP05C01-9			MxP05C04-12		
				MxP06C01-15			MxP06C04-16	
				MxP07C01-17			MxP07C04-18	
				MxP10C01-19			MxP10C04-20	MxP10C06-21
	Centro	Cuentepec, Morelos Lat 18°51'N Long 99°19'W	MxP11C01-22			MxP11C04-23		MxP11C06-24
MxP12C01-25					MxP12C04-26			
MxP13C01-27					MxP13C04-28			
MxP14C01-29					MxP14C04-30			
			MxP15C01-31			MxP15C04-32		
		Huatlatlauca, Puebla Lat 18°40'N Long 98°2'W	MxP02C01-33	MxP02C02-34		MxP02C04-35	MxP02C05-36	
				MxP03C02-38	MxP03C03-39	MxP03C04-40	MxP03C05-41	
	Sureste	Kochol, Yucatán Lat 20°37'N Long 90°9'W	MxP08C01-1			MxP08C04-2		MxP08C06-3
MxP09C01-4					MxP09C04-5			
MxP16C01-7					MxP16C04-8			
MxP17C01-10					MxP17C04-11		MxP17C06-12	
MxP18C01-13					MxP18C04-14		MxP18C06-15	
MxP19C01-16					MxP19C04-17		MxP19C06-18	
			<b>Tejido muscular</b>					
Madagascar	Centro	Antananarivo Lat 18°55'S Long 47°31'E	MgP107-1	MgP107-2	MgP112-3	MgP117-4	MgP112-5	MgP114-6
			MgP116-7	MgP117-8	MgP121-9	MgP102-10	MgP107-11	MgP114-12
			MgP111-13	MgP112-14	MgP114-15	MgP121-16	MgP117-17	MgP121-18
			MgP102-19	MgP107-20	MgP117-21	MgP111-22	MgP112-23	MgP114-24
			MgP116-25	MgP117-26	MgP121-27	MgP102-28	MgP107-29	MgP110-30
			MgP112-32	MgP114-33	MgP116-34	MgP117-35	MgP121-36	MgP102-37
			MgP107-38	MgP111-39	MgP112-40			

\* E.P. = Extremidad posterior; E.A. = Extremidad anterior; Mx = México; Mg = Madagascar; P = Número de cerdo; C = Región anatómica del cerdo de donde se obtuvo el cisticerco y número de cisticerco.

9/5

Los 9 diferentes oligos probados produjeron bandas por lo cual todos fueron incluidos en el análisis. Incluyendo a *T. crassiceps* ORF en el proceso de obtención de bandas de presencia y ausencia, se obtuvieron en total 161 loci, a partir de los cuales se obtuvieron los dendrogramas; Con los oligos 01 y A03 se obtuvieron 18 loci, con el oligo 02 se obtuvieron 19 loci, con los oligos 03 y A07 se obtuvieron 17 loci, con el oligo 04 se obtuvieron 16 loci, con los oligos 05 y 06 se obtuvieron 21 loci, y con el oligo A13 se obtuvieron 14 loci. Sin incluir a *T. crassiceps* ORF en el análisis, se obtuvieron 113 loci; Con los oligos 01, 02 y 04 se obtuvieron 12 loci, con el oligo 03 se obtuvieron 10 loci, con el oligo 05 se obtuvieron 17 loci, con los oligos 06, A03 y A07 se obtuvieron 13 loci, y con el oligo A13 se obtuvieron 11 loci.

Los 113 loci obtenidos por RAPDs de los 90 individuos de *T. solium* (sin incluir a *T. crassiceps* ORF) fueron evaluados para la obtención de los datos poblacionales. Se calcularon las frecuencias alélicas, tanto para la banda presente (1) como para la ausente (0), para todos los loci en diferentes niveles jerárquicos (anexo 1):

- 1) Para México y Madagascar juntos (anexo 1-a) y separados (anexo 1-b);
- 2) Para las regiones centro y sureste de México juntas (anexo 1-c) y separadas (anexo 1-d);
- 3) Para las regiones centro y sureste de México, y Madagascar juntas (anexo 1-e);
- 4) Para las 4 localidades de México juntas (anexo 1-f);
- 5) Para las 3 localidades del centro de México juntas (anexo 1-g) y separadas (anexo 1-h).

En la tabla 4 se presentan los valores del número de alelos, número efectivo de alelos, diversidad genética de Nei, índice informativo de Shannon y loci polimórficos obtenidos para los diferentes niveles poblaciones analizadas (todos los individuos juntos, los dos países, las tres regiones y las cuatro localidades).

**Tabla 4.** Número de individuos muestreados, número de alelos, número efectivo de alelos, diversidad genética de Nei, índice informativo de Shannon y loci polimórficos.

	$N^*$	$n_a^*$	$n_e^*$	$h^*$	$I^*$	$P^*$
<b>Todos</b>	90	1.4336 (±0.4978)	1.2589 (±0.3616)	0.1491	0.2206	49 (43.36%)
<b>Países</b>						
México	51	1.1327 (±0.3408)	1.0735 (±0.2375)	0.0412	0.0614	15 (13.27%)
Madagascar	39	1.1947 (±0.3977)	1.0520 (±0.1298)	0.0380	0.0635	22 (19.47%)
<b>Regiones</b>						
México Centro	35	1.0708 (±0.2576)	1.0222 (±0.1102)	0.0147	0.0241	8 (7.08%)
México Sureste	16	1.0088 (±0.0941)	1.0085 (±0.0908)	0.0043	0.0061	1 (0.88%)
Madagascar	39	1.1947 (±0.3977)	1.0520 (±0.1298)	0.0380	0.0635	22 (19.47%)
<b>Localidades</b>						
Zacatepec	16	1.0531 (±0.2252)	1.0190 (±0.1017)	0.0126	0.0207	6 (5.31%)
Cuentepec	11	1.0265 (±0.1615)	1.0125 (±0.0836)	0.0081	0.0127	3 (2.65%)
Huatlatlauca	8	1.0177 (±0.1324)	1.0125 (±0.0937)	0.0073	0.0107	2 (1.77%)
Kochol	16	1.0088 (±0.0941)	1.0085 (±0.0908)	0.0043	0.0061	1 (0.88%)

\*  $N$  = número de individuos;  $n_a$  = Número de alelos;  $n_e$  = Número efectivo de alelos;  $h$  = Diversidad genética de Nei;  $I$  = Índice de Información de Shannon;  $P$  = Número de loci polimórficos.

Se puede observar que existe una baja diversidad genética de Nei ( $h$ ) dentro de cada país analizado (0.0412 y 0.0380 para México y Madagascar, respectivamente) y ésta aumenta a 0.1491 cuando se analizaron todas las muestras juntas. Entre las regiones de México la mayor diversidad genética de Nei

se obtuvo en el centro, siendo de 0.0147, mientras que en el sureste fue de 0.0043. Dentro de la región centro de México la mayor diversidad genética se presentó en Zacatepec (0.0126), mientras que en Cuentepec y Huatlatlauca fue de 0.0081 y 0.0073, respectivamente. De 113 loci analizados en 90 individuos de *T. solium*, 49 resultaron polimórficos (43.36%). En México el número de loci polimórficos fue de 15 (13.27%), mientras que en Madagascar fue de 22 (19.47%). Para la región centro de México fue de 8 (7.08%) y para la región sureste de México fue de 1 (0.88%). En las regiones del centro de México, el número de loci polimórficos en Zacatepec fue de 6 (5.31%), en Cuentepec fue de 3 (2.65%) y en Huatlatlauca fue de 2 (1.77%).

Los valores de diferenciación genética y flujo génico se obtuvieron para cada uno de los loci analizados en los diferentes niveles jerárquicos (anexo 2):

- 1) Entre México y Madagascar (anexo 2-a);
- 2) Entre las tres regiones (anexo 2-b);
- 3) Entre las dos regiones de México (anexo 2-c);
- 4) Entre las cuatro localidades de México (anexo 2-d);
- 5) Entre las tres localidades del centro de México (anexo 2-e).

La heterocigosidad esperada sobre la población total ( $H_T$ ) y entre las subpoblaciones ( $H_S$ ), la diferenciación entre poblaciones ( $G_{ST}$ ) y el flujo génico ( $Nm$ ) promedio obtenidos entre países, regiones y localidades de manera conjunta y pareada se presentan en la tabla 5.

**Tabla 5.** Heterocigosis, diferenciación entre poblaciones, flujo génico y loci polimórficos entre países, regiones y localidades.

	$H_T (\pm D.E.)^*$	$H_S (\pm D.E.)^*$	$G_{ST}^*$	$Nm^*$	$P^*$
<b>Países</b>					
México-Madagascar	0.1634 ( $\pm 0.0494$ )	0.0396 ( $\pm 0.0082$ )	0.7577	0.1599	49 (43.36%)
<b>Regiones</b>					
Centro-Sureste-Madagascar	0.1541 ( $\pm 0.0430$ )	0.0190 ( $\pm 0.0030$ )	0.8767	0.0703	49 (43.36%)
<b>Regiones México</b>					
Centro-Sureste	0.0462 ( $\pm 0.0199$ )	0.0095 ( $\pm 0.0026$ )	0.7945	0.1294	15 (13.27%)
<b>Regiones pareadas</b>					
Centro-Madagascar	0.1546 ( $\pm 0.0487$ )	0.0263 ( $\pm 0.0045$ )	0.8297	0.1026	46 (40.71%)
Sureste-Madagascar	0.1601 ( $\pm 0.0517$ )	0.0212 ( $\pm 0.0034$ )	0.8677	0.0762	42 (37.17%)
Centro-Sureste	0.0462 ( $\pm 0.0199$ )	0.0095 ( $\pm 0.0026$ )	0.7945	0.1294	15 (13.27%)
<b>Localidades México</b>					
Zacat.-Cuent.-Huat-Koch.	0.0387 ( $\pm 0.0132$ )	0.0081 ( $\pm 0.0016$ )	0.7907	0.1323	15 (13.27%)
<b>Localidades Centro</b>					
Zacat.-Cuent.-Huat	0.0119 ( $\pm 0.0032$ )	0.0094 ( $\pm 0.0018$ )	0.2112	1.8670	8 (7.08%)
<b>Localidades pareadas</b>					
Zacat.-Cuent.	0.0118 ( $\pm 0.0024$ )	0.0104 ( $\pm 0.0017$ )	0.1234	3.5534	8 (7.08%)
Zacat.-Huat.	0.0134 ( $\pm 0.0038$ )	0.0100 ( $\pm 0.0019$ )	0.2526	1.4790	7 (6.19%)
Zacat.-Koch.	0.0448 ( $\pm 0.0185$ )	0.0085 ( $\pm 0.0015$ )	0.8102	0.1172	14 (12.39%)
Cuent.-Huat.	0.0085 ( $\pm 0.0035$ )	0.0077 ( $\pm 0.0028$ )	0.0944	4.7985	3 (2.65%)
Cuent.-Koch.	0.0463 ( $\pm 0.0202$ )	0.0062 ( $\pm 0.0021$ )	0.8656	0.0776	12 (10.62%)
Huat.-Koch.	0.0464 ( $\pm 0.0206$ )	0.0058 ( $\pm 0.0022$ )	0.8741	0.0720	11 (9.73%)

\*  $H_T$  = Diversidad genética total;  $H_S$  = Diversidad genética en las poblaciones;  $G_{ST}$  = Coeficiente de diferenciación genética;  $Nm$  = Estimado de flujo génico entre poblaciones;  $P$  = Loci polimórficos; D.E. = Desviación estándar; Zacat. = Zacatepec, Morelos; Cuent. = Cuentepec, Morelos; Huat. = Huatlatlauca, Puebla; Koch. = Kochol, Yucatán.

Los valores de heterocigosidad esperada sobre la población total y entre las subpoblaciones son bajos: El total de la muestra mostró el mayor valor de  $H_T$ , 0.1634, el menor valor fue entre Cuentepec y Huatlatlauca (0.0084). Se presentaron valores altos de diferenciación genética ( $G_{ST}$ ) entre México y



Madagascar (0.7577), entre las tres regiones (0.8767), entre las dos regiones de México estudiadas (0.7945), entre las cuatro localidades de México (0.7907) y entre cada localidad del centro pareada con la del sureste ( $G_{ST}$  Zacatepec-Kochol = 0.8102;  $G_{ST}$  Cuentepec-Kochol = 0.8656;  $G_{ST}$  Huatlatlauca-Kochol = 0.8741). La diferenciación genética calculada entre las tres localidades del centro de México resultó baja en comparación con los valores obtenidos entre regiones y países (0.2112). Igualmente, los valores de diferenciación genética calculados de manera pareada entre las tres localidades del centro de México (Zacatepec-Cuentepec, Zacatepec-Huatlatlauca y Cuentepec-Huatlatlauca) resultaron bajos en comparación con los valores obtenidos entre regiones, siendo 0.2526 el valor más alto presente entre Zacatepec y Huatlatlauca. El flujo génico ( $Nm$ ) estimado a partir de  $G_{ST}$  entre estas tres localidades juntas y pareadas fue considerablemente más alto que el obtenido entre países, regiones y localidades del centro pareadas con la del sureste.

Para la búsqueda de diferencias genéticas entre cisticercos alojados en distintas ubicaciones anatómicas del hospedero intermediario (tejido muscular y cerebral), se analizaron en PopGene los patrones de bandeo de cisticercos obtenidos de músculo con los obtenidos de cerebro procedentes del mismo cerdo, y de cisticercos obtenidos de músculo y cerebro de cerdos procedentes de la misma localidad. Sin embargo, no se presentó diferenciación genética entre aquellos alojados en músculo y cerebro pertenecientes al mismo cerdo o entre cisticercos alojados en músculo y cerebro pertenecientes a las mismas localidades, por lo cual los resultados no se muestran.

En el programa PopGene Ver. 1.31 se calcularon las distancias genéticas de Nei [1972] (los datos no se muestran) y las distancias genéticas sin sesgo de Nei [1978] entre regiones (tabla 6) y entre localidades (tabla 7). La menor distancia genética se presentó entre las regiones centro y sureste de México (0.0769), seguida por la distancia entre centro y Madagascar (0.3055), y sureste y Madagascar (0.3333). Entre localidades, la menor distancia genética se presentó entre Cuentepec y Huatlatlauca (0.0012), siendo estas localidades de diferentes estados de la República Mexicana, mientras que la distancia entre Zacatepec y Cuentepec (localidades pertenecientes al mismo estado) fue de 0.0030. Entre Kochol y Huatlatlauca se presentó la mayor distancia genética (0.0847), seguida por Kochol y Cuentepec (0.0839), y Kochol y Zacatepec (0.0757).

**Tabla 6. Identidad y distancia genética sin sesgo de Nei [1978] entre regiones.**

Región	CENTRO	SURESTE	MADAGASCAR
CENTRO	****	0.9260	0.7368
SURESTE	0.0769	****	0.7165
MADAGASCAR	0.3055	0.3333	****

Identidad genética (arriba de la diagonal) y distancia genética (debajo de la diagonal). Los cisticercos pertenecientes a las regiones se indican en la tabla 3.

**Tabla 7. Identidad y distancia genética sin sesgo de Nei [1978] entre localidades.**

Localidad	ZACATEPEC	CUENTEPEC	HUATLATLAUCA	KOCHOL
ZACATEPEC	****	0.9975	0.9936	0.9271
CUENTEPEC	0.0026	****	0.9988	0.9195
HUATLATLAUCA	0.0064	0.0012	****	0.9187
KOCHOL	0.0757	0.0839	0.0847	****

Identidad genética (arriba de la diagonal) y distancia genética (debajo de la diagonal). Los cisticercos pertenecientes a las localidades se indican en la tabla 3.

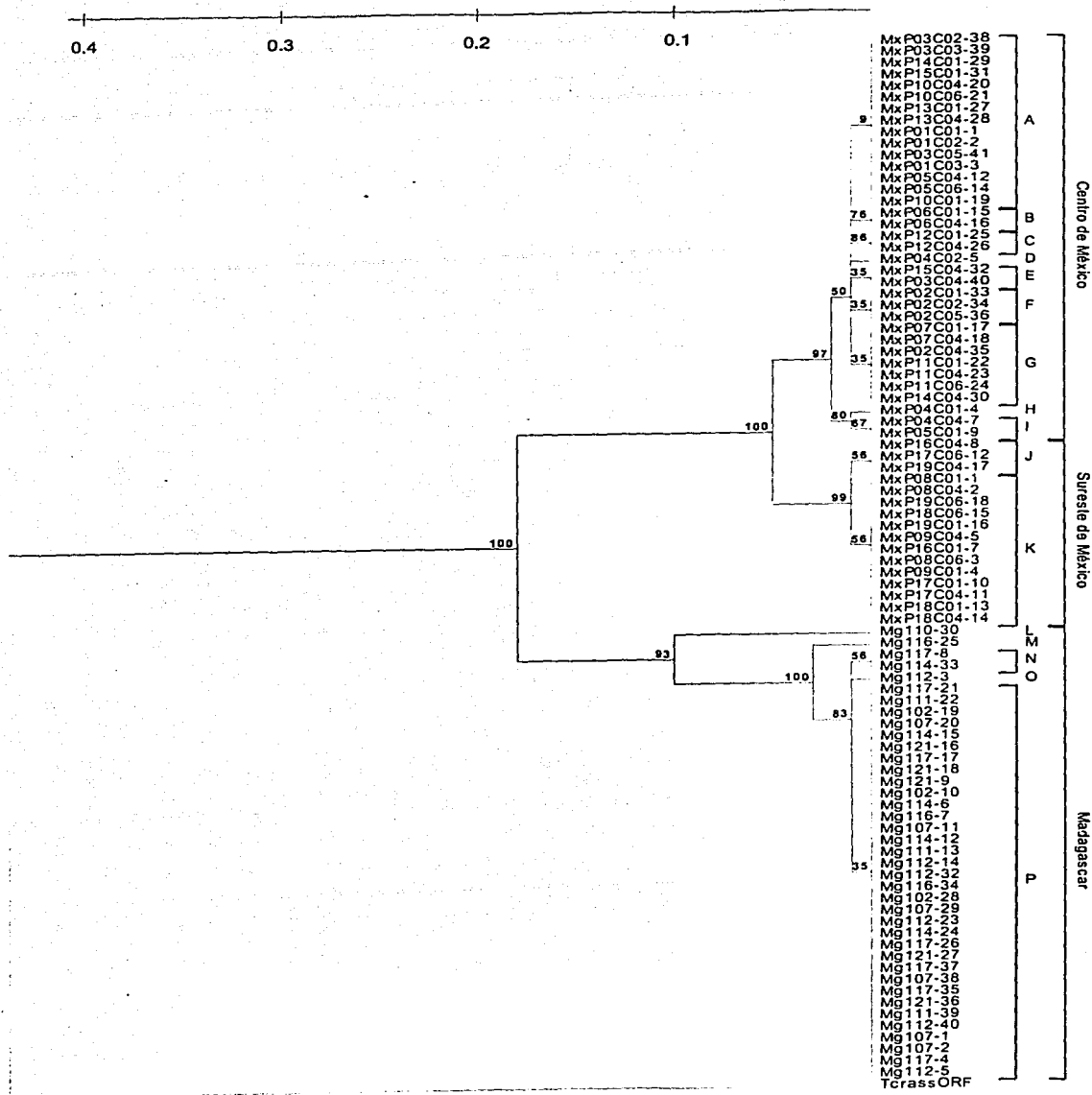
Con respecto a la prueba de Mantel, se obtuvo una correlación positiva entre las matrices de distancias genéticas y geográficas para las cuatro localidades de México y Madagascar (tabla 8). La Z calculada después de 10,000 iteraciones fue menor que la Z original, por lo que hubo una correlación positiva entre ambas distancias. El valor de la Z original fue de 40,416.6, el valor de  $r$  fue de 0.980, y el valor de  $g$  fue de 1.969 ( $g >$  valor crítico 1.645,  $p = 0.05$ ), por lo que se rechazó la hipótesis nula (no hay asociación entre ambas distancias) y se concluyó que las distancias genéticas y geográficas entre las localidades de México y Madagascar se encuentran relacionadas.

**Tabla 8.** Distancias genéticas de Nei [1978] y distancias geográficas (km) entre localidades de México y Madagascar.

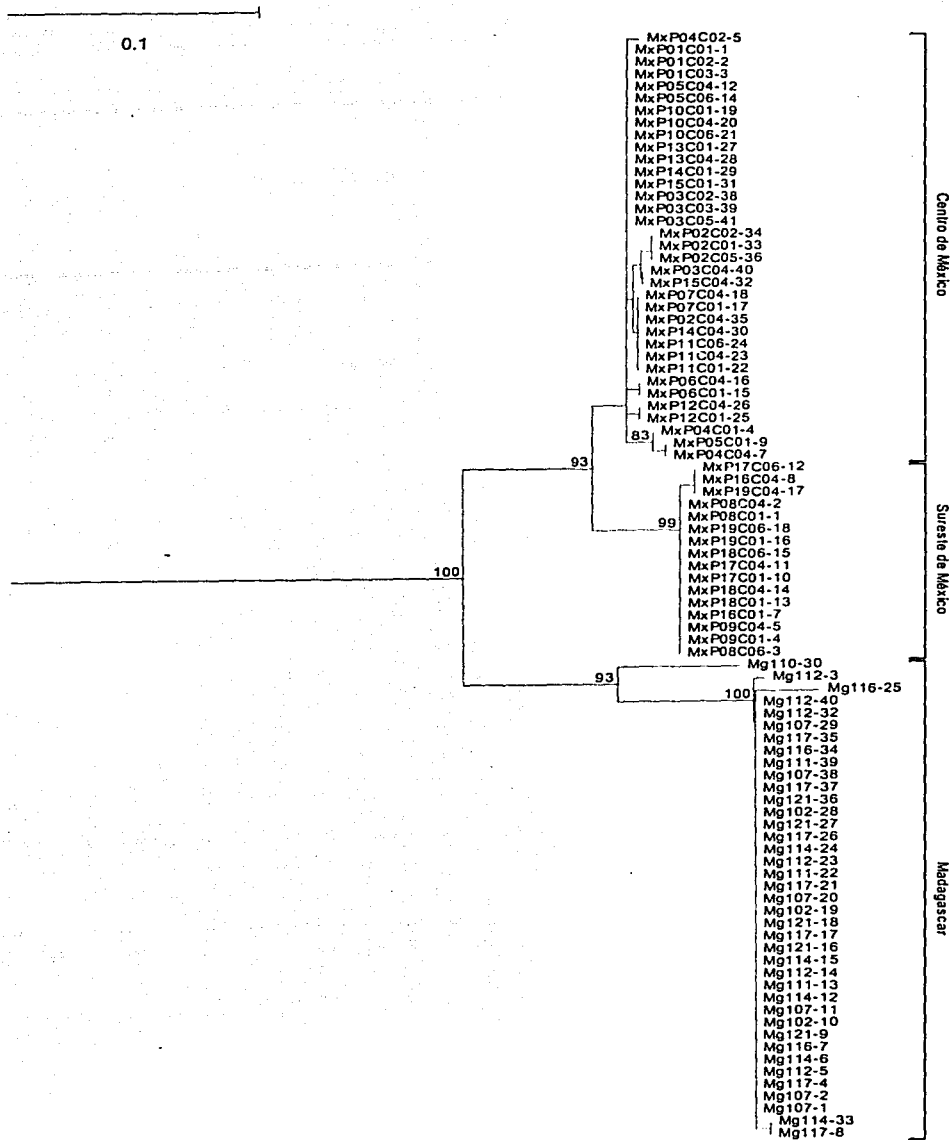
	ZACATEPEC	CUENTEPEC	HUATLATLAUCA	KOCHOL	MADAGASCAR
ZACATEPEC	****	25.9	122.9	969.7	16234.9
CUENTEPEC	0.0026	****	136.4	976.4	16252.9
HUATLATLAUCA	0.0064	0.0012	****	849.9	16110.1
KOCHOL	0.0757	0.0839	0.0847	****	15314.7
MADAGASCAR	0.3058	0.3047	0.3078	0.3333	****

Distancias genéticas (debajo de la diagonal) y distancias geográficas (arriba de la diagonal).

En fenogramas construidos con los algoritmos UPGMA y Neighbor-Joining (fig. 9 y 10) puede observarse que los cisticercos provenientes del centro de México, sureste de México y Madagascar formaron grupos claramente diferenciados. En ninguno de los casos los cisticercos fueron separados según las localidades de las cuales fueron obtenidos. La muestra de *T. crassiceps* ORF en todos los casos formó un grupo separado de las muestras de *T. solium*, presentando una distancia genética cercana a 0.4. Fenogramas formados sin incluir a *T. crassiceps* ORF mostraron la misma topología (los datos no se muestran).



**Figura 9:** Fenograma construido por el método de UPGMA a partir de las distancias genéticas de Nei y Li [1979] entre todos los cisticercos de *T. solium* incluyendo a la muestra de *T. crassiceps* ORF (TcrassORF). Grupos de individuos con distancias genéticas de cero se denotan por las letras A-P (ver tabla 9). Se presentan los valores de bootstrap (100 repeticiones). Mx = México; Mg = Madagascar.



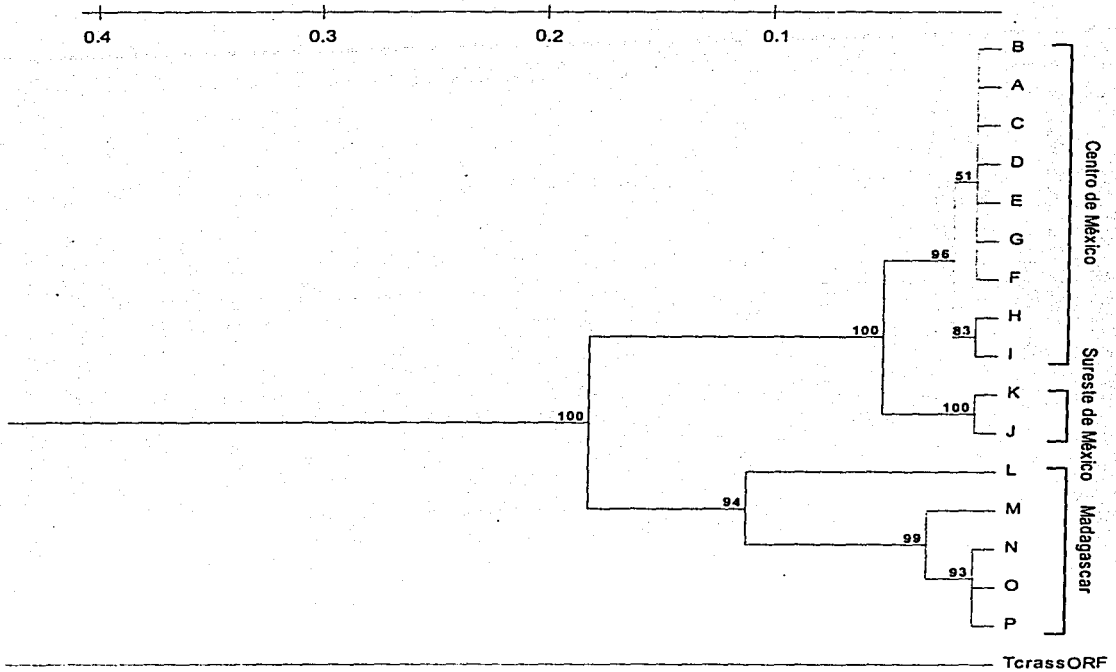
**Figura 10:** Fenograma construido por el método de Neighbor-Joining a partir de las distancias genéticas de Nei y Li [1979] entre todos los cisticercos de *T. solium* incluyendo a la muestra de *T. crassiceps* ORF (TcrassORF). Se muestran únicamente los valores de bootstrap mayores a 80 (100 repeticiones). Mx = México; Mg = Madagascar.

Resulta claramente visible que varios individuos presentan distancias equivalentes a cero. Aquellos individuos con distancias equivalentes a cero se asociaron en grupos no redundantes (tabla 9) y se construyeron fenogramas por medio de los métodos de UPGMA (fig. 11) y Neighbor-Joining (fig. 12). Los fenogramas formados por ambos métodos presentaron básicamente la misma topología, excepto que por medio de UPGMA, el grupo M quedó externo a los grupos N, O y P, mientras que por medio de Neighbor-Joining el grupo O quedó externo a M, N y P; Además, por UPGMA los grupos A a G formaron una gran politomía, mientras que por medio de Neighbor-Joining los grupos E, F y G se agruparon por separado.

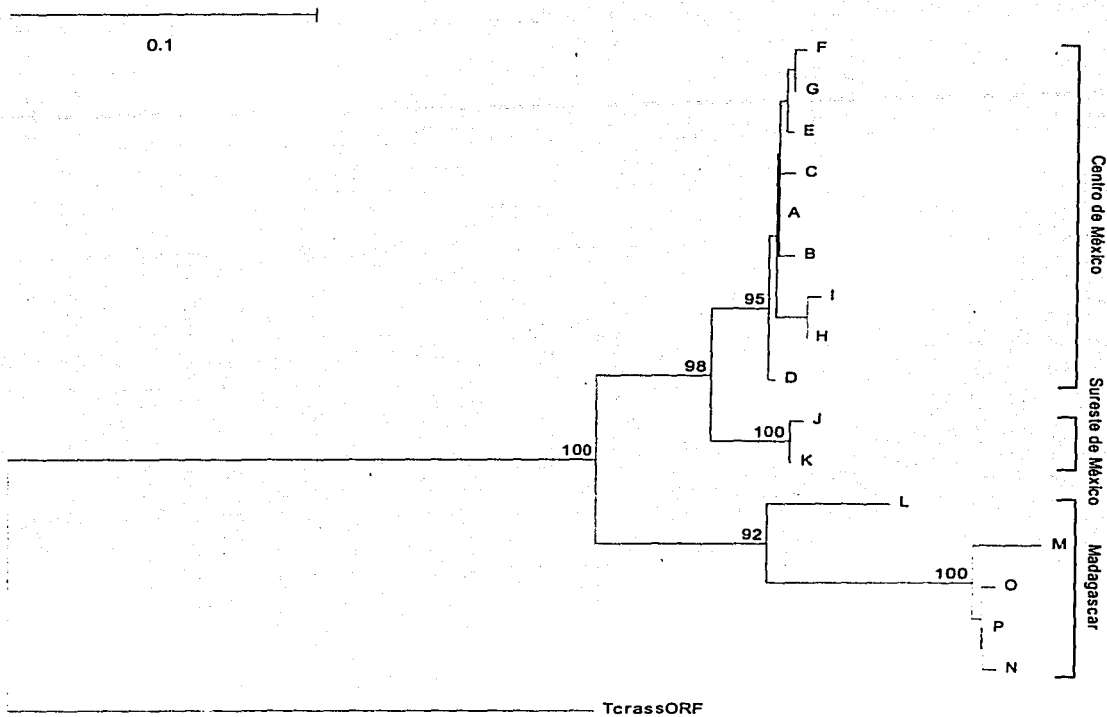
Tabla 9. Grupos de cisticercos de *T. solium* con distancias genéticas de Nei y Li [1979] de cero.

Región	Grupo	Individuos
Centro de México	A	MxP01C01-1, MxP01C02-2, MxP01C03-3, MxP05C04-12, MxP05C06-14, MxP10C01-19, MxP10C04-20, MxP10C06-21, MxP13C01-27, MxP13C04-28, MxP14C01-29, MxP15C01-31, MxP03C02-38, MxP03C03-39, MxP03C05-41
	B	MxP06C01-15, MxP06C04-16
	C	MxP12C01-25, MxP12C04-26
	D	MxP04C02-5
	E	MxP15C04-32, MxP03C04-40
	F	MxP02C01-33, MxP02C02-34, MxP02C05-36
	G	MxP07C01-17, MxP07C04-18, MxP11C01-22, MxP11C04-23, MxP11C06-24, MxP14C04-30, MxP02C04-35
	H	MxP04C01-4
	I	MxP04C04-7, MxP05C01-9
Sureste de México	J	MxP16C04-8, MxP17C06-12, MxP19C04-17
	K	MxP08C01-1, MxP08C04-2, MxP08C06-3, MxP09C01-4, MxP09C04-5, MxP16C01-7, MxP17C01-10, MxP17C04-11, MxP18C01-13, MxP18C04-14, MxP18C06-15, MxP19C01-16, MxP19C06-18
Madagascar	L	Mg110-30
	M	Mg116-25
	N	Mg117-8, Mg114-33
	O	Mg112-3
	P	Mg107-1, Mg107-2, Mg117-4, Mg112-5, Mg114-6, Mg116-7, Mg121-9, Mg102-10, Mg107-11, Mg114-12, Mg111-13, Mg112-14, Mg114-15, Mg121-16, Mg117-17, Mg121-18, Mg102-19, Mg107-20, Mg117-21, Mg111-22, Mg112-23, Mg114-24, Mg117-26, Mg121-27, Mg102-28, Mg107-29, Mg112-32, Mg116-34, Mg117-35, Mg121-36, Mg117-37, Mg107-38, Mg111-39, Mg112-40

Mx = México; Mg = Madagascar; P = Número de cerdo; C = Región anatómica del cerdo de donde se obtuvo el cisticerco y número de cisticerco.



**Figura 11:** Fenograma construido por el método de UPGMA a partir de las distancias genéticas de Nei y Li [1979] entre grupos de cisticercos de *T. solium* con distancias genéticas de cero incluyendo a la muestra de *T. crassiceps* ORF (TcrassORF). Se presentan los valores de bootstrap mayores a 50 (100 repeticiones).



**Figura 12:** Fenograma construido por el método de Neighbor-Joining a partir de las distancias genéticas de Nei y Li [1979] entre grupos de cisticercos de *T. solium* con distancias genéticas de cero incluyendo a la muestra de *T. crassiceps* ORF (TcrassORF). Se presentan únicamente los valores de bootstrap mayores a 90 (100 repeticiones).



En todos los fenogramas se presentan los valores de bootstrap (100 repeticiones). Puede observarse que en todos los fenogramas las ramificaciones de México y Madagascar son robustas (100 valores de bootstrap), así como las ramas que dividen a los grupos del centro de México, sureste de México y Madagascar.

En la tabla 10 se presentan las distancias genéticas de Nei y Li [1979] entre estos grupos de cisticercos. Los menores valores de distancia se obtuvieron entre grupos de cisticercos pertenecientes a las mismas regiones (oscilando entre 0.0052 y 0.0061), pero cuando se compararon grupos de cisticercos pertenecientes a distintas regiones las distancias genéticas aumentaron considerablemente: Entre grupos de cisticercos del centro y sureste de México las distancias oscilaron entre 0.0430 y 0.0588; Entre grupos del centro y Madagascar las distancias oscilaron entre 0.1428 y 0.2023; Entre grupos del sureste y Madagascar las distancias oscilaron entre 0.1511 y 0.2023. Las distancias genéticas entre todos los grupos de cisticercos de *T. solium* y la muestra de *T. crassiceps* ORF son ligeramente mayores a 0.4.

Tabla 10. Identidad y distancia genética de Nei y Li [1979] entre grupos de cisticercos.

Grupo	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Tc
A	****	0.9947	0.9947	0.9947	0.9947	0.9894	0.9947	0.9895	0.9842	0.9462	0.9518	0.8571	0.8092	0.8181	0.8181	0.8248	0.5769
B	0.0052	****	0.9895	0.9894	0.9894	0.9842	0.9895	0.9844	0.9791	0.9411	0.9468	0.8522	0.8046	0.8135	0.8135	0.8202	0.5741
C	0.0052	0.0104	****	0.9894	0.9894	0.9842	0.9895	0.9844	0.9791	0.9411	0.9468	0.8522	0.8046	0.8135	0.8135	0.8202	0.5741
D	0.0052	0.0105	0.0105	****	0.9893	0.9841	0.9894	0.9842	0.9789	0.9513	0.9569	0.8505	0.8023	0.8114	0.8228	0.8181	0.5797
E	0.0052	0.0105	0.0105	0.0106	****	0.9947	0.9894	0.9842	0.9789	0.9513	0.9462	0.8505	0.8023	0.8228	0.8114	0.8181	0.5700
F	0.0105	0.0157	0.0157	0.0158	0.0052	****	0.9947	0.9791	0.9738	0.9462	0.9411	0.8457	0.7976	0.8181	0.8068	0.8135	0.5673
G	0.0052	0.0104	0.0104	0.0105	0.0105	0.0052	****	0.9844	0.9791	0.9411	0.9468	0.8522	0.8046	0.8135	0.8135	0.8202	0.5741
H	0.0104	0.0155	0.0155	0.0157	0.0157	0.0208	0.0155	****	0.9948	0.9361	0.9418	0.8474	0.8000	0.8089	0.8089	0.8156	0.5714
I	0.0157	0.0208	0.0208	0.0210	0.0210	0.0261	0.0208	0.0051	****	0.9411	0.9468	0.8522	0.7931	0.8022	0.8022	0.8089	0.5645
J	0.0537	0.0588	0.0588	0.0486	0.0486	0.0537	0.0588	0.0638	0.0588	****	0.9945	0.8421	0.7810	0.8023	0.8023	0.7976	0.5784
K	0.0481	0.0531	0.0531	0.0430	0.0537	0.0588	0.0531	0.0582	0.0531	0.0054	****	0.8488	0.7882	0.7976	0.8092	0.8046	0.5853
L	0.1428	0.1477	0.1477	0.1494	0.1494	0.1542	0.1477	0.1525	0.1477	0.1578	0.1511	****	0.8734	0.8944	0.8944	0.9012	0.5181
M	0.1907	0.1954	0.1954	0.1976	0.1976	0.2023	0.1954	0.2000	0.2069	0.2189	0.2117	0.1265	****	0.9685	0.9685	0.9750	0.5235
N	0.1818	0.1864	0.1864	0.1885	0.1771	0.1818	0.1864	0.1910	0.1977	0.1976	0.2023	0.1055	0.0314	****	0.9876	0.9938	0.5360
O	0.1818	0.1864	0.1864	0.1771	0.1885	0.1931	0.1864	0.1910	0.1977	0.1976	0.1907	0.1055	0.0314	0.0123	****	0.5360	0.5463
P	0.1751	0.1797	0.1797	0.1818	0.1818	0.1864	0.1797	0.1843	0.1910	0.2023	0.1954	0.0987	0.0250	0.0061	0.0061	****	0.5435
Tc	0.4230	0.4258	0.4258	0.4202	0.4299	0.4326	0.4258	0.4285	0.4354	0.4215	0.4246	0.4818	0.4764	0.4639	0.4536	0.4564	****

Identidad genética (arriba de la diagonal) y distancia genética (debajo de la diagonal). Los cisticercos pertenecientes a los grupos se indican en la tabla 9. La distancia e identidad genética sin *T. crassiceps* ORF es la misma, simplemente se elimina el grupo Tc (*T. crassiceps* ORF).

## DISCUSIÓN

En este trabajo, utilizando nueve oligos diferentes se obtuvieron 113 loci (sin considerar a *T. crassiceps* ORF), el cual es un número adecuado para estimar los parámetros de variabilidad y diferenciación genética. Un alto número de loci permite consolidar los análisis [Nei, 1987]. La cantidad de loci polimórficos entre México y Madagascar fue relativamente alta (43.36%) en comparación con otros trabajos (tabla 11) y varios de estos loci se presentaron diferencialmente entre poblaciones. La presencia de estos loci raros puede deberse a que las poblaciones estudiadas presenten fijación de ciertos alelos, lo que posiblemente llevó a la alta diferenciación observada.

La variabilidad genética, estimada según la diversidad genética de Nei ( $h$ ), la heterocigosidad promedio total ( $H_T$ ) y en las subpoblaciones ( $H_S$ ), es baja para las poblaciones de *T. solium* analizadas en este trabajo en comparación con la obtenida en otras especies (tabla 11). También se obtuvieron muchos individuos con distancias genéticas de cero, en otras palabras idénticos. No parece probable que esto se deba a que el número de marcadores haya sido bajo, ya que trabajos que han utilizado un menor número de marcadores han encontrado mayor variabilidad en los organismos que estudiaron [Sandoval *et al.*, 1999; Král'ová y Spakulová, 1996]. La baja variabilidad genética encontrada podría explicarse considerando que esta especie presenta un método de reproducción por autofecundación, la cual es el caso más extremo de endogamia. La endogamia

Tabla 11. Comparación de diversos valores poblacionales obtenidos por RAPDs para diversas especies.

Especie	Diversidad genética de Nei ( $h$ )	Heterocigosidad total ( $H_T$ )	Loci Polimórficos (%)	$G_{ST}^*$	$Nm^*$	Referencia
<i>Iris haynei</i> e <i>I. atrofusca</i>	0.258	---	74.2	0.18	1.14	Arafah <i>et al.</i> , 2002
<i>Prunus mahaleb</i> (Rosaceae)	---	0.1441	34.3	0.1935	1.191	Jordano <i>et al.</i> , 2000
<i>Scutellaria indica</i> (Labiatae) <sup>†</sup>	0.008 <sup>1</sup> 0.034	0.378 <sup>1</sup> 0.139	2.36 <sup>1</sup> 8.94	0.926 <sup>1</sup> 0.809	0.02 <sup>1</sup> 0.06	Sun, 1999
<i>Haplostachys haplostachya</i> (Lamiaceae)	---	0.166	44	0.167	---	Morden y Loeffler, 1999
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	0.58	0.27	---	0.34	---	Aagaard <i>et al.</i> , 1998
<i>Isotoma petraea</i> (Lobeliaceae) <sup>†</sup>	---	0.398	---	0.875	---	Bussell, 1999
<i>Pinus contorta</i> y <i>P. Banksiana</i>	---	0.148	---	0.247	---	Ye <i>et al.</i> , 2002
<i>Oryza glumaepatula</i> <sup>†</sup>	---	0.37	---	0.65	---	Buso <i>et al.</i> , 1998
<i>Hordeum spontaneum</i> <sup>†</sup>	---	---	---	0.433	---	Dawson <i>et al.</i> , 1993
<i>Poa annua</i>	0.241	0.245	44	0.146	1.46	Mengistu <i>et al.</i> , 2000
<i>Orobanche cumana</i> <sup>†</sup>	---	---	---	0.577	---	Gagne <i>et al.</i> , 1998
<i>Chandrostereum purpureum</i>	---	0.288	---	0.048	---	Gosselin <i>et al.</i> , 1999
<i>Bemisia tabaci</i> (Aleyrodidae)	---	---	---	0.30 0.26	---	Moya <i>et al.</i> , 2001
<i>Biomphalaria glabrata</i> (Gastropoda) <sup>2</sup>	0.60	0.57	---	0.23	---	Mavárez <i>et al.</i> , 2002
<i>Plasmodium falciparum</i> <sup>2</sup>	---	0.3-0.4 (SAm) 0.76-0.8 (Afr)	---	0.364 (SAm) 0.007 (Afr)	---	Anderson <i>et al.</i> , 2000
<i>Schistosoma mansoni</i> (Trematoda)	---	0.531	---	0.143	---	Prugnolle, 2002
<i>Taenia solium</i> (Cestoda) <sup>1</sup>	0.1491	0.1634	43.36	0.7577	0.1599	Este estudio

<sup>1</sup> Utilizando aloenzimas. <sup>2</sup> Utilizando microsátélites. \*  $G_{ST}$  = coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones; \*  $Nm$  = estimado de flujo génico a partir de  $G_{ST}$ ; <sup>†</sup> Especie con autofecundación. SAm = Sudamérica. Afr = África.

lleva a las poblaciones a una disminución de la heterocigosidad y a que las poblaciones sean un conjunto de clonas separadas [Hartl y Clark, 1989]. Otra característica de las especies con autofecundación es que la alta homocigosidad de los genes provoca que no aparezcan nuevos tipos gaméticos por recombinación en cada nueva generación, retardando o alejando a la especie del equilibrio de ligamiento (el cual es la asociación azarosa entre alelos en diferentes loci) [Hartl y Clark, 1989]. En la tabla 11 puede observarse que las especies con reproducción por autofecundación presentan altos valores de diferenciación genética y baja variabilidad genética (*Scutellaria indica*, *Isotoma petraea*, *Hordeum spontaneum*, *Orobancha cumana* y *Oryza glumaepatula*). Existen poco trabajos que presenten valores de diferenciación, variabilidad y flujo génico entre poblaciones de organismos parásitos, lo que hace difícil la comparación de los resultados obtenidos en esta tesis con otras especies de parásitos.

El desarrollo de vacunas o tratamientos efectivos contra diferentes parasitosis y el inmunodiagnóstico se ve limitado por la variabilidad genética del parásito. Los cisticercos de *T. solium* analizados presentaron gran homogeneidad genética dentro de cada región, pero una clara diferenciación genética entre regiones, lo que significa que el desarrollo de un tratamiento, vacuna o inmunodiagnóstico efectivo contra la cisticercosis podría ser efectivo en una región del país, pero no en otra o en otros países. Así, resulta importante identificar antígenos muy conservados del parásito para el desarrollo de un tratamiento efectivo contra las diferentes variantes que pudieran encontrarse y que aseguren ser efectivos por un largo periodo de tiempo. Por otro lado, la falta de generación

de nuevos tipos gaméticos que pudieran formar nuevos epítopes con propiedades antigénicas diferentes, hace suponer que *T. solium* cambia sus características antigénicas acumulando mutaciones, las cuales estarán bajo presión selectiva. Las tasas de mutación son bajas comparadas con la recombinación por lo que nuevos tipos antigénicos no surgirán rápidamente y los tratamientos, vacunas y procedimientos de inmunodiagnóstico pueden ser efectivos por un largo periodo de tiempo [Dykhuizen *et al.*, 1993].

En este estudio, las poblaciones de *T. solium* de México y Madagascar se encontraron claramente diferenciadas genéticamente ( $G_{ST} = 0.7577$ ), así como las regiones centro y sureste de México ( $G_{ST} = 0.7945$ ). Asimismo, las tres localidades del centro de México presentaron una alta diferenciación al compararse de manera pareada con la localidad del sureste ( $G_{ST}$  Zacatepec-Kochol = 0.8102;  $G_{ST}$  Cuentepec-Kochol = 0.8656;  $G_{ST}$  Huatlatlauca-Kochol = 0.8741). Los altos valores de diferenciación genética se obtuvieron por la presencia de polimorfismos restringidos a países, regiones y localidades. Es decir, se obtuvieron polimorfismos que se observaron estrictamente en todas las muestras de un país y no de otro (15 en México y 2 en Madagascar), de una región y no de otra (2 en región centro, 2 en región sureste y 2 en Madagascar), y de una localidad y no de otra (3 en Kochol). En estos casos, la heterocigosidad esperada en las subpoblaciones ( $H_S$ ) fue cero, por lo que la diferenciación genética ( $G_{ST}$ ) resultante para estos loci fue equivalente a 1, lo cual aumentó el promedio de  $G_{ST}$  enormemente a pesar de que en muchos loci la diferenciación genética fue baja. Como era de esperarse, los valores estimados de flujo génico entre las

poblaciones con alta diferenciación genética resultaron bajos ( $Nm$  Zacatepec-Kochol = 0.1172;  $Nm$  Cuentepec-Kochol = 0.0776;  $Nm$  Huatlatlauca-Kochol = 0.0720;  $Nm$  Centro-Sureste = 0.1294;  $Nm$  México-Madagascar = 0.1599). Esto podría deberse a que en la actualidad el comercio de cerdos que pudieran estar infectados con cisticercos de *T. solium* entre el centro y sureste de México es prácticamente nulo, y entre continentes es completamente nulo; Sin embargo, el flujo génico de *T. solium* entre las regiones centro y sureste de México no puede despreciarse totalmente por el hecho de que pueden presentarse casos de migración de humanos portadores del estado adulto de este parásito [Sánchez *et al.*, 1998].

Por otro lado y a diferencia de lo que ocurre entre regiones y entre las localidades del centro pareadas con la del sureste de México, la diferenciación genética entre las tres localidades del centro es baja ( $G_{ST} = 0.2112$ ), mientras que el flujo génico estimado es más alto ( $Nm = 1.8670$ ). Considerando la menor distancia geográfica que existe entre las localidades del centro de México, resulta más probable que se presenten fenómenos de migración de humanos, que pudieran ser portadores del estado adulto, o comercio de cerdo, incluso de aquellos que pudieran estar infectados, entre estas tres localidades, lo cual tendría un efecto homogenizador sobre las poblaciones. Sin embargo, hay que reconocer que el valor de  $G_{ST}$  obtenido no es tan bajo en comparación con el obtenido en otras especies, lo que habla de un cierto aislamiento de las tres localidades.

En los fenogramas presentados y haciendo referencia a la tabla 3 (cisticercos obtenidos), puede observarse que individuos pertenecientes a las diferentes localidades del centro se encuentran mezclados, es decir que las localidades del centro no se encuentran bien estructuradas. Por el contrario, los individuos de las tres regiones y de ambos países se agrupan por separado demostrando una clara estructura poblacional, evidenciado por los altos valores de diferenciación genética. Los altos valores de bootstrap presentes en las ramas que dividen a los cisticercos provenientes de Madagascar y México, y a los cisticercos del centro y sureste de México también demuestran la alta diferenciación genética y estructuración de estas poblaciones.

En diferentes trabajos se ha sugerido que la variabilidad genética y diferenciación genética entre poblaciones de parásitos pueden ser las responsables de las heterogeneidades clínicas observadas [Deitsch *et al.*, 1997; Higazi *et al.*, 2001; Ayeh-Kumi *et al.*, 2001]. Para *T. solium* se reconoce que existen diferencias en la frecuencia de las manifestaciones entre continentes: En Asia y África la CSC es una manifestación muy común, presentándose frecuentemente de manera conjunta con la NC, mientras que en América Latina no se ha informado de lo mismo. La alta diferenciación genética encontrada por medio de RAPDs entre cisticercos provenientes de Madagascar y México, podría estar involucrada en la heterogeneidad clínica entre continentes. Igualmente, la obtención de una clara diferenciación genética entre cisticercos de la región centro de México y sureste de México, podría estar involucrada en las diferencias clínicas



menos obvias aún no identificadas entre estas regiones. Por supuesto, no se puede descartar por este hecho la importancia que puede tener la variabilidad genética de los hospederos entre continentes y regiones en la heterogeneidad de esta parasitosis.

Por otro lado, al no encontrarse diferencias entre cisticercos alojados en cerebro y músculo, se vuelve menos factible la idea de que algunos cisticercos pudieran presentar características genéticas que les permitieran evadir el sistema inmune del SNC y establecerse preferencialmente en este tejido, a diferencia de otros que no las presenten y terminen alojándose en tejido muscular.

A pesar de la baja variabilidad genética encontrada entre parásitos provenientes de las distintas localidades de la región del centro de México, las distintas formas de NC observadas (NC inflamatoria vs. NC no inflamatoria) podrían estar basadas en las pocas diferencias aquí encontradas si éstas se presentan en genes involucrados en la patogenicidad de *T. solium*. Es necesario establecer otras metodologías para relacionar directamente las variaciones genéticas observadas con las diferentes manifestaciones clínicas.

Según análisis de divergencia de secuencias, *T. solium* es un parásito que existe previo a la domesticación del cerdo, la cual comenzó hace 10,000 años [Hoberg *et al.*, 2001]. Nakao y colaboradores [2002] proponen que *T. solium* salió de África hacia Eurasia por medio de sus hospederos definitivos *Homo erectus* y *H. sapiens*, mantenido por ciclos humano-humano (por canibalismo) y humano-

cerdo salvaje (por cacería), y al darse la domesticación del cerdo se estableció el ciclo humano-cerdo. La selección natural en estos procesos pudo haber incrementado la diferenciación genética entre parásitos de distintas regiones. La llegada de *T. solium* al continente americano se debió a los primeros colonizadores europeos que introdujeron al cerdo (algunos de los cuales podrían haber venido infectados con cisticercos), o bien, a los mismos colonizadores (quienes pudieron haber sido portadores del estado adulto) [Epstein y Bichard, 1984 en Nakao *et al.*, 2002]. Al presentarse las condiciones adecuadas para completar el ciclo de vida, es posible que el parásito lograra establecerse, dispersarse geográficamente con el comercio y/o la migración humana, y diferenciarse genéticamente de las poblaciones de África y Asia, así como de las distintas poblaciones establecidas en América. Al haber una pequeña distancia genética entre cisticercos de las dos regiones en México estudiadas, podemos suponer que estas poblaciones tuvieron un origen común y posteriormente se diferenciaron genéticamente. Si las poblaciones del centro y sureste de México hubieran tenido un origen separado, por ejemplo unos provenientes de Europa y otros de Asia o África, las distancias genéticas pudieron haber sido tan altas como las que se presentaron entre Madagascar y México.

## CONCLUSIONES

- Los RAPDs resultaron ser un buen marcador molecular para determinar la diferenciación y variación genética de *T. solium*. Los 113 loci obtenidos con 9 diferentes oligos fueron útiles para el análisis poblacional.
- La variabilidad genética en las poblaciones de *T. solium* encontrada en este estudio es baja en comparación con la obtenida en otras especies. Por otro lado, existe una alta diferenciación genética entre las dos regiones de México y Madagascar estudiadas. Estos resultados son los esperados teniendo en cuenta el modo de reproducción por autofecundación y el bajo intercambio genético entre poblaciones. Entre las localidades del centro de México la diferenciación fue bastante más baja que la encontrada entre regiones y países.
- En este trabajo no se presentó diferenciación genética entre cisticercos alojados en tejido muscular y cerebral.
- En este estudio los valores de diversidad genética a nivel de países fueron similares entre México y Madagascar. Al separar el análisis en regiones, Madagascar presentó la mayor diversidad, seguido por la región centro de México. La región sureste presentó la menor diversidad genética. La mayor diversidad en las localidades de México se presentó en Zacatepec, seguido por Cuentepec, Huatlatlauca y Kochol.
- Las distancias genéticas y geográficas estuvieron correlacionadas significativamente. Las distancias genéticas fueron aumentando conforme se aumentaba de jerarquía en el estudio. Varios individuos fueron idénticos

dando como resultado distancias genéticas de cero y esto se reflejó en la baja variabilidad genética.

- Las tres regiones estudiadas fueron claramente diferenciadas en los fenogramas. *T. crassiceps* ORF demostró la integridad de las muestras de *T. solium* presentándose como un grupo muy alejado fenotípicamente. Los fenogramas construidos por los métodos de UPGMA y Neighbor-Joining mostraron básicamente la misma topología.
- Las diferentes manifestaciones clínicas entre continentes podrían estar basadas en la diferenciación genética entre parásitos de distintos continentes, pero no pueden descartarse las propiedades de los hospederos y del ambiente.
- A pesar de la baja variabilidad genética encontrada entre cisticercos del centro de México, ésta puede estar involucrada en la heterogeneidad clínica de la NC (NC inflamatoria vs. NC no inflamatoria) observada en esta región.
- Las vacunas o tratamientos desarrollados pueden no ser efectivos contra parásitos de distintas regiones por la alta diferenciación genética, pero presentarán una larga duración. Dada la baja variabilidad genética encontrada, el desarrollo de vacunas y tratamientos contra la cisticercosis causada por *T. solium* es bastante alentador.

## PERSPECTIVAS

- Incorporar al análisis muestras provenientes de diferentes países para saber si los valores de variabilidad y diferenciación genética encontradas en este trabajo se siguen manteniendo entre países y regiones.
- Probar en diferentes regiones los tratamientos desarrollados contra la cisticercosis para saber si siguen siendo útiles a pesar de la diferenciación genética.
- Determinar si existen diferencias clínicas entre las regiones del centro y sureste de México.
- Identificar las secuencias o genes que pudieran ser polimórficos entre los cisticercos de los distintos continentes y regiones de México. Estudiar sus posibles funciones para tratar de relacionarlas con las heterogeneidades clínicas. Comparar estos polimorfismos entre parásitos causantes de NC silenciosa y sintomática, entre parásitos de cerdos con alta y baja carga parasitaria, y entre cisticercos obtenidos de humanos parasitados en tejido muscular o subcutáneo y en SNC.
- La baja variabilidad genética de *T. solium* observada alienta al estudio de las diferencias inmunológicas y genéticas en humanos que pudieran estar involucradas en la heterogeneidad clínica, así como al estudio de la búsqueda de factores genéticos involucrados en la susceptibilidad o resistencia a la cisticercosis.

## APÉNDICE

La obtención de polimorfismos en un gen o locus entre especies distintas o entre individuos pertenecientes a la misma especie es importante para la realización de estudios de genética de poblaciones. Los polimorfismos obtenidos permiten estimar la variabilidad y diferenciación genética de los organismos estudiados, hacer inferencias filogenéticas, proponer estrategias de conservación de especies en peligro de extinción, establecer relaciones entre hospederos y parásitos, entre otras. Existen diferentes técnicas que permiten obtener polimorfismos, todas ellas presentan ventajas y desventajas. La elección de una u otra va a depender del tipo de estudio que se pretende realizar y de la capacidad de lidiar con sus desventajas. Entre las diferentes técnicas utilizadas para determinar la variabilidad genética de organismos se encuentran:

1) La hibridación DNA-DNA.- En esta técnica el DNA de dos especies es combinado, desnaturalizado y reasociado formando moléculas de doble cadena híbridas. La moléculas de doble cadena que se forman entre hebras complementarias de las dos especies presentarán errores de apareamiento debido a la distancia evolutiva de un ancestro común. La cantidad de errores de apareamiento entre las moléculas híbridas determinará la temperatura de disociación de éstas al colocarlas en un gradiente de temperatura. La depresión de la temperatura de disociación de un híbrido heterodúplex relativa a la del híbrido homodúplex puede ser utilizada como un índice de divergencia entre los DNAs de las especies en comparación. Sus desventajas son: Las comparaciones están restringidas a la fracción no repetitiva del genoma; Grandes diferencias en el

tamaño de la fracción repetitiva del genoma entre especies pueden producir errores de interpretación de relaciones; Grandes cantidades de polimorfismo intraespecífico pueden ser problemáticas en la estimación de relaciones filogenéticas entre especies cercanamente relacionadas; Se requiere en muchos casos miligramos de DNA [Hillis *et al.*, 1996].

2) La secuenciación de genomas completos y regiones genómicas.- Existen varias estrategias de obtención de datos de secuencia, pero comparten cuatro pasos fundamentales. Primero, se debe identificar una secuencia blanco con variación apropiada entre especies o individuos. Segundo, se deben aislar y purificar muchas copias por cada individuo a examinar. Tercero, el DNA purificado se secuencia. Finalmente se alinean las diferentes secuencias y se analizan. Los métodos de secuenciación son los de Maxam y Gilbert (método químico) y el de Sanger y colaboradores (método enzimático), ámbos desarrollados casi simultáneamente en 1977. En el método químico, un fragmento de DNA es separado electroforéticamente en sus hebras complementarias y cada una es marcada con  $^{32}\text{P}$ . Las hebras marcadas radioactivamente son separadas en 4 tratamientos químicos, uno que corta las hebras en Adenina, otro en Adenina y Guanina, otro que corta en Timina y Citosina, y otro que corta en Citosina. Los fragmentos cortados son separados por electroforesis, visualizados por autoradiografía y la secuencia es leída directamente de la autoradiografía. En el método enzimático el DNA doble cadena es desnaturalizado y después se agrega un oligo (15-25 pb) complementario a una región del DNA blanco. La muestra se divide en 4 y en cada una se agregan los deoxinucleótidos (dNTPs), al menos uno debe estar marcado radioactivamente, y DNA polimerasa. Además, se agrega uno

de los cuatro dideoxinucleótidos (ddNTPs) a cada tubo para detener la polimerización. La secuencia de DNA es elongada utilizando al DNA blanco como templado y la elongación se detiene al incorporarse un ddNTP. Los fragmentos radioactivos son separados por electroforesis, visualizados por autoradiografía y la secuencia es leída directamente. Este método puede realizarse automáticamente utilizando fragmentos de DNA marcados fluorescentemente y pasándolos por un láser. La secuenciación de genomas completos es aún una técnica cara y puede ser muy lenta para algunas especies; La secuenciación de una región genómica puede resultar muy laboriosa por requerir su previa caracterización y ubicación en el genoma completo; Cuando se desean analizar muchos loci o individuos otras técnicas pueden ser más apropiadas [Hillis *et al.*, 1996].

3) Los análisis de isoenzimas y aloenzimas.- Las isoenzimas son formas funcionalmente similares de enzimas, incluyendo a todos los polímeros de subunidades producidos por diferentes loci o por diferentes alelos de un mismo locus. Las aloenzimas, un subgrupo de las isoenzimas, son variantes de polipéptidos que representan diferentes alelos de un mismo locus. Cambios en la secuencia de amino ácidos representan cambios a nivel de DNA, pueden afectar la forma, tamaño y carga de la proteína. Las diferentes formas de una proteína pueden ser separadas por electroforesis y visualizadas por tinción. Presentan la limitante de no ser suficientemente variables en algunos organismos, lo cual es un punto importante en estudios de estructura de poblaciones y aplicaciones intraespecíficas; Algunos taxa no comparten casi ningún alelo; El número de loci estudiado es bajo comparado con otras técnicas; Las bandas reconocidas en el



gel representan fenotipos y no necesariamente toda la variación alélica; Se requieren gramos de muestra para un análisis completo [Hillis *et al.*, 1996].

4) Los RFLPs (por sus siglas en inglés, restriction fragment length polymorphisms).- Se utilizan enzimas de restricción para cortar el DNA genómico en sitios específicos (4-6 pb) y los fragmentos resultantes son separados por electroforesis y visualizados por tinción con bromuro de etidio y luz UV. Diferencias en el patrón de bandeo resultan por sustituciones, adiciones, deleciones o rearreglos de secuencia en las regiones reconocidas por las enzimas de restricción. Los fragmentos de DNA pueden ser desnaturalizados y pueden hibridizarse a una sonda específica marcada radioactivamente (Southern Blot) mostrando un diferente patrón de bandeo entre individuos. La obtención de marcadores genéticos y su observación por Southern Blot resulta muy laboriosa, requiere de una gran cantidad de material biológico y utiliza materiales radioactivos.

5) Los AFLPs (por sus siglas en inglés, amplified fragment length polymorphisms).- En esta técnica el DNA genómico es digerido completamente por dos enzimas de restricción (EcoRI y MseI) dando como resultado tres tipos de fragmentos. Se ligan adaptadores a los extremos de los fragmentos resultantes y cambios en una base en el adaptador evitarán la digestión por las enzimas de restricción. Los adaptadores proveen de sitios de apareamiento con el oligo para realizar PCR selectivo utilizando extensiones nucleotídicas 3'. Estos nucleótidos selectivos definen el grupo de fragmentos de restricción a amplificar. Este PCR se lleva a cabo con un oligo marcado radioactivamente que reconoce al adaptador y permite la detección de los productos de amplificación, los cuales son separados por

electroforesis y visualizados por autoradiografía. Entre sus limitantes se encuentran: la baja capacidad de detectar infecciones mezcladas, requiere la purificación del DNA del organismo a analizar, detecta menos polimorfismos que otras técnicas como los microsátélites, se utilizan marcadores radioactivos para la detección [Masiga *et al.*, 2000].

6) Los microsátélites.- Son repeticiones en tándem (2-5 pb) con altas tasas de cambio en el número de copias y flanqueadas por una secuencia de DNA característica. El patrón de los microsátélites puede ser utilizado como sonda contra DNA genómico o librerías de cDNA para identificar clonas que contengan el mismo patrón. Estas clonas son secuenciadas y se diseñan oligos para amplificar la secuencia de DNA que se encuentra flanqueando el microsátélite. Los polimorfismos entre individuos frecuentemente son cambios en la longitud del producto amplificado. La amplificación de loci de microsátélites requiere la información de la secuencia de DNA para el diseño de oligos, algo que para muchas especies aún no se cuenta [Hillis *et al.*, 1996].

Williams y colaboradores [1990], y Welsh y McClelland [1990] describieron dos técnicas similares que utilizan la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar muchas regiones de un genoma simultáneamente. Williams y colaboradores describieron un proceso sencillo, distinto al PCR convencional, que está basado en la amplificación de DNA genómico utilizando oligos simples de secuencia nucleotídica arbitraria, los cuales detectan polimorfismos, en la ausencia de información de la secuencia nucleotídica específica, que funcionan como marcadores genéticos. Estos oligos presentan 10 nucleótidos con secuencia

azarosa pero con un mínimo contenido de 60% G-C los cuales se unen al DNA genómico a una temperatura de 36°C durante el PCR. Los autores denominaron a esta técnica Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). En una publicación simultánea, Welsh y McClelland describen una técnica similar a la cual denominaron AP-PCR, para Arbitrary Primed PCR, que también requiere poca o nula información bioquímica o de biología molecular de las especies estudiadas. En su técnica utilizan oligos simples que varían entre 20 a 34 bases y temperaturas bajas de unión al DNA genómico (36, 40 y 44°C).

Ambas técnicas dependen de que los oligos utilizados se unan a varias regiones a lo largo del genoma. Algunas de estas uniones se encuentran alejadas algunos cientos de pares de bases y en las hebras complementarias. Las secuencias que se presentan entre estas posiciones serán amplificables por PCR y las regiones amplificadas estarán flanqueadas por repeticiones invertidas prácticamente complementarias a los oligos y separadas por no más de 2.5 a 3.0 kb [Black, 1996]. La amplificación de las secuencias depende de la eficiencia del apareamiento con el oligo en cada par de sitios de unión de los oligos y de la eficiencia de la elongación. Durante los primeros pasos del PCR las secuencias en las que los oligos se unan mejor predominarán y en los últimos pasos aquellas secuencias que se amplifiquen más eficientemente predominarán [Welsh y McClelland, 1990]. Cada oligo utilizado da entonces un patrón diferente de productos amplificados, cada uno con el potencial de detectar polimorfismos que permiten la diferenciación intra e interespecífica (ver fig. 6).

Los polimorfismos obtenidos se deben a varios tipos de mutaciones posibles que evitan o permiten la amplificación. Mutaciones puntuales en los sitios de unión del oligo evitarán que se dé el apareo con el DNA genómico en uno o ambos lados. Inserciones en los sitios de unión del oligo así como inserciones que aumenten la distancia entre los extremos 5' y 3' de los sitios de unión de oligos más allá de lo que puede ser polimerizado por PCR provocará que no se lleve a cabo la amplificación y que no aparezcan productos. Los polimorfismos observados se deben a la presencia o a la ausencia de un fragmento de tamaño particular entre individuos o entre el nivel taxonómico que se esté estudiando. Los polimorfismos revelados por esta técnica se utilizan para DNA fingerprinting, genética de poblaciones, mapeo de genomas y taxonomía molecular.

Las ventajas que presenta esta técnica son: 1) No se requiere información de la secuencia para la construcción de oligos ni para la interpretación de los patrones de bandeo; 2) La utilización de un solo tipo de oligo es suficiente para amplificar regiones múltiples que varían en su presencia de manera intra e interespecífica; 3) Su costo es relativamente bajo comparado con otras técnicas que detectan polimorfismos y no utiliza marcas radioactivas; y 4) Se requiere poca cantidad de material genético para obtener productos de amplificación. También se presentan desventajas, una de estas es la universalidad de los oligos, es decir que cualquier secuencia de DNA que presente las condiciones mínimas para amplificar servirá como templado, así que cualquier contaminación dará productos de amplificación. Otra desventaja es que los RAPDs son altamente susceptibles a cualquier cambio en las condiciones del PCR por lo que resulta difícil su

estandarización entre laboratorios. Cambios en las concentraciones de DNA, dNTPs, sales, amortiguadores, longitud y porcentaje de G-C del oligo e incluso diferentes termocicladores provocan cambios en los patrones de bandeo por lo que resulta muy importante tener cuidado al realizar las reacciones. Una tercera desventaja es que los polimorfismos se segregan como marcadores dominantes, esto significa que no se puede discernir entre individuos heterócigos (una copia del DNA templado amplificado) y homócigos dominantes (dos copias del DNA templado amplificado). Finalmente, los resultados obtenidos no pueden ser interpretados como relaciones evolutivas entre taxa.

## ANEXO 1

**Anexo 1-a. Frecuencias alélicas\* por locus para los individuos de México y Madagascar juntos.**

Oligo-Locus	Todos	Oligo-Locus	Todos	Oligo-Locus	Todos
Pr01-1	0.0168	Pr04-5	1.0	PrA03-1	0.2399
Pr01-2	0.2399	Pr04-6	1.0	PrA03-2	0.2399
Pr01-3	1.0	Pr04-7	1.0	PrA03-3	0.8946
Pr01-4	0.0168	Pr04-8	0.3502	PrA03-4	0.0056
Pr01-5	1.0	Pr04-9	0.3502	PrA03-5	0.8946
Pr01-6	0.3417	Pr04-10	1.0	PrA03-6	1.0
Pr01-7	1.0	Pr04-11	0.3417	PrA03-7	0.8946
Pr01-8	1.0	Pr04-12	1.0	PrA03-8	1.0
Pr01-9	1.0	Pr05-1	1.0	PrA03-9	1.0
Pr01-10	1.0	Pr05-2	0.5528	PrA03-10	0.6667
Pr01-11	1.0	Pr05-3	1.0	PrA03-11	1.0
Pr01-12	1.0	Pr05-4	0.3675	PrA03-12	1.0
Pr02-1	0.3417	Pr05-5	0.3502	PrA03-13	0.3417
Pr02-2	1.0	Pr05-6	0.2399	PrA07-1	1.0
Pr02-3	1.0	Pr05-7	1.0	PrA07-2	1.0
Pr02-4	1.0	Pr05-8	1.0	PrA07-3	1.0
Pr02-5	0.5405	Pr05-9	0.2399	PrA07-4	1.0
Pr02-6	1.0	Pr05-10	0.0056	PrA07-5	1.0
Pr02-7	1.0	Pr05-11	0.3417	PrA07-6	0.2472
Pr02-8	1.0	Pr05-12	1.0	PrA07-7	1.0
Pr02-9	1.0	Pr05-13	1.0	PrA07-8	1.0
Pr02-10	0.0112	Pr05-14	1.0	PrA07-9	0.0932
Pr02-11	1.0	Pr05-15	0.3417	PrA07-10	1.0
Pr02-12	0.5784	Pr05-16	1.0	PrA07-11	1.0
Pr03-1	0.0572	Pr05-17	0.3417	PrA07-12	0.0112
Pr03-2	0.3417	Pr06-1	0.3417	PrA07-13	0.2472
Pr03-3	0.3417	Pr06-2	1.0	PrA13-1	0.3417
Pr03-4	0.3502	Pr06-3	1.0	PrA13-2	1.0
Pr03-5	1.0	Pr06-4	0.0932	PrA13-3	0.2183
Pr03-6	1.0	Pr06-5	1.0	PrA13-4	1.0
Pr03-7	0.2399	Pr06-6	1.0	PrA13-5	1.0
Pr03-8	1.0	Pr06-7	1.0	PrA13-6	1.0
Pr03-9	1.0	Pr06-8	1.0	PrA13-7	0.5654
Pr03-10	1.0	Pr06-9	1.0	PrA13-8	0.8946
Pr04-1	0.3417	Pr06-10	0.3417	PrA13-9	0.3502
Pr04-2	0.3417	Pr06-11	1.0	PrA13-10	1.0
Pr04-3	1.0	Pr06-12	1.0	PrA13-11	1.0
Pr04-4	0.3417	Pr06-13	0.2183		

\* Frecuencias alélicas para el alelo 1 (Presencia) únicamente.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

**Anexo 1-b. Frecuencias alélicas\* por locus para México y Madagascar por separado.**

Oligo-Locus	Frec. México	Frec. Madagascar	Oligo-Locus	Frec. México	Frec. Madagascar	Oligo-Locus	Frec. México	Frec. Madagascar
Pr01-1	0.0299	0.0	Pr04-5	1.0	1.0	PrA03-1	0.0	0.8399
Pr01-2	0.0	0.8399	Pr04-6	1.0	1.0	PrA03-2	0.0	0.8399
Pr01-3	1.0	1.0	Pr04-7	1.0	1.0	PrA03-3	1.0	0.8399
Pr01-4	0.0299	0.0	Pr04-8	1.0	0.0129	PrA03-4	0.0	0.0129
Pr01-5	1.0	1.0	Pr04-9	1.0	0.0129	PrA03-5	1.0	0.8399
Pr01-6	1.0	0.0	Pr04-10	1.0	1.0	PrA03-6	1.0	1.0
Pr01-7	1.0	1.0	Pr04-11	1.0	0.0	PrA03-7	1.0	0.8399
Pr01-8	1.0	1.0	Pr04-12	1.0	1.0	PrA03-8	1.0	1.0
Pr01-9	1.0	1.0	Pr05-1	1.0	1.0	PrA03-9	1.0	1.0
Pr01-10	1.0	1.0	Pr05-2	0.4226	0.8399	PrA03-10	0.6039	0.7735
Pr01-11	1.0	1.0	Pr05-3	1.0	1.0	PrA03-11	1.0	1.0
Pr01-12	1.0	1.0	Pr05-4	0.1716	0.8399	PrA03-12	1.0	1.0
Pr02-1	1.0	0.0	Pr05-5	1.0	0.0129	PrA03-13	1.0	0.0
Pr02-2	1.0	1.0	Pr05-6	0.0	0.8399	PrA07-1	1.0	1.0
Pr02-3	1.0	1.0	Pr05-7	1.0	1.0	PrA07-2	1.0	1.0
Pr02-4	1.0	1.0	Pr05-8	1.0	1.0	PrA07-3	1.0	1.0
Pr02-5	0.4059	0.8399	Pr05-9	0.0	0.8399	PrA07-4	1.0	1.0
Pr02-6	1.0	1.0	Pr05-10	0.0	0.0129	PrA07-5	1.0	1.0
Pr02-7	1.0	1.0	Pr05-11	1.0	0.0	PrA07-6	0.0	1.0
Pr02-8	1.0	1.0	Pr05-12	1.0	1.0	PrA07-7	1.0	1.0
Pr02-9	1.0	1.0	Pr05-13	1.0	1.0	PrA07-8	1.0	1.0
Pr02-10	0.0198	0.0	Pr05-14	1.0	1.0	PrA07-9	0.1716	0.0
Pr02-11	1.0	1.0	Pr05-15	1.0	0.0	PrA07-10	1.0	1.0
Pr02-12	0.4399	1.0	Pr05-16	1.0	1.0	PrA07-11	1.0	1.0
Pr03-1	0.1034	0.0	Pr05-17	1.0	0.0	PrA07-12	0.0198	0.0
Pr03-2	1.0	0.0	Pr06-1	1.0	0.0	PrA07-13	0.0	1.0
Pr03-3	1.0	0.0	Pr06-2	1.0	1.0	PrA13-1	1.0	0.0
Pr03-4	1.0	0.0129	Pr06-3	1.0	1.0	PrA13-2	1.0	1.0
Pr03-5	1.0	1.0	Pr06-4	0.1716	0.0	PrA13-3	0.4399	0.0
Pr03-6	1.0	1.0	Pr06-5	1.0	1.0	PrA13-4	1.0	1.0
Pr03-7	0.0	0.8399	Pr06-6	1.0	1.0	PrA13-5	1.0	1.0
Pr03-8	1.0	1.0	Pr06-7	1.0	1.0	PrA13-6	1.0	1.0
Pr03-9	1.0	1.0	Pr06-8	1.0	1.0	PrA13-7	0.4399	0.8399
Pr03-10	1.0	1.0	Pr06-9	1.0	1.0	PrA13-8	1.0	0.8399
Pr04-1	1.0	0.0	Pr06-10	1.0	0.0	PrA13-9	1.0	0.0129
Pr04-2	1.0	0.0	Pr06-11	1.0	1.0	PrA13-10	1.0	1.0
Pr04-3	1.0	1.0	Pr06-12	1.0	1.0	PrA13-11	1.0	1.0
Pr04-4	1.0	0.0	Pr06-13	0.4399	0.0			

\* Frecuencias alélicas para el alelo 1 (Presencia) únicamente.

Anexo 1-c. Frecuencias alélicas\* por locus para las regiones centro y sureste de México juntas.

Oligo-Locus	Frecuencia	Oligo-Locus	Frecuencia	Oligo-Locus	Frecuencia
Pr01-1	0.0301	Pr04-5	1.0	PrA03-1	0.0
Pr01-2	0.0	Pr04-6	1.0	PrA03-2	0.0
Pr01-3	1.0	Pr04-7	1.0	PrA03-3	1.0
Pr01-4	0.0301	Pr04-8	1.0	PrA03-4	0.0
Pr01-5	1.0	Pr04-9	1.0	PrA03-5	1.0
Pr01-6	1.0	Pr04-10	1.0	PrA03-6	1.0
Pr01-7	1.0	Pr04-11	1.0	PrA03-7	1.0
Pr01-8	1.0	Pr04-12	1.0	PrA03-8	1.0
Pr01-9	1.0	Pr05-1	1.0	PrA03-9	1.0
Pr01-10	1.0	Pr05-2	0.5703	PrA03-10	0.6048
Pr01-11	1.0	Pr05-3	1.0	PrA03-11	1.0
Pr01-12	1.0	Pr05-4	0.3137	PrA03-12	1.0
Pr02-1	1.0	Pr05-5	1.0	PrA03-13	1.0
Pr02-2	1.0	Pr05-6	0.0	PrA07-1	1.0
Pr02-3	1.0	Pr05-7	1.0	PrA07-2	1.0
Pr02-4	1.0	Pr05-8	1.0	PrA07-3	1.0
Pr02-5	0.5222	Pr05-9	0.0	PrA07-4	1.0
Pr02-6	1.0	Pr05-10	0.0	PrA07-5	1.0
Pr02-7	1.0	Pr05-11	1.0	PrA07-6	0.0
Pr02-8	1.0	Pr05-12	1.0	PrA07-7	1.0
Pr02-9	1.0	Pr05-13	1.0	PrA07-8	1.0
Pr02-10	0.0199	Pr05-14	1.0	PrA07-9	0.3137
Pr02-11	1.0	Pr05-15	1.0	PrA07-10	1.0
Pr02-12	0.6863	Pr05-16	1.0	PrA07-11	1.0
Pr03-1	0.1063	Pr05-17	1.0	PrA07-12	0.0199
Pr03-2	1.0	Pr06-1	1.0	PrA07-13	0.0
Pr03-3	1.0	Pr06-2	1.0	PrA13-1	1.0
Pr03-4	1.0	Pr06-3	1.0	PrA13-2	1.0
Pr03-5	1.0	Pr06-4	0.3137	PrA13-3	0.6863
Pr03-6	1.0	Pr06-5	1.0	PrA13-4	1.0
Pr03-7	0.0	Pr06-6	1.0	PrA13-5	1.0
Pr03-8	1.0	Pr06-7	1.0	PrA13-6	1.0
Pr03-9	1.0	Pr06-8	1.0	PrA13-7	0.6863
Pr03-10	1.0	Pr06-9	1.0	PrA13-8	1.0
Pr04-1	1.0	Pr06-10	1.0	PrA13-9	1.0
Pr04-2	1.0	Pr06-11	1.0	PrA13-10	1.0
Pr04-3	1.0	Pr06-12	1.0	PrA13-11	1.0
Pr04-4	1.0	Pr06-13	0.6863		

\* Frecuencias alélicas para el alelo 1 (Presencia) únicamente.



**Anexo 1-d. Frecuencias alélicas\* por locus para las dos regiones de México por separado.**

Oligo-Locus	México Centro	México Sureste	Oligo-Locus	México Centro	México Sureste	Oligo-Locus	México Centro	México Sureste
Pr01-1	0.0438	0.0	Pr04-5	1.0	1.0	PrA03-1	0.0	0.0
Pr01-2	0.0	0.0	Pr04-6	1.0	1.0	PrA03-2	0.0	0.0
Pr01-3	1.0	1.0	Pr04-7	1.0	1.0	PrA03-3	1.0	1.0
Pr01-4	0.0438	0.0	Pr04-8	1.0	1.0	PrA03-4	0.0	0.0
Pr01-5	1.0	1.0	Pr04-9	1.0	1.0	PrA03-5	1.0	1.0
Pr01-6	1.0	1.0	Pr04-10	1.0	1.0	PrA03-6	1.0	1.0
Pr01-7	1.0	1.0	Pr04-11	1.0	1.0	PrA03-7	1.0	1.0
Pr01-8	1.0	1.0	Pr04-12	1.0	1.0	PrA03-8	1.0	1.0
Pr01-9	1.0	1.0	Pr05-1	1.0	1.0	PrA03-9	1.0	1.0
Pr01-10	1.0	1.0	Pr05-2	0.8310	0.0	PrA03-10	0.6220	0.5670
Pr01-11	1.0	1.0	Pr05-3	1.0	1.0	PrA03-11	1.0	1.0
Pr01-12	1.0	1.0	Pr05-4	0.0	1.0	PrA03-12	1.0	1.0
Pr02-1	1.0	1.0	Pr05-5	1.0	1.0	PrA03-13	1.0	1.0
Pr02-2	1.0	1.0	Pr05-6	0.0	0.0	PrA07-1	1.0	1.0
Pr02-3	1.0	1.0	Pr05-7	1.0	1.0	PrA07-2	1.0	1.0
Pr02-4	1.0	1.0	Pr05-8	1.0	1.0	PrA07-3	1.0	1.0
Pr02-5	0.7610	0.0	Pr05-9	0.0	0.0	PrA07-4	1.0	1.0
Pr02-6	1.0	1.0	Pr05-10	0.0	0.0	PrA07-5	1.0	1.0
Pr02-7	1.0	1.0	Pr05-11	1.0	1.0	PrA07-6	0.0	0.0
Pr02-8	1.0	1.0	Pr05-12	1.0	1.0	PrA07-7	1.0	1.0
Pr02-9	1.0	1.0	Pr05-13	1.0	1.0	PrA07-8	1.0	1.0
Pr02-10	0.0290	0.0	Pr05-14	1.0	1.0	PrA07-9	0.0	1.0
Pr02-11	1.0	1.0	Pr05-15	1.0	1.0	PrA07-10	1.0	1.0
Pr02-12	1.0	0.0	Pr05-16	1.0	1.0	PrA07-11	1.0	1.0
Pr03-1	0.1548	0.0	Pr05-17	1.0	1.0	PrA07-12	0.0290	0.0
Pr03-2	1.0	1.0	Pr06-1	1.0	1.0	PrA07-13	0.0	0.0
Pr03-3	1.0	1.0	Pr06-2	1.0	1.0	PrA13-1	1.0	1.0
Pr03-4	1.0	1.0	Pr06-3	1.0	1.0	PrA13-2	1.0	1.0
Pr03-5	1.0	1.0	Pr06-4	0.0	1.0	PrA13-3	1.0	0.0
Pr03-6	1.0	1.0	Pr06-5	1.0	1.0	PrA13-4	1.0	1.0
Pr03-7	0.0	0.0	Pr06-6	1.0	1.0	PrA13-5	1.0	1.0
Pr03-8	1.0	1.0	Pr06-7	1.0	1.0	PrA13-6	1.0	1.0
Pr03-9	1.0	1.0	Pr06-8	1.0	1.0	PrA13-7	1.0	0.0
Pr03-10	1.0	1.0	Pr06-9	1.0	1.0	PrA13-8	1.0	1.0
Pr04-1	1.0	1.0	Pr06-10	1.0	1.0	PrA13-9	1.0	1.0
Pr04-2	1.0	1.0	Pr06-11	1.0	1.0	PrA13-10	1.0	1.0
Pr04-3	1.0	1.0	Pr06-12	1.0	1.0	PrA13-11	1.0	1.0
Pr04-4	1.0	1.0	Pr06-13	1.0	0.0			

\* Frecuencias alélicas para el alelo 1 (Presencia) únicamente.

**Anexo 1-e. Frecuencias alélicas\* por locus para las 3 regiones juntas.**

Oligo-Locus	Frecuencia	Oligo-Locus	Frecuencia	Oligo-Locus	Frecuencia
Pr01-1	0.0170	Pr04-5	1.0	PrA03-1	0.3639
Pr01-2	0.3639	Pr04-6	1.0	PrA03-2	0.3639
Pr01-3	1.0	Pr04-7	1.0	PrA03-3	0.9306
Pr01-4	0.0170	Pr04-8	0.5723	PrA03-4	0.0056
Pr01-5	1.0	Pr04-9	0.5723	PrA03-5	0.9306
Pr01-6	0.5667	Pr04-10	1.0	PrA03-6	1.0
Pr01-7	1.0	Pr04-11	0.5667	PrA03-7	0.9306
Pr01-8	1.0	Pr04-12	1.0	PrA03-8	1.0
Pr01-9	1.0	Pr05-1	1.0	PrA03-9	1.0
Pr01-10	1.0	Pr05-2	0.6871	PrA03-10	0.6779
Pr01-11	1.0	Pr05-3	1.0	PrA03-11	1.0
Pr01-12	1.0	Pr05-4	0.5417	PrA03-12	1.0
Pr02-1	0.5667	Pr05-5	0.5723	PrA03-13	0.5667
Pr02-2	1.0	Pr05-6	0.3639	PrA07-1	1.0
Pr02-3	1.0	Pr05-7	1.0	PrA07-2	1.0
Pr02-4	1.0	Pr05-8	1.0	PrA07-3	1.0
Pr02-5	0.6599	Pr05-9	0.3639	PrA07-4	1.0
Pr02-6	1.0	Pr05-10	0.0056	PrA07-5	1.0
Pr02-7	1.0	Pr05-11	0.5667	PrA07-6	0.4333
Pr02-8	1.0	Pr05-12	1.0	PrA07-7	1.0
Pr02-9	1.0	Pr05-13	1.0	PrA07-8	1.0
Pr02-10	0.0113	Pr05-14	1.0	PrA07-9	0.1778
Pr02-11	1.0	Pr05-15	0.5667	PrA07-10	1.0
Pr02-12	0.8222	Pr05-16	1.0	PrA07-11	1.0
Pr03-1	0.0602	Pr05-17	0.5667	PrA07-12	0.0113
Pr03-2	0.5667	Pr06-1	0.5667	PrA07-13	0.4333
Pr03-3	0.5667	Pr06-2	1.0	PrA13-1	0.5667
Pr03-4	0.5723	Pr06-3	1.0	PrA13-2	1.0
Pr03-5	1.0	Pr06-4	0.1778	PrA13-3	0.3889
Pr03-6	1.0	Pr06-5	1.0	PrA13-4	1.0
Pr03-7	0.3639	Pr06-6	1.0	PrA13-5	1.0
Pr03-8	1.0	Pr06-7	1.0	PrA13-6	1.0
Pr03-9	1.0	Pr06-8	1.0	PrA13-7	0.7528
Pr03-10	1.0	Pr06-9	1.0	PrA13-8	0.9306
Pr04-1	0.5667	Pr06-10	0.5667	PrA13-9	0.5723
Pr04-2	0.5667	Pr06-11	1.0	PrA13-10	1.0
Pr04-3	1.0	Pr06-12	1.0	PrA13-11	1.0
Pr04-4	0.5667	Pr06-13	0.3889		

\* Frecuencias alélicas para el alelo 1 (Presencia) únicamente.

**Anexo 1-f. Frecuencias alélicas\* por locus para las 4 localidades de México juntas.**

Oligo-Locus	Frecuencia	Oligo-Locus	Frecuencia	Oligo-Locus	Frecuencia
Pr01-1	0.0309	Pr04-5	1.0	PrA03-1	0.0
Pr01-2	0.0	Pr04-6	1.0	PrA03-2	0.0
Pr01-3	1.0	Pr04-7	1.0	PrA03-3	1.0
Pr01-4	0.0309	Pr04-8	1.0	PrA03-4	0.0
Pr01-5	1.0	Pr04-9	1.0	PrA03-5	1.0
Pr01-6	1.0	Pr04-10	1.0	PrA03-6	1.0
Pr01-7	1.0	Pr04-11	1.0	PrA03-7	1.0
Pr01-8	1.0	Pr04-12	1.0	PrA03-8	1.0
Pr01-9	1.0	Pr05-1	1.0	PrA03-9	1.0
Pr01-10	1.0	Pr05-2	0.6078	PrA03-10	0.6882
Pr01-11	1.0	Pr05-3	1.0	PrA03-11	1.0
Pr01-12	1.0	Pr05-4	0.3137	PrA03-12	1.0
Pr02-1	1.0	Pr05-5	1.0	PrA03-13	1.0
Pr02-2	1.0	Pr05-6	0.0	PrA07-1	1.0
Pr02-3	1.0	Pr05-7	1.0	PrA07-2	1.0
Pr02-4	1.0	Pr05-8	1.0	PrA07-3	1.0
Pr02-5	0.5754	Pr05-9	0.0	PrA07-4	1.0
Pr02-6	1.0	Pr05-10	0.0	PrA07-5	1.0
Pr02-7	1.0	Pr05-11	1.0	PrA07-6	0.0
Pr02-8	1.0	Pr05-12	1.0	PrA07-7	1.0
Pr02-9	1.0	Pr05-13	1.0	PrA07-8	1.0
Pr02-10	0.0203	Pr05-14	1.0	PrA07-9	0.3137
Pr02-11	1.0	Pr05-15	1.0	PrA07-10	1.0
Pr02-12	0.6863	Pr05-16	1.0	PrA07-11	1.0
Pr03-1	0.1098	Pr05-17	1.0	PrA07-12	0.0206
Pr03-2	1.0	Pr06-1	1.0	PrA07-13	0.0
Pr03-3	1.0	Pr06-2	1.0	PrA13-1	1.0
Pr03-4	1.0	Pr06-3	1.0	PrA13-2	1.0
Pr03-5	1.0	Pr06-4	0.3137	PrA13-3	0.6863
Pr03-6	1.0	Pr06-5	1.0	PrA13-4	1.0
Pr03-7	0.0	Pr06-6	1.0	PrA13-5	1.0
Pr03-8	1.0	Pr06-7	1.0	PrA13-6	1.0
Pr03-9	1.0	Pr06-8	1.0	PrA13-7	0.6863
Pr03-10	1.0	Pr06-9	1.0	PrA13-8	1.0
Pr04-1	1.0	Pr06-10	1.0	PrA13-9	1.0
Pr04-2	1.0	Pr06-11	1.0	PrA13-10	1.0
Pr04-3	1.0	Pr06-12	1.0	PrA13-11	1.0
Pr04-4	1.0	Pr06-13	0.6863		

\* Frecuencias alélicas para el alelo 1 (Presencia) únicamente.

**Anexo 1-g. Frecuencias alélicas\* por locus para las tres localidades del centro de México juntas.**

Oligo-Locus	Frecuencia	Oligo-Locus	Frecuencia	Oligo-Locus	Frecuencia
Pr01-1	0.0451	Pr04-5	1.0	PrA03-1	0.0
Pr01-2	0.0	Pr04-6	1.0	PrA03-2	0.0
Pr01-3	1.0	Pr04-7	1.0	PrA03-3	1.0
Pr01-4	0.0451	Pr04-8	1.0	PrA03-4	0.0
Pr01-5	1.0	Pr04-9	1.0	PrA03-5	1.0
Pr01-6	1.0	Pr04-10	1.0	PrA03-6	1.0
Pr01-7	1.0	Pr04-11	1.0	PrA03-7	1.0
Pr01-8	1.0	Pr04-12	1.0	PrA03-8	1.0
Pr01-9	1.0	Pr05-1	1.0	PrA03-9	1.0
Pr01-10	1.0	Pr05-2	0.8857	PrA03-10	0.7436
Pr01-11	1.0	Pr05-3	1.0	PrA03-11	1.0
Pr01-12	1.0	Pr05-4	0.0	PrA03-12	1.0
Pr02-1	1.0	Pr05-5	1.0	PrA03-13	1.0
Pr02-2	1.0	Pr05-6	0.0	PrA07-1	1.0
Pr02-3	1.0	Pr05-7	1.0	PrA07-2	1.0
Pr02-4	1.0	Pr05-8	1.0	PrA07-3	1.0
Pr02-5	0.8384	Pr05-9	0.0	PrA07-4	1.0
Pr02-6	1.0	Pr05-10	0.0	PrA07-5	1.0
Pr02-7	1.0	Pr05-11	1.0	PrA07-6	0.0
Pr02-8	1.0	Pr05-12	1.0	PrA07-7	1.0
Pr02-9	1.0	Pr05-13	1.0	PrA07-8	0.0
Pr02-10	0.0295	Pr05-14	1.0	PrA07-9	1.0
Pr02-11	1.0	Pr05-15	1.0	PrA07-10	1.0
Pr02-12	1.0	Pr05-16	1.0	PrA07-11	1.0
Pr03-1	0.1600	Pr05-17	1.0	PrA07-12	0.0300
Pr03-2	1.0	Pr06-1	1.0	PrA07-13	0.0
Pr03-3	1.0	Pr06-2	1.0	PrA13-1	1.0
Pr03-4	1.0	Pr06-3	1.0	PrA13-2	1.0
Pr03-5	1.0	Pr06-4	0.0	PrA13-3	1.0
Pr03-6	1.0	Pr06-5	1.0	PrA13-4	1.0
Pr03-7	0.0	Pr06-6	1.0	PrA13-5	1.0
Pr03-8	1.0	Pr06-7	1.0	PrA13-6	1.0
Pr03-9	1.0	Pr06-8	1.0	PrA13-7	1.0
Pr03-10	1.0	Pr06-9	1.0	PrA13-8	1.0
Pr04-1	1.0	Pr06-10	1.0	PrA13-9	1.0
Pr04-2	1.0	Pr06-11	1.0	PrA13-10	1.0
Pr04-3	1.0	Pr06-12	1.0	PrA13-11	1.0
Pr04-4	1.0	Pr06-13	1.0		

\* Frecuencias alélicas para el alelo 1 (Presencia) únicamente.

**Anexo 1-h. Frecuencias alélicas\* por locus para las tres localidades de la región centro de México por separado.**

Oligo-Locus	Zacat.	Cuent.	Huat.	Oligo-Locus	Zacat.	Cuent.	Huat.	Oligo-Locus	Zacat.	Cuent.	Huat.
Pr01-1	0.0986	0.0	0.0	Pr04-5	1.0	1.0	1.0	PrA03-1	0.0	0.0	0.0
Pr01-2	0.0	0.0	0.0	Pr04-6	1.0	1.0	1.0	PrA03-2	0.0	0.0	0.0
Pr01-3	1.0	1.0	1.0	Pr04-7	1.0	1.0	1.0	PrA03-3	1.0	1.0	1.0
Pr01-4	0.0986	0.0	0.0	Pr04-8	1.0	1.0	1.0	PrA03-4	0.0	0.0	0.0
Pr01-5	1.0	1.0	1.0	Pr04-9	1.0	1.0	1.0	PrA03-5	1.0	1.0	1.0
Pr01-6	1.0	1.0	1.0	Pr04-10	1.0	1.0	1.0	PrA03-6	1.0	1.0	1.0
Pr01-7	1.0	1.0	1.0	Pr04-11	1.0	1.0	1.0	PrA03-7	1.0	1.0	1.0
Pr01-8	1.0	1.0	1.0	Pr04-12	1.0	1.0	1.0	PrA03-8	1.0	1.0	1.0
Pr01-9	1.0	1.0	1.0	Pr05-1	1.0	1.0	1.0	PrA03-9	1.0	1.0	1.0
Pr01-10	1.0	1.0	1.0	Pr05-2	0.7500	1.0	1.0	PrA03-10	1.0	0.6985	0.2929
Pr01-11	1.0	1.0	1.0	Pr05-3	1.0	1.0	1.0	PrA03-11	1.0	1.0	1.0
Pr01-12	1.0	1.0	1.0	Pr05-4	0.0	0.0	0.0	PrA03-12	1.0	1.0	1.0
Pr02-1	1.0	1.0	1.0	Pr05-5	1.0	1.0	1.0	PrA03-13	1.0	1.0	1.0
Pr02-2	1.0	1.0	1.0	Pr05-6	0.0	0.0	0.0	PrA07-1	1.0	1.0	1.0
Pr02-3	1.0	1.0	1.0	Pr05-7	1.0	1.0	1.0	PrA07-2	1.0	1.0	1.0
Pr02-4	1.0	1.0	1.0	Pr05-8	1.0	1.0	1.0	PrA07-3	1.0	1.0	1.0
Pr02-5	0.6464	1.0	1.0	Pr05-9	0.0	0.0	0.0	PrA07-4	1.0	1.0	1.0
Pr02-6	1.0	1.0	1.0	Pr05-10	0.0	0.0	0.0	PrA07-5	1.0	1.0	1.0
Pr02-7	1.0	1.0	1.0	Pr05-11	1.0	1.0	1.0	PrA07-6	0.0	0.0	0.0
Pr02-8	1.0	1.0	1.0	Pr05-12	1.0	1.0	1.0	PrA07-7	1.0	1.0	1.0
Pr02-9	1.0	1.0	1.0	Pr05-13	1.0	1.0	1.0	PrA07-8	1.0	1.0	1.0
Pr02-10	0.0646	0.0	0.0	Pr05-14	1.0	1.0	1.0	PrA07-9	0.0	0.0	0.0
Pr02-11	1.0	1.0	1.0	Pr05-15	1.0	1.0	1.0	PrA07-10	1.0	1.0	1.0
Pr02-12	1.0	1.0	1.0	Pr05-16	1.0	1.0	1.0	PrA07-11	1.0	1.0	1.0
Pr03-1	0.0646	0.2023	0.2929	Pr05-17	1.0	1.0	1.0	PrA07-12	0.0	0.0955	0.0
Pr03-2	1.0	1.0	1.0	Pr06-1	1.0	1.0	1.0	PrA07-13	0.0	0.0	0.0
Pr03-3	1.0	1.0	1.0	Pr06-2	1.0	1.0	1.0	PrA13-1	1.0	1.0	1.0
Pr03-4	1.0	1.0	1.0	Pr06-3	1.0	1.0	1.0	PrA13-2	1.0	1.0	1.0
Pr03-5	1.0	1.0	1.0	Pr06-4	0.0	0.0	0.0	PrA13-3	1.0	1.0	1.0
Pr03-6	1.0	1.0	1.0	Pr06-5	1.0	1.0	1.0	PrA13-4	1.0	1.0	1.0
Pr03-7	0.0	0.0	0.0	Pr06-6	1.0	1.0	1.0	PrA13-5	1.0	1.0	1.0
Pr03-8	1.0	1.0	1.0	Pr06-7	1.0	1.0	1.0	PrA13-6	1.0	1.0	1.0
Pr03-9	1.0	1.0	1.0	Pr06-8	1.0	1.0	1.0	PrA13-7	1.0	1.0	1.0
Pr03-10	1.0	1.0	1.0	Pr06-9	1.0	1.0	1.0	PrA13-8	1.0	1.0	1.0
Pr04-1	1.0	1.0	1.0	Pr06-10	1.0	1.0	1.0	PrA13-9	1.0	1.0	1.0
Pr04-2	1.0	1.0	1.0	Pr06-11	1.0	1.0	1.0	PrA13-10	1.0	1.0	1.0
Pr04-3	1.0	1.0	1.0	Pr06-12	1.0	1.0	1.0	PrA13-11	1.0	1.0	1.0
Pr04-4	1.0	1.0	1.0	Pr06-13	1.0	1.0	1.0				

\* Frecuencias alélicas para el alelo 1 (Presencia) únicamente. Zacat.=Zacatepec, Morelos; Cuent.=Cuentepec, Morelos; Huat.=Huatlatlauca, Puebla.

## ANEXO 2

**Anexo 2-a.** Valores de diferenciación genética y flujo génico por locus entre México y Madagascar.

Oligo-Locus	$G_{ST}^*$	$Nm^*$	Oligo-Locus	$G_{ST}^*$	$Nm^*$	Oligo-Locus	$G_{ST}^*$	$Nm^*$
Pr01-1	0.0152	32.4924	Pr04-5	-----	-----	PrA03-1	0.7239	0.1907
Pr01-2	0.7239	0.1907	Pr04-6	-----	-----	PrA03-2	0.7239	0.1907
Pr01-3	-----	-----	Pr04-7	-----	-----	PrA03-3	0.0870	5.2450
Pr01-4	0.0152	32.4924	Pr04-8	0.9745	0.0131	PrA03-4	0.0065	76.4968
Pr01-5	-----	-----	Pr04-9	0.9745	0.0131	PrA03-5	0.0870	5.2450
Pr01-6	1.0	0.0	Pr04-10	-----	-----	PrA03-6	-----	-----
Pr01-7	-----	-----	Pr04-11	1.0	0.0	PrA03-7	0.0870	5.2450
Pr01-8	-----	-----	Pr04-12	-----	-----	PrA03-8	-----	-----
Pr01-9	-----	-----	Pr05-1	-----	-----	PrA03-9	-----	-----
Pr01-10	-----	-----	Pr05-2	0.1870	2.1744	PrA03-10	0.0335	14.4051
Pr01-11	-----	-----	Pr05-3	-----	-----	PrA03-11	-----	-----
Pr01-12	-----	-----	Pr05-4	0.4467	0.6194	PrA03-12	-----	-----
Pr02-1	1.0	0.0	Pr05-5	0.9745	0.0131	PrA03-13	1.0	0.0
Pr02-2	-----	-----	Pr05-6	0.7239	0.1907	PrA07-1	-----	-----
Pr02-3	-----	-----	Pr05-7	-----	-----	PrA07-2	-----	-----
Pr02-4	-----	-----	Pr05-8	-----	-----	PrA07-3	-----	-----
Pr02-5	0.2004	1.9946	Pr05-9	0.7239	0.1907	PrA07-4	-----	-----
Pr02-6	-----	-----	Pr05-10	0.0065	76.4968	PrA07-5	-----	-----
Pr02-7	-----	-----	Pr05-11	1.0	0.0	PrA07-6	1.0	0.0
Pr02-8	-----	-----	Pr05-12	-----	-----	PrA07-7	-----	-----
Pr02-9	-----	-----	Pr05-13	-----	-----	PrA07-8	-----	-----
Pr02-10	0.0100	49.4950	Pr05-14	-----	-----	PrA07-9	0.0938	4.8281
Pr02-11	-----	-----	Pr05-15	1.0	0.0	PrA07-10	-----	-----
Pr02-12	0.3890	0.7854	Pr05-16	-----	-----	PrA07-11	-----	-----
Pr03-1	0.0545	8.6727	Pr05-17	1.0	0.0	PrA07-12	0.0100	49.4950
Pr03-2	1.0	0.0	Pr06-1	1.0	0.0	PrA07-13	1.0	0.0
Pr03-3	1.0	0.0	Pr06-2	-----	-----	PrA13-1	1.0	0.0
Pr03-4	0.9745	0.0131	Pr06-3	-----	-----	PrA13-2	-----	-----
Pr03-5	-----	-----	Pr06-4	0.0938	4.8281	PrA13-3	0.2820	1.2733
Pr03-6	-----	-----	Pr06-5	-----	-----	PrA13-4	-----	-----
Pr03-7	0.7239	0.1907	Pr06-6	-----	-----	PrA13-5	-----	-----
Pr03-8	-----	-----	Pr06-7	-----	-----	PrA13-6	-----	-----
Pr03-9	-----	-----	Pr06-8	-----	-----	PrA13-7	0.1736	2.3807
Pr03-10	-----	-----	Pr06-9	-----	-----	PrA13-8	0.0870	5.2450
Pr04-1	1.0	0.0	Pr06-10	1.0	0.0	PrA13-9	0.9745	0.0131
Pr04-2	1.0	0.0	Pr06-11	-----	-----	PrA13-10	-----	-----
Pr04-3	-----	-----	Pr06-12	-----	-----	PrA13-11	-----	-----
Pr04-4	1.0	0.0	Pr06-13	0.2820	1.2733	Promedio	0.7577	0.1599

\*  $G_{ST}$  = Coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones;  $Nm$  = Estimado de flujo génico a partir de  $G_{ST}$ . ----- = División entre cero (no puede calcularse).

**Anexo 2-b. Valores de diferenciación genética y flujo génico por locus entre las tres regiones (centro y sureste de México, y Madagascar).**

Oligo-Locus	$G_{ST}^*$	$Nm^*$	Oligo-Locus	$G_{ST}^*$	$Nm^*$	Oligo-Locus	$G_{ST}^*$	$Nm^*$
Pr01-1	0.0296	16.3666	Pr04-5	-----	-----	PrA03-1	0.7776	0.1430
Pr01-2	0.7776	0.1430	Pr04-6	-----	-----	PrA03-2	0.7776	0.1430
Pr01-3	-----	-----	Pr04-7	-----	-----	PrA03-3	0.1128	3.9337
Pr01-4	0.0296	16.3666	Pr04-8	0.9808	0.0098	PrA03-4	0.0086	57.3726
Pr01-5	-----	-----	Pr04-9	0.9808	0.0098	PrA03-5	0.1128	0.39337
Pr01-6	1.0	0.0	Pr04-10	-----	-----	PrA03-6	-----	-----
Pr01-7	-----	-----	Pr04-11	1.0	1.0	PrA03-7	0.1128	3.9337
Pr01-8	-----	-----	Pr04-12	-----	-----	PrA03-8	-----	-----
Pr01-9	-----	-----	Pr05-1	-----	-----	PrA03-9	-----	-----
Pr01-10	-----	-----	Pr05-2	0.6286	0.2954	PrA03-10	0.0337	14.3288
Pr01-11	-----	-----	Pr05-3	-----	-----	PrA03-11	-----	-----
Pr01-12	-----	-----	Pr05-4	0.8110	0.1165	PrA03-12	-----	-----
Pr02-1	1.0	0.0	Pr05-5	0.9808	0.0098	PrA03-13	1.0	0.0
Pr02-2	-----	-----	Pr05-6	0.7776	0.1430	PrA07-1	-----	-----
Pr02-3	-----	-----	Pr05-7	-----	-----	PrA07-2	-----	-----
Pr02-4	-----	-----	Pr05-8	-----	-----	PrA07-3	-----	-----
Pr02-5	0.5762	0.3677	Pr05-9	0.7776	0.1430	PrA07-4	-----	-----
Pr02-6	-----	-----	Pr05-10	0.0086	57.3726	PrA07-5	-----	-----
Pr02-7	-----	-----	Pr05-11	1.0	0.0	PrA07-6	1.0	0.0
Pr02-8	-----	-----	Pr05-12	-----	-----	PrA07-7	-----	-----
Pr02-9	-----	-----	Pr05-13	-----	-----	PrA07-8	-----	-----
Pr02-10	0.0195	25.1195	Pr05-14	-----	-----	PrA07-9	1.0	0.0
Pr02-11	-----	-----	Pr05-15	1.0	0.0	PrA07-10	-----	-----
Pr02-12	1.0	0.0	Pr05-16	-----	-----	PrA07-11	-----	-----
Pr03-1	0.1088	4.0935	Pr05-17	1.0	0.0	PrA07-12	0.0195	25.1195
Pr03-2	1.0	0.0	Pr06-1	1.0	0.0	PrA07-13	1.0	0.0
Pr03-3	1.0	0.0	Pr06-2	-----	-----	PrA13-1	1.0	0.0
Pr03-4	0.9808	0.0098	Pr06-3	-----	-----	PrA13-2	-----	-----
Pr03-5	-----	-----	Pr06-4	1.0	0.0	PrA13-3	1.0	0.0
Pr03-6	-----	-----	Pr06-5	-----	-----	PrA13-4	-----	-----
Pr03-7	0.7776	0.1430	Pr06-6	-----	-----	PrA13-5	-----	-----
Pr03-8	-----	-----	Pr06-7	-----	-----	PrA13-6	-----	-----
Pr03-9	-----	-----	Pr06-8	-----	-----	PrA13-7	0.8110	0.1165
Pr03-10	-----	-----	Pr06-9	-----	-----	PrA13-8	0.1128	3.9337
Pr04-1	1.0	0.0	Pr06-10	1.0	0.0	PrA13-9	0.9808	0.0098
Pr04-2	1.0	0.0	Pr06-11	-----	-----	PrA13-10	-----	-----
Pr04-3	-----	-----	Pr06-12	-----	-----	PrA13-11	-----	-----
Pr04-4	1.0	0.0	Pr06-13	1.0	0.0	Promedio	0.8767	0.0703

\*  $G_{ST}$  = Coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones;  $Nm$  = Estimado de flujo génico a partir de  $G_{ST}$ . ----- = División entre cero (no puede calcularse).

**Anexo 2-c.** Valores de diferenciación genética y flujo génico por locus entre las regiones centro y sureste de México.

Oligo-Locus	$G_{ST}^*$	$Nm^*$	Oligo-Locus	$G_{ST}^*$	$Nm^*$	Oligo-Locus	$G_{ST}^*$	$Nm^*$
Pr01-1	0.0224	21.8221	Pr04-5	-----	-----	PrA03-1	-----	-----
Pr01-2	-----	-----	Pr04-6	-----	-----	PrA03-2	-----	-----
Pr01-3	0.0224	21.8221	Pr04-7	-----	-----	PrA03-3	-----	-----
Pr01-4	-----	-----	Pr04-8	-----	-----	PrA03-4	-----	-----
Pr01-5	-----	-----	Pr04-9	-----	-----	PrA03-5	-----	-----
Pr01-6	-----	-----	Pr04-10	-----	-----	PrA03-6	-----	-----
Pr01-7	-----	-----	Pr04-11	-----	-----	PrA03-7	-----	-----
Pr01-8	-----	-----	Pr04-12	-----	-----	PrA03-8	-----	-----
Pr01-9	-----	-----	Pr05-1	-----	-----	PrA03-9	-----	-----
Pr01-10	-----	-----	Pr05-2	0.7108	0.2034	PrA03-10	0.0031	158.6044
Pr01-11	-----	-----	Pr05-3	-----	-----	PrA03-11	-----	-----
Pr01-12	-----	-----	Pr05-4	1.0	0.0	PrA03-12	-----	-----
Pr02-1	-----	-----	Pr05-5	-----	-----	PrA03-13	-----	-----
Pr02-2	-----	-----	Pr05-6	-----	-----	PrA07-1	-----	-----
Pr02-3	-----	-----	Pr05-7	-----	-----	PrA07-2	-----	-----
Pr02-4	-----	-----	Pr05-8	-----	-----	PrA07-3	-----	-----
Pr02-5	0.6141	0.3141	Pr05-9	-----	-----	PrA07-4	-----	-----
Pr02-6	-----	-----	Pr05-10	-----	-----	PrA07-5	-----	-----
Pr02-7	-----	-----	Pr05-11	-----	-----	PrA07-6	-----	-----
Pr02-8	-----	-----	Pr05-12	-----	-----	PrA07-7	-----	-----
Pr02-9	-----	-----	Pr05-13	-----	-----	PrA07-8	-----	-----
Pr02-10	0.0147	33.4926	Pr05-14	-----	-----	PrA07-9	1.0	0.0
Pr02-11	-----	-----	Pr05-15	-----	-----	PrA07-10	-----	-----
Pr02-12	1.0	0.0	Pr05-16	-----	-----	PrA07-11	-----	-----
Pr03-1	0.0839	5.4580	Pr05-17	-----	-----	PrA07-12	0.0147	33.4926
Pr03-2	-----	-----	Pr06-1	-----	-----	PrA07-13	-----	-----
Pr03-3	-----	-----	Pr06-2	-----	-----	PrA13-1	-----	-----
Pr03-4	-----	-----	Pr06-3	-----	-----	PrA13-2	-----	-----
Pr03-5	-----	-----	Pr06-4	1.0	0.0	PrA13-3	1.0	0.0
Pr03-6	-----	-----	Pr06-5	-----	-----	PrA13-4	-----	-----
Pr03-7	-----	-----	Pr06-6	-----	-----	PrA13-5	-----	-----
Pr03-8	-----	-----	Pr06-7	-----	-----	PrA13-6	-----	-----
Pr03-9	-----	-----	Pr06-8	-----	-----	PrA13-7	1.0	0.0
Pr03-10	-----	-----	Pr06-9	-----	-----	PrA13-8	-----	-----
Pr04-1	-----	-----	Pr06-10	-----	-----	PrA13-9	-----	-----
Pr04-2	-----	-----	Pr06-11	-----	-----	PrA13-10	-----	-----
Pr04-3	-----	-----	Pr06-12	-----	-----	PrA13-11	-----	-----
Pr04-4	-----	-----	Pr06-13	1.0	0.0	Promedio	0.7945	0.1294

\*  $G_{ST}$  = Coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones;  $Nm$  = Estimado de flujo génico a partir de  $G_{ST}$ . ----- = División entre cero (no puede calcularse).



**Anexo 2-d.** Valores de diferenciación genética y flujo génico por locus entre las cuatro localidades de México (Zacatepec, Cuentepec, Huatlalauca y Kochol).

Oligo-Locus	$G_{ST}^*$	$Nm^*$	Oligo-Locus	$G_{ST}^*$	$Nm^*$	Oligo-Locus	$G_{ST}^*$	$Nm^*$
Pr01-1	0.0758	6.0938	Pr04-5	-----	-----	PrA03-1	-----	-----
Pr01-2	-----	-----	Pr04-6	-----	-----	PrA03-2	-----	-----
Pr01-3	-----	-----	Pr04-7	-----	-----	PrA03-3	-----	-----
Pr01-4	0.0758	6.0938	Pr04-8	-----	-----	PrA03-4	-----	-----
Pr01-5	-----	-----	Pr04-9	-----	-----	PrA03-5	-----	-----
Pr01-6	-----	-----	Pr04-10	-----	-----	PrA03-6	-----	-----
Pr01-7	-----	-----	Pr04-11	-----	-----	PrA03-7	-----	-----
Pr01-8	-----	-----	Pr04-12	-----	-----	PrA03-8	-----	-----
Pr01-9	-----	-----	Pr05-1	-----	-----	PrA03-9	-----	-----
Pr01-10	-----	-----	Pr05-2	0.7818	0.1395	PrA03-10	0.2807	1.2812
Pr01-11	-----	-----	Pr05-3	-----	-----	PrA03-11	-----	-----
Pr01-12	-----	-----	Pr05-4	1.0	0.0	PrA03-12	-----	-----
Pr02-1	-----	-----	Pr05-5	-----	-----	PrA03-13	-----	-----
Pr02-2	-----	-----	Pr05-6	-----	-----	PrA07-1	-----	-----
Pr02-3	-----	-----	Pr05-7	-----	-----	PrA07-2	-----	-----
Pr02-4	-----	-----	Pr05-8	-----	-----	PrA07-3	-----	-----
Pr02-5	0.7448	0.1713	Pr05-9	-----	-----	PrA07-4	-----	-----
Pr02-6	-----	-----	Pr05-10	-----	-----	PrA07-5	-----	-----
Pr02-7	-----	-----	Pr05-11	-----	-----	PrA07-6	-----	-----
Pr02-8	-----	-----	Pr05-12	-----	-----	PrA07-7	-----	-----
Pr02-9	-----	-----	Pr05-13	-----	-----	PrA07-8	-----	-----
Pr02-10	0.0492	9.6555	Pr05-14	-----	-----	PrA07-9	1.0	0.0
Pr02-11	-----	-----	Pr05-15	-----	-----	PrA07-10	-----	-----
Pr02-12	1.0	0.0	Pr05-16	-----	-----	PrA07-11	-----	-----
Pr03-1	0.1091	4.0813	Pr05-17	-----	-----	PrA07-12	0.0734	6.3166
Pr03-2	-----	-----	Pr06-1	-----	-----	PrA07-13	-----	-----
Pr03-3	-----	-----	Pr06-2	-----	-----	PrA13-1	-----	-----
Pr03-4	-----	-----	Pr06-3	-----	-----	PrA13-2	-----	-----
Pr03-5	-----	-----	Pr06-4	1.0	0.0	PrA13-3	1.0	0.0
Pr03-6	-----	-----	Pr06-5	-----	-----	PrA13-4	-----	-----
Pr03-7	-----	-----	Pr06-6	-----	-----	PrA13-5	-----	-----
Pr03-8	-----	-----	Pr06-7	-----	-----	PrA13-6	-----	-----
Pr03-9	-----	-----	Pr06-8	-----	-----	PrA13-7	1.0	0.0
Pr03-10	-----	-----	Pr06-9	-----	-----	PrA13-8	-----	-----
Pr04-1	-----	-----	Pr06-10	-----	-----	PrA13-9	-----	-----
Pr04-2	-----	-----	Pr06-11	-----	-----	PrA13-10	-----	-----
Pr04-3	-----	-----	Pr06-12	-----	-----	PrA13-11	-----	-----
Pr04-4	-----	-----	Pr06-13	1.0	0.0	Promedio	0.7907	0.1323

\*  $G_{ST}$  = Coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones;  $Nm$  = Estimado de flujo génico a partir de  $G_{ST}$ . ----- = División entre cero (no puede calcularse).

**Anexo 2-e.** Valores de diferenciación genética y flujo génico por locus entre las tres localidades de la región centro de México.

Oligo-Locus	$G_{ST}^*$	$Nm^*$	Oligo-Locus	$G_{ST}^*$	$Nm^*$	Oligo-Locus	$G_{ST}^*$	$Nm^*$
Pr01-1	0.0680	6.8556	Pr04-5	-----	-----	PrA03-1	-----	-----
Pr01-2	-----	-----	Pr04-6	-----	-----	PrA03-2	-----	-----
Pr01-3	-----	-----	Pr04-7	-----	-----	PrA03-3	-----	-----
Pr01-4	0.0680	6.8556	Pr04-8	-----	-----	PrA03-4	-----	-----
Pr01-5	-----	-----	Pr04-9	-----	-----	PrA03-5	-----	-----
Pr01-6	-----	-----	Pr04-10	-----	-----	PrA03-6	-----	-----
Pr01-7	-----	-----	Pr04-11	-----	-----	PrA03-7	-----	-----
Pr01-8	-----	-----	Pr04-12	-----	-----	PrA03-8	-----	-----
Pr01-9	-----	-----	Pr05-1	-----	-----	PrA03-9	-----	-----
Pr01-10	-----	-----	Pr05-2	0.1818	2.2500	PrA03-10	0.3761	0.8294
Pr01-11	-----	-----	Pr05-3	-----	-----	PrA03-11	-----	-----
Pr01-12	-----	-----	Pr05-4	-----	-----	PrA03-12	-----	-----
Pr02-1	-----	-----	Pr05-5	-----	-----	PrA03-13	-----	-----
Pr02-2	-----	-----	Pr05-6	-----	-----	PrA07-1	-----	-----
Pr02-3	-----	-----	Pr05-7	-----	-----	PrA07-2	-----	-----
Pr02-4	-----	-----	Pr05-8	-----	-----	PrA07-3	-----	-----
Pr02-5	0.2672	1.3713	Pr05-9	-----	-----	PrA07-4	-----	-----
Pr02-6	-----	-----	Pr05-10	-----	-----	PrA07-5	-----	-----
Pr02-7	-----	-----	Pr05-11	-----	-----	PrA07-6	-----	-----
Pr02-8	-----	-----	Pr05-12	-----	-----	PrA07-7	-----	-----
Pr02-9	-----	-----	Pr05-13	-----	-----	PrA07-8	-----	-----
Pr02-10	0.0440	10.8625	Pr05-14	-----	-----	PrA07-9	-----	-----
Pr02-11	-----	-----	Pr05-15	-----	-----	PrA07-10	-----	-----
Pr02-12	-----	-----	Pr05-16	-----	-----	PrA07-11	-----	-----
Pr03-1	0.0581	8.1131	Pr05-17	-----	-----	PrA07-12	0.0657	7.1062
Pr03-2	-----	-----	Pr06-1	-----	-----	PrA07-13	-----	-----
Pr03-3	-----	-----	Pr06-2	-----	-----	PrA13-1	-----	-----
Pr03-4	-----	-----	Pr06-3	-----	-----	PrA13-2	-----	-----
Pr03-5	-----	-----	Pr06-4	-----	-----	PrA13-3	-----	-----
Pr03-6	-----	-----	Pr06-5	-----	-----	PrA13-4	-----	-----
Pr03-7	-----	-----	Pr06-6	-----	-----	PrA13-5	-----	-----
Pr03-8	-----	-----	Pr06-7	-----	-----	PrA13-6	-----	-----
Pr03-9	-----	-----	Pr06-8	-----	-----	PrA13-7	-----	-----
Pr03-10	-----	-----	Pr06-9	-----	-----	PrA13-8	-----	-----
Pr04-1	-----	-----	Pr06-10	-----	-----	PrA13-9	-----	-----
Pr04-2	-----	-----	Pr06-11	-----	-----	PrA13-10	-----	-----
Pr04-3	-----	-----	Pr06-12	-----	-----	PrA13-11	-----	-----
Pr04-4	-----	-----	Pr06-13	-----	-----	Promedio	0.2112	1.8670

\*  $G_{ST}$  = Coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones;  $Nm$  = Estimado de flujo génico a partir de  $G_{ST}$ . ----- = División entre cero (no puede calcularse).

## REFERENCIAS

- Aagaard, J.E., Krutovskii, K.V. and S.H. Strauss. 1998. RAPDs and allozymes exhibit similar levels of diversity and differentiation among populations and races of Douglas-Fir. *Heredity*, Jul;81(1):69.
- Agapejev, S. 1996. Epidemiology of neurocysticercosis in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, May-Jun;38(3):207-216.
- Agapejev, S., Padula, N.A., Morales, N.M. and M.M. Lima. 2000. Neurocysticercosis and Lennox-Gastaut syndrome: case report. *Arq Neuropsiquiatr*, Jun;58(2B):538-547.
- Aghakhani, N., Comoy, J., Tadie, M., Lacroix, C. and P. Bouree. 1998. Isolated intramedullary cysticercosis, case report. *Neurochirurgie*, Apr;44(2):127-131.
- Amatya, B.M. and Y. Kimula. 1999. Cysticercosis in Nepal: a histopathological study of sixty-two cases. *Am J Surg Pathol*, Oct;23(10):1276-1279.
- Anderson, M.J., Gull, K. and D.W. Denning. 1996. Molecular typing by random amplification of polymorphic DNA and M13 Southern hybridization of related paired isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology*, Jan:87-93.
- Anderson, T.J.C., Haubold, B., Williams, J.T., Estrada-Franco, J.G., Richardson, L., Mollinedo, R., Bockarie, M., Mokili, J., Mharakurwa, S., French, N., Whitworth, J., Velez, I.D., Brockman, A.H., Nosten, F., Ferreira, M.U and K.P. Day. 2000. Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol*;17(10):1467-1482.
- Arafeh, R.M., Sapir, Y., Shimda, A., Iraki, N., Fragman, O. and H.P. Comes. 2002. Patterns of genetic and phenotypic variation in *Iris haynei* and *I. atrofusca* (Iris sect. *Oncocycclus* = the royal irises) along an ecogeographical gradient in Israel and the West Bank. *Molecular Ecology*, Jan;11(1):39-53.
- Avode, D.G., Capo-Chichi, O.B., Ganado, P., Bouteille, B. and M. Dumas. 1996. Epilepsy caused by cysticercosis, apropos of a sociological and cultural investigation conducted at Savalou in Benin. *Bull Soc Pathol Exot*, 89(1):45-47.
- Ayeh-Kumi, P.F., Ali, I.M., Lockhart, L.A., Gilchrist, C.A., Petri Jr., W.A. and R. Haque. 2001. *Entamoeba histolytica*: genetic diversity of clinical isolates from Bangladesh as demonstrated by polymorphisms in the serine-rich gene. *Experimental Parasitology*;99:80-88.

Bandi, C., La Rosa, G., Bardin, M.G., Damiani, G., Comincini, S., Tasciotti, L. and E. Pozio. 1995. Random amplified polymorphic DNA fingerprints of the eight taxa of *Trichinella* and their comparison with allozyme analysis. *Parasitology*, 110:401-407.

Bandi, C., La Rosa, G., Comincini, S., Damiani, G. and E. Pozio. 1993. Random amplified polymorphic DNA technique for the identification of *Trichinella* species. *Parasitology*, 107:419-424.

Black, W.C. IV. 1996. Statistical analysis of arbitrary primed PCR patterns in molecular taxonomical studies. *En Clapp, J.P., Ed. 1996. Methods in molecular biology, species diagnostics protocols, PCR and other nucleic acids methods. Vol. 50.* Humana Press, USA.

Blackwell, J.M. 1997. Parasite genome analysis; Progress in *Leishmania* genome project. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 91:107-110.

Botero, D., Tanowitz, H., Weis, L. and M. Wittner. 1993. Taeniasis and cysticercosis. *Infect Dis Clin North Am*, 7:683-697. *En Cruz et al., 1994. Human subcutaneous Taenia solium cysticercosis in an Andean population with neurocysticercosis. Am J Trop Med Hyg*, 51(4):405-407.

Buitrago, M., Edwards, B. and F. Rosner. 1995. Neurocysticercosis: report of fifteen cases. *Mt Sinai J Med*, Nov;62(6):439-444.

Buso, G.S.C., Rangel, P.H. and M.E. Ferreira. 1998. Analysis of genetic variability of South American wild rice populations (*Oryza glumaepatula*) with isozymes and RAPD markers. *Molecular Ecology*, Jan;7(1):107-117.

Bussell, J.D., Waycott, M., Chappill, J.A. and S.H. James. 2002. Molecular phylogenetic analysis of the evolution of complex hybridity in *Isotoma petraea*. *Evolution Int J Org Evolution*, Jun;56(6):1296-1302.

Cao, W., Van Der Ploeg, C.P., Xu, J., Gao, C., Ge, L. and J.D. Habbema. 1997. Risk factors for human cysticercosis morbidity: a population-based case-control study. *Epidemiol Infect*, Oct;119(2):231-235.

Carangelo, B., Erra, S., Del Basso De Caro, M.L., Bucciero, A., Vizioli, L., Panagiotopoulos, K. and A. Cerillo. 2001. Neurocysticercosis, case report. *J Neurosurg Sci*, Mar;45(1):43-46.

Carrique-Mas, J., Iihoshi, N., Widdowson, M.A., Roca, Y., Morales, G., Quiroga, J., Cejas, F., Caihuara, M., Ibarra, R. and M. Edelsten. 2001. An epidemiological study of *Taenia solium* cysticercosis in a rural population in the Bolivian Chaco. *Acta Trop*, Dec 21;80(3):229-235.

Correa, D., Sarti, E., Tapia-Romero, R., Rico, R., Alcántara-Anguiano, I., Salgado, A., Valdez, I. and A. Flisser. 1999. Antigens and antibodies in sera from human cases of epilepsy or taeniasis from an area of Mexico where *Taenia solium* cysticercosis is endemic. *Ann Trop Med Parasitol*, Jan;93(1):69-74.

Cruz, I., Cruz, M.E., Teran, W., Schantz, P.M., Tsang, V. and M. Barry. 1994. Human subcutaneous *Taenia solium* cysticercosis in an Andean population with neurocysticercosis. *Am J Trop Med Hyg*, 51(4):405-407.

Cruz, M.E., Preux, P.M., Debrock, C., Cruz, I., Schantz, P.M., Tsang, V.C. and M. Dumas. 1999. Epidemiology of cerebral cysticercosis in an Andean community in Ecuador. *Bull Soc Pathol Exot*, Feb;92(1):38-41.

Cuellar, R., Molinero, M., Ramírez, F. and V. Vallejo. 1999. Clinical findings in an active cerebral neurocysticercosis in pediatrics. *Rev Neurol*, Aug16-31;29(4):334-337.

Chansiripornchai, N., Ramasoota, P., Bangtrakulnonth, A., Sasipreeyajan, J. and S.B. Svenson. 2000. Applications of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for typing avian *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 29:221-225.

Chapman, A., Vallejo, V., Mossie, K.G., Ortiz, D., Agabian, N. and A. Flisser. 1995. Isolation and characterization of species-specific DNA probes from *Taenia solium* and *Taenia saginata* and their use in an egg detection assay. *Journal of Clinical Microbiology*, May:1283-1288.

Chatel, G., Gulletta, M., Scolari, C., Bombana, E., El-Hamad, I., Matteelli, A. and G. Carosi. 1999. Neurocysticercosis in an Italian traveler to Latin-America. *Am J Trop Med Hyg*, Feb;60(2):255-256.

Cheng, T.C. 1986. *General Parasitology*. 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press College. USA.

Chimelli, L., Lvalho, A.F. and O.M. Takayanagui. 1998. Neurocysticercosis: contribution of autopsies in the consolidation of mandatory notification in Ribeirão Preto-SP, Brazil. *Arq Neuropsiquiatr*, Sep;56(3B):577-584.

David, S. and E. Mathai. 2000. Ocular cysticercosis-a review of 25 cases. *J Assoc Physicians India*, Jul;48:704-707.

Davies, C.M., Webster, J.P., Krüger, O., Munatsi, A., Ndamba, J. and M.E.J. Woolhouse. 1999. Host-parasite population genetics: a cross-sectional comparison of *Bulinus globosus* and *Schistosoma haematobium*. *Parasitology*, 119: 295-302.

Dawson, I.K., Chalmers, K.J., Waugh, R. and W. Powell. 1993. Detection and analysis of genetic variation in *Hordeum spontaneum* populations from Israel using RAPD markers. *Molecular Ecology*, 2:151-159. En Palacios and González-

- Candelas, 1997. Analysis of population genetic structure and variability using RAPD markers in the endemic and endangered *Limonium dufourii* (Plumbaginaceae). *Molecular Ecology*, 6:1107-1121.
- de Aluja, A.S., Martínez, J.J. and A.N. Villalobos. 1998. *Taenia solium* cysticercosis in young pigs: age at first infection and histological characteristics. *Vet Parasitol*, Mar 31;76(1-2):71-79.
- Deitsch, K.W., Moxon, E.R. and T.E. Wellems. 1997. Shared themes of antigenic variation and virulence in bacterial, protozoal and fungal infections. *Microbiol Mol Biol Rev*, Sept;61(3):281-293.
- de Souza, P.E., Barreto, D.C., Fonseca, L.M., de Paula, A.M., Silva, E.C. and R.S. Gómez. 2000. Cysticercosis of the oral cavity: report of seven cases. *Oral Dis*, Jul;6(4):253-255.
- Dixon, H.B.F. and F.M. Lipscomb. 1961. Cysticercosis, an analysis and follow up of 450 cases. *Med Res Coun Spec Rep Ser (Lond)*, 299:1-58. En Cruz et al., 1994. Human subcutaneous *Taenia solium* cysticercosis in an Andean population with neurocysticercosis. *Am J Trop Med Hyg*, 51(4):405-407.
- Dumas, M., Grunitzky, K., Belo, M., Dabis, F., Deniau, M., Bouteille, B., Kassankogno, Y., Catanzano, G. and M.P. Alexandre. 1990. Cysticercosis and neurocysticercosis: epidemiological survey in north Togo. *Bull Soc Pathol Exot*, 83(2):263-274.
- Dykhuizen, D.E., Polin, D.S., Dunn, J.J., Wilske, B., Preac-Mursic, V., Dattwyler, R.J. and B.J. Luft. 1993. *Borrelia burgdorferi* is clonal: implications for taxonomy and vaccine development. *Proc Natl Acad Sci USA*, Nov;90:10163-10167.
- Ehnert, K.L., Roberto, R.R., Barrett, L., Sorvillo, F.J. and G.W. 3<sup>rd</sup>. Rutherford. 1992. Cysticercosis: first 12 months of reporting in California. *Bull Pan Am Health Organ*, 26(2):165-172.
- Epstein, H. and M. Bichard. 1984. *Evolution of Domesticated Animals*. Ed. Mason, I. L. UK. En Nakao et al., 2002. A phylogenetic hypothesis for the distribution of two genotypes of the pig tapeworm *Taenia solium* worldwide. *Parasitology*, 124:657-662.
- Fleury, A., Gomez, T., Alvarez, I., Meza, D., Huerta, M., Chavarria, A., Carrillo-Mezo, R.A., Lloyd, C., Dessein, A., Preux, P.M., Dumas, M., Larralde, C., Sciutto, E. and G. Fragoso. 2002. High prevalence of calcified silent neurocysticercosis in a rural village of Mexico. *Neuroepidemiology*. En prensa.
- Flisser, A. and M.W. Lightowers. 2001. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Apr;96(3):353-356.

- Font Puig, C., Ruiz Postigo, J.A., Munoz Batet, C., Pardos Arnal, F. and M. Corachan Cuyas. 1999. Neurocysticercosis in Spain: apropos 4 cases seen in immigrant patients from endemic countries. *An Med Intera*, Feb;16(2):89-91.
- Forlenza, O.V., Filho, A.H., Nobrega, J.P., dos ramos Machado, L., de Barros, N.G., de Camargo, C.H. and M.F. da Silva. 1997. Psychiatric manifestations of neurocysticercosis: a study of 38 patients from a neurology clinic in Brazil. *J Neurol Psychiatry*, Jun;62(6):612-616.
- Gagne, G., Roeckel-Drevet, P., Grezes-Besset, B., Shindrova, P., Ivanov, P., Grand-Ravel, C., Vear, F., Charmet, G. and P. Nicolas. 2000. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) as suitable markers to study *Orobanche cumana* genetic diversity. *Molecular Ecology*, Aug;14(8):457.
- Garcia, G., Sciutto, E., Fragoso, G., Cruz-Revilla, C., Toledo, A., Villalobos, N., Flores, I., de Aluja, A.S., José, M.V. and C. Larralde. 2001. Inhibitory role of antibodies in the development of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* toward reproductive and pathogenic stages. *Journal of Parasitology*, Jun;83(3):582-6.
- Garcia, H.H., Talley, A., Gilman, R.H., Zorrilla, L. and J. Peralta. 1999. Epilepsy and neurocysticercosis in a village in Huaraz, Peru. *Clin Neurol Neurosurg*, Dec;101(4):225-228.
- Gascon, J., Corachan, M. and J. Ramirez. 1989. 5 cases of cysticercosis in Rwanda. *Med Trop (Mars)*, Jan-Mar;49(1):77-80.
- Gomes, M.A., Melo, M.N., Macedo, A.M., Furst, C. and E.F. Silva. 2000. RAPD in the analysis of isolates of *Entamoeba histolytica*. *Acta Tropica*, 75:71-77.
- Ghosh, D., Dubey, T.N. and S. Prabhakar. 1999. Brain parenchymal, subarachnoid racemose, and intraventricular cysticercosis in an Indian man. *Postgrad Med J*, Mar;75(881):164-166.
- Gosselin, L., Jobidon, R. and L. Bernier. 1999. Genetic variability and structure of Canadian populations of *Chondrostereum purpureum*, a potential biophytocide. *Molecular Ecology*, 8(1):113-122.
- Griesinger, W. 1862. Cysticerken und ihre diagnose, Archive für Heilkunde, *Gesammelte Abhandlungen*, Berlin, 3999 p. En Sciutto et al., 2000. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developed countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes Infect*, Dec;2(15):1875-90.
- Grunitzky, E., Balagou, A.K., M'Bella, M., Belo, M., Sadzo, A., Bouteille, B. and M. Dumas. 1995. Cysticercosis in patients with neurologic diseases in hospital milieu in Lome, Togo. *Ann Med Interne (Paris)*, 146(6):419-422.

- Hadrys, H., Balick, M. and B. Schierwater. 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology*, 1:55-63.
- Hancock, K., Broughel, D.E., Moura, I.N.S., Khan, A., Pieniazek, N.J., González, A.E., Garcia, H.H., Gilman, R.H. and V.C.W. Tsang. 2001. Sequence variation in the cytochrome oxidase I, internal transcribed spacer 1, and Ts14 diagnostic antigen sequences of *Taenia solium* isolates from South and Central America, India, and Asia. *International Journal for Parasitology*, 31:1601-1607.
- Handali, S., Liying, H., Lusikov, C., Senis, J. and D. Sihombing. 1997. A survey report-July 1993: cysticercosis in the Grand Dani Valley, Jayawijaya District, Irian Jaya Province, Indonesia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 28 Suppl 1:22-25.
- Hardy, G.H. 1908. Mendelian proportions in a mixed population. *Science*, 28:49-50. En Hedrick, 2000. *Genetics of Populations*. 2<sup>nd</sup> ed. Jones and Bartlett Publishers. USA.
- Hartl, D.L. and A.G Clark. 1989. *Principles of Population Genetics*. 2<sup>nd</sup> ed. Sinauer Associates. USA.
- Hashmi, G. and R. Gaugler. 1998. Genetic diversity in insect-parasitic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae). *J Inv Parasitol*, 72:185-189.
- Hedrick, W.P. 2000. *Genetics of Populations*. 2<sup>nd</sup> ed. Jones and Bartlett Publishers. USA.
- Higazi, T.B., Katholi, C.R., Mahmoud, B.M., Baraka, O.Z., Mukhtar, M.M., Al Qubati, Y. and T. R. Unnash. 2001. *Onchocerca volvulus*: genetic diversity of parasite isolates from Sudan. *Experimental Parasitology*;97:24-34.
- Hillis, D.M., Moritz, C., and B.K. Mable. 1996. *Molecular Systematics*. 2<sup>nd</sup> ed. Sinauer Associates. USA.
- Hinz, E. 1991. Current status of food-borne parasitic zoonoses in West Germany. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, Dec 22 Suppl:78-84.
- Hoberg, E.P., Alkire, N.L., De Queiroz, A. and A. Jones. 2001. Out of Africa: origins of the *Taenia* tapeworms in humans. *Proc R Soc Lond B*, 268:781-787.
- Hoste, H., Chilton, N.B., Beveridge, I. and R.B. Gasser. 1998. A comparison of the first internal transcribed spacer of ribosomal DNA in seven species of *Trichostrongylus* (Nematoda: Trichostrongylidae). *International Journal for Parasitology*, 28:1251-1260.
- Huerta, M., de Aluja, A.S., Fragoso, G., Toledo, A., Villalobos, N., Hernández, M., Gevorkian, G., Acero, G., Díaz, A., Álvarez, I., Ávila, R., Beltrán, C., García, G.,



- Martínez, J.J., Larralde, C. and E. Sciutto. 2000. Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. *Vaccine*, Oct 12;20(1-2):262-266.
- Jordano, P. and J.A. Godoy. 2000. RAPD variation and population genetic structure in *Prunus mahaleb* (Rosaceae), an animal dispersed tree. *Molecular Ecology*, 9:1293-1305.
- Kamal, M.M. and S.V. Grover. 1995. Cytomorphology of subcutaneous cysticercosis, a report of 10 cases. *Acta Cytol*, Jul-Aug;39(4):809-812.
- Král'ová, I. and M. Spakulová. 1996. Intraspecific variability of *Proteocephalus exiguus* La Rue, 1911 (Cestoda: Proteocephalidae) as studied by random amplified polymorphic DNA method. *Parasitol Res*, 82:542-545.
- Kwon, J.A. and C.W. Morden. 2002. Population genetic structure of two rare tree species (*Colubrina oppositifolia* and *Alphitonia ponderosa*, Rhamnaceae) from Hawaiian dry and mesic forests using random amplified polymorphic DNA markers. *Molecular Ecology*, 11:991-1001.
- Lara-Aguilera, R., Mendoza-Cruz, J.F., Martínez-Toledo, J.L., Macías-Sánchez, R., Willms, K., Altamirano-Rojas, L. and A. Santamaría-Llano. 1992. *Taenia solium* taeniasis and neurocysticercosis in a Mexican rural family. *Am J Trop Med Hyg*, Jan;46(1):85-86.
- Liedloff, A. 1999. *Mantel Nonparametric Test Calculator for Windows Version 2.00*. School of Natural Resource Sciences, Queensland University of Technology, Australia.
- Lowe, A.J., Gillies, A.C.M., Wilson, J. and I.K. Dawson. 2000. Conservation genetics of bush mango from central/west Africa: implications from random amplified polymorphic DNA analysis. *Molecular Ecology*, 9:831-841.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27:209-220.
- Masiga, D.K., Tait, A. and C.M.R. Turner. 2000. Amplified restriction fragment length polymorphism in parasite genetics. *Parasitology Today*;16(8):350-353.
- Mavárez, J., Amarista, M., Pointier, P. and P. Jarne. 2002. Fine-scale population structure and dispersal in *Biomphalaria glabrata*, the intermediate snail host of *Schistosoma mansoni* in Venezuela. *Molecular Ecology*, May;11(7):879-889.
- Medina, M.T., Rosas, E., Rubio-Donnadieu, F. and J. Sotelo. 1990. Neurocysticercosis as the main cause of late-onset epilepsy in Mexico. *Arch Intern Med*, Feb;150(2):325-327.

- Mengistu, L.W., Mueller-Warrant, G.W. and R.E. Barker. 2000. Genetic diversity of *Poa annua* in western Oregon grass seed crops. *Theor Appl Genet*, 101:70-79.
- McKelvie, P.A. and J.M. Goldsmid. 1988. Childhood central nervous system cysticercosis in Australia. *Med J Aust*, Jul 4;149(1):42-44.
- Molinari, J.L., Rodriguez, D., Tato, P., Soto, R., Arechavaleta, F. and S. Solano. 1997. Field trial for reducing porcine *Taenia solium* cysticercosis in Mexico by systematic vaccination of pigs. *Vet Parasitol*, Apr;69(1-2):55-63.
- Moore, A.C., Lutwick, L.I., Schantz, P.M., Pilcher, J.B., Wilson, M., Hightower, A.W., Chapnick, E.K., Abter, E.I., Grossman, J.R. and J.A. Fried. 1995. Seroprevalence of cysticercosis in an Orthodox Jewish community. *Am J Trop Med Hyg*, Nov;53(5):439-42.
- Morden, C.W. and W. Loeffler. 1999. Fragmentation and genetic differentiation among subpopulations of the endangered Hawaiian mint *Haplostachys haplostachya* (Lamiaceae). *Molecular Ecology*, Apr;8(4):617-625.
- Morgan, U.M., Constantine, C.C., Greene, W.K. and R.C.A. Thompson. 1993. RAPD (random amplified polymorphic DNA) analysis of *Giardia* DNA and correlation with isoenzyme data. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 87:702-705.
- Moya, A., Guirao, P., Cifuentes, D., Beitia, F. and J.L. Cenis. 2001. Genetic diversity of Iberian populations of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) based on random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. *Molecular Ecology*, 10:891-897.
- Muller, R., Lillywhite-Bending, J.J. and J.C. Catford. 1987. Human cysticercosis and intestinal parasitism amongst the Ekari people of Irian Jaya. *J Trop Med Hyg*, 90:291-296. En Cruz et al., 1994. Human subcutaneous *Taenia solium* cysticercosis in an Andean population with neurocysticercosis. *Am J Trop Med Hyg*, 51(4):405-407.
- Nakao, M., Okamoto, M., Sako, Y., Yamasaki, H., Nakaya, K. 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. *Am Nat*, 106:283-292.
- Nei, M. 1973. analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 70:3321-3323.
- Nei, M. 1978. Estimation of the average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89:583-590.
- Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, USA.

- Nei, M. and W.H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76:5269-5273.
- Ohnishi, K., Murata, M., Nakane, M., Takemura, N., Tsuchida, T. and T. Nakakura. 1993. Cerebral cysticercosis. *Intern Med*, Jul;32(7):569-573.
- Olsen, O.W. 1986. *Animal Parasites, their life cycles and ecology*. 3<sup>rd</sup> ed. Dover Publications. USA.
- Pagés, J.R., Durand, P., Southgate, V.R., Tchuem Tchuenté, L.A. and J. Jourdane. 2001. Molecular arguments for splitting of *Schistosoma intercalatum*, into two distinct species. *Parasitol Res*, 87:57-62.
- Pal, D.K., Carpio, A. and J.W. Sander. 2000. Neurocysticercosis and epilepsy in developing countries. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, Feb;68(2):137-143.
- Palacios, C. and F. González-Candelas. 1997. Analysis of population genetic structure and variability using RAPD markers in the endemic and endangered *Limonium dufourii* (Plumbaginaceae). *Molecular Ecology*, 6:1107-1121.
- Plancarte, A., Hirota, C., Martínez-Ocana, J., Mendoza-Hernández, G., Centeno, E. and A. Flisser. 1999. Characterization of GP39-42 and GP24 antigens from *Taenia solium* cysticerci and of their antigenic GP10 subunit. *Parasitol Res*, Aug;85(8-9):680-684.
- Ponnighaus, J.M., Nkhosa, P. and H.P. Baum. 2001. Cutaneous manifestations of cysticercosis. *Huatarzt*, Dec;52(12):1098-1100.
- Proano-Narvaez, J.V., Meza-Lucas, A., Mata-Ruiz, O., García-Jerónimo, R.C. and D. Correa. 2002. Laboratory diagnosis of human cysticercosis: double-blind comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and electroimmunotransfer blot assay. *J Clin Microbiol*, Jun;40(6):2115-2118.
- Prugnolle, F., De Meeus, T., Durand P., Sire, C. and A. Theron. 2002. Sex-specific genetic structure in *Schistosoma mansoni*: evolutionary and epidemiological implications. *Molecular Ecology*, Jul;11(7):1231-1238.
- Rodríguez-Canul, R., Fraser, A., Allan, J.C., Domínguez-Alpizar, J.L., Argaez-Rodríguez, F. and P.S. Craig. 1999. Epidemiological study of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis in a rural village in Yucatan state, Mexico. *Ann Trop Med Parasitol*, Jan;93(1):57-67.
- Rousseau, M.C., Guillotel, B. and J. Delmont. 1999. Neurocysticercosis in the South-East of France 1988-1998. *Presse Med*, Dec 11;28(39):2141-2144.

- Rubin, L.L. and J.M. Staddon. 1999. The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci*, 22:11-28.
- Ruiz-García, M., González-Astiazaran, A. and F. Rueda-Franco. 1997. Neurocysticercosis in children: Clinical experience in 122 patients. *Childs Nerv Syst*, Nov-Dec;13(11-12):608-612.
- Sabel, M., Neuen-Jacob, E., Vogt, C. and F. Weber. 2001. Intracerebral neurocysticercosis mimicking glioblastoma multiforme: a rare differential diagnosis in central Europe. *Neuradiology*, Mar;43(3):227-230.
- Sánchez, A.L., Ljungström, I. and M.T. Medina. 1999. Diagnosis of human neurocysticercosis in endemic countries: a clinical study in Honduras. *Parasitol Int*, Mar;48(1):81-89.
- Sánchez, A.L., Medina, M.T. and I. Ljungström. 1998. Prevalence of taeniasis and cysticercosis in a population of urban residence in Honduras. *Acta Tropica*;69:141-149.
- Sandoval, H., Manga-González, Y., Campo, R., García, P., Castro, J.M. and M. Pérez de la Vega. 1999. Preliminary study on genetic variability of *Dicrocoelium dendriticum* determined by random amplified polymorphic DNA. *Parasitology International*, 48:21-26.
- Sarti, E., Schantz, P.M., Ávila, G., Ambrosio, J., Medina-Santillán, R. and A. Flisser. 2000. Mass treatment against human taeniasis for the control of cysticercosis: a population based intervention study. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, Jan-Feb;94(1):85-89.
- Schantz, P.M. and J. McAuley. 1991. Current status of food-borne parasitic zoonoses in the United States. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, Dec 22 Suppl:65-71.
- Schmidt, G.G. and L.S. Roberts. 1996. *Foundations of Parasitology*. 5<sup>th</sup> ed. Wm. C. Brown Publishers. USA.
- Sciutto, E., Fragoso, G., Fleury, A., Lacleste, J.P., Sotelo, J., Aluja, A., Vargas, L. and C. Larralde. 2000. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developed countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes Infect*, Dec;2(15):1875-90.
- Sciutto, E., Martínez, J.J., Villalobos, N.M., Hernández, M., José, M.V., Beltrán, C., Rodarte, F., Flores, I., Bobadilla, J.R., Fragoso, G., Parkhouse, M.E., Harrison, L.J., de Aluja, A.S. 1998. Limitations of current diagnostic procedures for the diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in rural pigs. *Vet Parasitol*, Nov 27;79(4):299-313.

- Shannon, C.E. and W. Weaver. 1949. *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Urbana Press, USA.
- Siles-Lucas, M., Cuesta-Bandera, C. and M. César-Benito. 1993. Random amplified polymorphic DNA technique for speciation studies of *Echinococcus granulosus*. *Parasitol Res*, 79:343-345.
- Singh, G. 1997. Neurocysticercosis in South-Central America and the Indian subcontinent, a comparative evaluation. *Arq Neuropsiquiatr*, 55(3-A):349-356.
- Slatkin, M. and N.H. Barton. 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution*, 43:1349-1368.
- Steindel, M., Dias-Neto, E., Carvalho-Pinto, C.J., Grisard, E.C., Menezes, C.L.P., Murta, S.M.F., Simpson, A.J.G. and A.L. Romanha. 1994. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and isoenzyme analysis of *Trypanosoma rangeli* strains. *J Euk Microbiol*, 41(3):261-267.
- Sun, M. 1999. Cleistogamy in *Scutellaria indica* (Labiatae): effective mating system and population genetic structure. *Molecular Ecology*, 8:1285-1295.
- Takayanagui, O.M. 1990. Neurocysticercosis. I. Clinical and laboratory course of 151 cases. *Arq Neuropsiquiatr*, Mar;48(1):1-10.
- Thomson, A.J. 1993. Neurocysticercosis-experience at the teaching hospitals of the University of Cape Town. *S Afr Med J*, May;83(5):332-334.
- Toledo, A., Fragoso, G., Rosas, G., Hernández, M., Gevorkian, G., López-Casillas, F., Hernández, B., Acero, G., Huerta, M., Larralde, C. and E. Sciutto. 2001. Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1 response. *Infect Immun*, Mar;69(3):1766-1773.
- Tseng, C., Ting E., Johnson, D., Saluta, M. and R. Dunst. 2001. Use of RAPD fingerprinting for differentiating *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. *Life Science News*, 7. Amersham Pharmacia Biotech.
- Van de Peer, Y. and R. De Wachter. 1997. Construction of evolutionary distance trees with TreeCon for Windows: accounting for variation in nucleotide substitution rate among sites. *Comput Applic Biosci*, 13:227-230.
- Vanista, J., Lapkova, E. and M. Uhlikova. 1993. Cysticercosis in the Czech Republic. *Cesk Epidemiol Mikrobiol Imunol*, Dec;42(4):187-189.
- Vázquez-Flores, S., Ballesteros-Rodea, G., Flisser, A. and P.M. Schantz. 2001. Hygiene and restraint of pigs is associated with the absence of *Taenia solium*

cysticercosis in a rural community in Mexico. *Salud Pública Méx*, Nov-Dec;43(6):574-576.

Ventura, R.M., Takeda, G.F., Silva, R.A.M.S., Nunes, V.L.B., Buck, G.A. and M.M.G. Teixeira. 2002. Genetic relatedness among *Trypanosoma evansi* stocks by random amplification of polymorphic DNA and evaluation of a synapomorphic DNA fragment for species-specific diagnosis. *International Journal for Parasitology*, 32:53-63.

Veliath, A.J., Ratnakar, C. and L.C. Thakur. 1985. Cysticercosis in South India. *J Trop Med Hyg*, Feb;88(1):25-29.

Wabbels, B., Kruse, F., Helmke, B., Rohrschneider, K. and H.E. Volcker. 2000. Painless orbital swelling after sojourn in tropics, cysticercosis and other parasitic eye disease. *Klin Monatsbl Augenheilkd*, Aug;217(2):109-113.

Walker, J., Chen, S., Packham, D. and P. McIntyre. 1991. Five cases of neurocysticercosis diagnosed in Sydney. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, Dec;22 Suppl:242-244.

Weinberg, W. 1908. Über den nachweis der vererbung beim menchen. Jahresh. Verein f. vaterl. Naturk. In *Wruttemberg*, 64:368-382. En Hedrick, 2000. *Genetics of Populations*. 2<sup>nd</sup> ed. Jones and Bartlett Publishers. USA.

Welsh, J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18(24):7213-7218.

White, A.C. Jr. 2000. Neurocysticercosis: updates on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management. *Annu Rev Med*, 51:187-206.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22):6531-6535.

Widdowson, M.A., Cook, A.J., Williams, J.J., Argaes, F., Rodríguez, I., Domínguez, J.L. and R. Rodríguez. 2000. Investigation of risk factors for porcine *Taenia solium* cysticercosis: a multiple regression analysis of a cross-sectional study in Yucatan Peninsula, Mexico. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, Nov-Dec;94(6):620-624.

Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Ann Eugen*, 15:323-354. En Hedrick, W.P. 2000. *Genetics of Populations*. 2<sup>nd</sup> ed. Jones and Bartlett Publishers. USA.

Wright, S. 1965b. The interpretation of population structure by *F*-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19:395-420. En Hedrick, W.P. 2000. *Genetics of Populations*. 2<sup>nd</sup> ed. Jones and Bartlett Publishers. USA.

Ye, T.Z., Yang, R.C. and F.C. Yeh. 2002. Population structure of a lodgepole pine (*Pinus contorta*) and jack pine (*P. banksiana*) complex as revealed by random amplified polymorphic DNA. *Genome*, Jun;45(3):530-540.

Yeh, F.C., Young, R.C., Timothy, B., Boyle, T.B.J., Ye, Z.H. and J.X. Mao. 1997. *POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis*. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Canada.

Yinkun, F., Shan, O., Xiuzhen, Z. and Y. Shilian. 1979. Clinicoelectroencephalographic studies of cerebral cysticercosis, 158 cases. *Chin Med J*, 92:770-786. En Cruz et al., 1994. Human subcutaneous *Taenia solium* cysticercosis in an Andean population with neurocysticercosis. *Am J Trop Med Hyg*, 51(4):405-407.

Zawko, G., Krauss, S.L., Dixon, K.W. and K. Sivasithamparam. 2001. Conservation genetics of the rare and endangered *Leucopogon obtectus* (Ericaceae). *Molecular Ecology*, 10:2389-2396.