



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

**EVALUACIÓN DE CUATRO
MICROSATÉLITES COMO
MARCADORES PARA LA
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR
DE *Taenia solium* Y EL ESTUDIO DE SU
TRANSMISIÓN**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR

**MÓNICA JEHNKY PAJUELO
TRAVEZAÑO**

LIMA – PERÚ

2017

Asesor

Mirko Zimic Peralta, MSc, PhD

Dedicatoria

Con todo mi amor y agradecimiento,

A Sebastián y Mariano

Aquila y Carlos

Juan Carlos, Junior y José

Agradecimientos

A Mirko Zimic, Robert Gilman, Hugo García y Armando González, por su confianza y apoyo constante, por sus consejos y sugerencias para el desarrollo de este trabajo.

A César Gavidia, Patricia Sheen por sus consejos y apoyo para el desarrollo del trabajo de investigación

A María Eguiluz, Silvia Rodríguez, Manuela Verástegui, Daniela Álvarez y en especial a Elisa Roncal y Stefany Quiñones por su gran trabajo y apoyo en la realización del presente trabajo en sus diferentes fases.

A Juan Calcina, Viterbo Aybar, y en general al Centro de Salud Global por su apoyo en el trabajo de campo y en el manejo de los animales.

A Lauralee Woods, Nate Watts por su apoyo en el contacto con la comunidad de Pampa Elera

A la comunidad de Pampa Elera por permitirnos realizar el trabajo de investigación.

Este trabajo fue financiado parcialmente por National Institutes of Health (D43 TW001140 y D43TW006581).

Declaración de la Autora

La presente Tesis es un Trabajo de Investigación de Grado original y no es el resultado de un trabajo en colaboración con otros, excepto cuando así está citado explícitamente en el texto. No ha sido ni enviado ni sometido a evaluación para la obtención de otro grado o diploma que no sea el presente.

Tabla de Contenidos

Asesor

Dedicatoria

Agradecimientos

Declaración de la Autora

Tabla de Contenidos

Índice de Figuras

Índice de Tablas

Resumen

Abstract

I	Introducción.....	1
II	Planteamiento del problema.....	4
III	Marco teórico	6
III.1	Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i>	6
III.2	Estadios de <i>Taenia solium</i>	8
III.3	Aspectos reproductivos y genéticos de organismos hermafroditas y <i>Taenia solium</i>	11
III.3.1	Definiciones y conceptos básicos	11
III.3.2	Reproducción en parásitos hermafroditas.....	14
III.3.3	Espermatogénesis en <i>Taenia solium</i>	15
III.3.4	Reproducción de <i>Taenia solium</i>	16
III.4	Aspectos epidemiológicos de <i>Taenia solium</i>	17
III.5	Diversidad genética de <i>Taenia solium</i>	19
III.6	Marcadores Microsatélites.....	20

IV	Justificación.....	23
V	Objetivo general.....	25
V.1	Objetivos específicos.....	25
V.2	Objetivo secundario.....	25
VI	Metodología de la investigación	26
VI.1	Diseño del estudio	26
VI.2	Muestras	26
VI.3	Procedimientos y técnicas	27
VI.3.1	Variabilidad Genética de cisticercos recuperados de cerdos infectados experimentalmente	27
VI.3.2	Caracterización molecular de cisticercos recuperados de cerdos infectados naturalmente	35
VI.4	Plan de análisis	38
VI.5	Consideraciones éticas.....	42
VII	Resultados	43
VII.1	Caracterización molecular (genética) de <i>Taenia solium</i> proveniente de una infección artificial.....	43
VII.2	Caracterización molecular de <i>Taenia solium</i> en condiciones naturales.....	45
VII.3	Análisis de los resultados del sistema de electroforesis capilar, comparado con los resultados de secuenciamiento.	54
VIII	Discusión.....	56
VIII.1	Estudio de la identidad genética de <i>T. solium</i> proveniente de una infección artificial.....	56

VIII.2	Estudio de la identidad genética de <i>T. solium</i> en condiciones naturales	60
IX	Conclusiones	66
X	Recomendaciones	67
XI	Referencias Bibliográficas	68
	Anexos	

Índice de Figuras

Figura 1. Clasificación Taxonómica de <i>Taenia solium</i>	6
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i>	8
Figura 3. Escólex de <i>Taenia solium</i>	9
Figura 4 Proglótido maduro de <i>Taenia solium</i> mostrando las partes del sistema reproductivo	10
Figura 5. Huevo de <i>Taenia</i> spp.	10
Figura 6. Proceso de gametogénesis: Formación de espermatozoides y óvulos... 13	
Figura 7. Infección de cerdos con proglótidos de <i>T. solium</i> , utilizando un trozo de plátano.....	29
Figura 8. Identificación y extracción de cisticercos encontrados en la carcasa de los cerdos.....	31
Figura 9. Examen de lengua en un cerdo	37
Figura 10. Obtención de los cisticercos en la carcasa de los cerdos sacrificados. 43	
Figura 11. Cisticercos individualmente extraídos.....	43
Figura 12. Mapa de Pampa Elera Baja.....	47
Figura 13. Identificación y extracción de cisticercos en Pampa Elera.....	48
Figura 14. Dendrograma UPGMA mostrando las distancias genéticas entre cisticercos basados en el polimorfismo de microsatélites.....	53

Índice de Tablas

Tabla 1. Lista de iniciadores de los microsatélites.....	33
Tabla 2. Lista de iniciadores externos para el secuenciamiento de microsatélites	35
Tabla 3. Genotipos en los cisticercos resultantes de la infección artificial expresados en número de repeticiones por marcador.	45
Tabla 4. Características de las personas infectadas con <i>T. solium</i>	47
Tabla 5. Características de los cerdos infectados naturalmente en Pampa Elera, Piura	48
Tabla 6. Genotipos de las tenias aisladas en Pampa Elera expresados en número de repeticiones por marcador.	49
Tabla 7. Genotipos de los cisticercos aislados de los cerdos. Numero de repeticiones	51
Tabla 8. Heterocigosidad esperada	52
Tabla 9. Comparación de frecuencias alélicas entre los resultados de secuenciamientos y de Electroforesis Capilar (QIAxcel)	55

Resumen

La “solitaria”, la *Taenia solium* adulta usualmente vive como único individuo en el intestino delgado de los humanos, es hermafrodita y se autofertiliza. Los mecanismos de variación genética no se conocen con exactitud, sin embargo podrían ser útiles para rastrear la transmisión del parásito. Este estudio explora la variabilidad genética de *T. solium* utilizando microsatélites en dos estudios. El primero explora la variabilidad genética de cisticercos extraídos de cerdos infectados experimentalmente, para ello se infectaron dos grupos de tres cerdos cada uno con proglotis de dos parásitos adultos de *T. solium* genéticamente diferentes. Posteriormente, explora la epidemiología genética y transmisión en cerdos infectados naturalmente y tenias en una comunidad rural de Piura, Perú. En el primer estudio, 92.3% cisticercos de una tenia; y 100% cisticercos de la otra, tuvieron exactamente el mismo genotipo que la *Taenia* parental, sugiriendo que los microsatélites serían una herramienta promisoría para el estudio de la transmisión de *T. solium*. En el segundo estudio, se encontró que cuatro cerdos tenían cisticercos de un solo genotipo, y cuatro cerdos tenían dos tipos de cisticercos, sugiriendo una posible infección múltiple con tenias distintas genéticamente. Seis cerdos tenían cisticercos con un genotipo que correspondía exactamente a una de las *Taenias* identificadas, sin embargo, la asociación de distancias genéticas con las distancias geográficas entre ellos no fue estadísticamente significativa. Estos resultados sugieren que los microsatélites podrían constituir una herramienta potencial para rastrear la dispersión de la infección y para ubicar las fuentes de infección de cerdos con cisticercos con genotipos parentales compartidos.

Palabras Claves

Taenia solium, variabilidad genética, microsatélites, transmisión, cisticercosis

Abstract

The adult *Taenia solium*, the pork tapeworm, usually lives as a single individual in the small intestine of humans, its hermaphrodite and self-fertilizes. Mechanisms of genetic variation in *T. solium* are poorly understood, but could be useful for tracing parasite transmission. This study explores the genetic variability of *T. solium* using microsatellite markers in two studies. The first study explored the genetic variability of *T. solium* from cysticerci recovered from experimentally infected pigs. Two groups of three piglets were each infected with proglottids from one of two genetically different tapeworms. It then explored the genetic epidemiology and transmission in naturally infected pigs and adult tapeworms from an endemic rural community in Peru. In the initial study on experimental infection, 92.3% of cysts originated from one tapeworm, and 100% of cysts from the other had exactly the same genotype as the parental tapeworm, suggesting that the microsatellite markers may be a useful tool for studying the transmission of *T. solium*. In the second study, we found that four pigs had cysts with only one genotype, and four pigs had cysts with two different genotypes, suggesting that multiple infections of genetically distinct parental tapeworms are possible. Six pigs harbored cysts with a genotype corresponding to one of the identified tapeworms from the human carriers, however the association between genetic distances and geographic distances was not statistically significant. We conclude that microsatellites constitute a potentially important tool to trace the spread of infection and pinpoint sources of infection as pigs spread cysts with a shared parental genotype.

Key words

Taenia solium, genetic variability, microsatellites, transmission, cysticercosis

I Introducción

La teniasis/cisticercosis es una zoonosis que afecta a humanos y cerdos. Es causada por el parásito *Taenia solium*, cuyo estadio adulto se hospeda en el hombre, causando teniasis y el estadio larvario o intermedio se hospeda en el cerdo, causando cisticercosis. El hombre puede infectarse accidentalmente con la larva de *T. solium*, desarrollado cisticercosis humana. Si la larva infecta el cerebro, se conoce como neurocisticercosis, y es la principal causa de epilepsia en adultos en zonas endémicas (1).

T. solium está presente en zonas rurales donde se crían cerdos al pastoreo y no existen condiciones sanitarias adecuadas, haciendo propicia la transmisión constante en la comunidad. Actualmente no se conoce otra fuente de infección de este parásito, y debido a sus características ha sido listada como una de las 7 enfermedades con posibilidad de ser erradicada del planeta (2, 3).

Por su importancia en la salud pública y por lo anteriormente descrito, se realizan numerosas investigaciones e intervenciones para lograr su control y/o eliminación de las zonas endémicas de América Latina y África principalmente; con resultados iniciales positivos pero pasajeros o no concluyentes, debido a la reintroducción del parásito (4-10). Específicamente, el Grupo de Trabajo de Cysticercosis en Perú (CWGP, por sus siglas en inglés *Cysticercosis Working Group in Peru*) ha realizado intervenciones en el norte del país, logrando eliminar el parásito, con intervenciones coordinadas dirigidas en humanos y cerdos, en el 95% de comunidades intervenidas en un área de 100,000 habitantes en el departamento de Tumbes (11, 12). Sin embargo vigilancias posteriores al término de las

intervenciones han indicado que puede haber re-introducción del parásito (12, 13), y que el mantenimiento de eliminación en esta región requiere una comprensión completa de la dinámica de transmisión y los mecanismos de dispersión de huevo con el fin de optimizar la eficiencia de las intervenciones. Así mismo, para replicar la intervención y para la posible exportación de la estrategia a otros lugares endémicos, ésta debería estar basada en fundamentos teóricos sólidos.

En este sentido, las herramientas moleculares constituyen un instrumento apropiado para esclarecer aspectos desconocidos de la dinámica de la transmisión. Los marcadores moleculares, tales como los microsatélites han probado ser útiles en el estudio de los patrones de dispersión de algunos parásitos, característica que los haría eficientes para la determinación del origen de un brote (14). Así por ejemplo en el caso del *Echinococcus multilocularis*, un cestodo cercano a *T. solium*, el marcador molecular EmsB, microsatélite de peculiar naturaleza que consta de repeticiones de repeticiones, ha ayudado a esclarecer patrones de dispersión en Europa, incluso a nivel local en Italia, Francia, entre otros (15-17).

En el caso de *T. solium*, se ha descrito poca o nula variabilidad genética utilizando marcadores convencionales tales como los genes mitocondriales (citocromo oxidasa 1, citocromo b) o los marcadores nucleares (AgV1 y Ag2), probablemente debido a su naturaleza hermafrodita y al tipo de reproducción de autofertilización (18-20). Sin embargo, utilizando la técnica RAPD (del inglés: *Random Amplified Polymorphic DNA*), se pudo demostrar que existe variabilidad genética en *T. solium* en comunidades rurales de México (21-23); no obstante, se sabe que esta técnica no es reproducible (24) y tampoco sería posible estudiar la transmisión genética de una generación a otra. Existe, por tanto la necesidad de contar con

marcadores de evolución rápida que exhiban mayor polimorfismo, pero a su vez que sean reproducibles. Recientemente se ha identificado un grupo de marcadores moleculares microsátélites con potencial para el estudio de la genética de poblaciones, pues se ha logrado diferenciar poblaciones del norte y sur del Perú (25).

II Planteamiento del problema

Actualmente, no se conoce con exactitud la dinámica de transmisión de *T. solium* en comunidades endémicas. Los marcadores microsatélites identificados en el genoma del parásito, a diferencia de los utilizados en estudios previos, revelan que sí es posible diferenciar genotipos circulantes en regiones endémicas en Perú, específicamente entre las regiones de Tumbes y Puno (25). Así mismo se evidenció variabilidad genética en muestras de parásitos de una misma región indicando, por tanto, que los marcadores microsatélites podrían ser útiles para el estudio de la dinámica de transmisión de este parásito a nivel regional, y posiblemente a nivel local en las comunidades. Sin embargo, a la fecha, no se cuenta con una herramienta que permitan identificar de manera precisa poblaciones de cisticercos en cerdos y establecer relaciones genéticas de consanguinidad con tenias en un área geográfica delimitada (14) y establecer relaciones entre ellos.

Por ello, en el presente estudio se propone, en primer lugar, investigar la variabilidad genética de la progenie de un parásito adulto, de manera que se pueda establecer si la progenie tiene el mismo genotipo o en qué medida este se ha diferenciado de manera espontánea de la tenia parental. Teniendo conocimiento de la variación espontánea de la progenie de una tenia adulta, en el segundo estudio de este trabajo, se analiza la variabilidad genética de cisticercos aislados de cerdos infectados naturalmente en la comunidad, y la compara con la variabilidad genética de tenias aisladas de habitantes de la misma comunidad. Esto nos permite comprender mejor la dinámica de la transmisión de la cisticercosis porcina en una comunidad endémica. Este primer ensayo brinda

información para el segundo ensayo, en el que se observa la variabilidad genética de la cisticercosis porcina y la teniasis humana en un ámbito natural, como es una comunidad rural endémica en el norte del Perú para establecer origen o posibles rutas de transmisión de *T. solium* en la comunidad. Con ello se espera establecer la utilidad de los microsatélites específicos TS_SSR09, TS_SSR27, TS_SSR28 y TS_SSR32, para la genotipificación de *T. solium* y para establecer el vínculo genético entre tenias recuperadas de humanos y de cisticercos aislados de cerdos en una comunidad.

III Marco teórico

Taenia solium, comúnmente conocido como solitaria, es un parásito platelminto, de la clase cestodo (Figura 1). En el Anexo 1 se muestran la taxonomía completa y su relación con otros parásitos de interés. *T. solium* produce la enfermedad denominada cisticercosis que afecta a los cerdos y a los seres humanos. La enfermedad se adquiere cuando las larvas de *T. solium* infectan los tejidos musculares o cualquier parte del cuerpo, incluyendo el cerebro, causando neurocisticercosis (NCC) (1, 26). La NCC es la principal causa de epilepsia en adultos en países endémicos, como el nuestro (27-29).

Reino:	<i>Animalia</i>
Filo:	<i>Platyhelminthes</i>
Clase:	<i>Cestoda</i>
Subclase:	<i>Eucestoda</i>
Orden:	<i>Ciclophyllidea</i>
Familia:	<i>Taeniidae</i>
Género:	<i>Taenia</i>
Especie:	<i>Taenia solium</i>

Figura 1. Clasificación Taxonómica de *Taenia solium*

III.1 Ciclo de vida de *Taenia solium*

El ciclo de vida de *T. solium* incluye la participación del hombre como hospedero final y el cerdo como hospedero intermediario (Figura 2). Aunque se ha encontrado animales silvestres infectados con cisticercosis, no se conoce otro hospedero intermediario ni otra fuente o reserva infecciosa en la naturaleza. El parásito adulto, denominado solitaria, parasita el intestino humano 1. En el

hombre no produce mayores molestias. Se desarrolla, llegando a medir hasta 8m (30). Se encuentra adherido al intestino mediante su doble corona de ganchos. De la cabeza o escólex se desarrolla el cuello, y luego los proglotis, primero los inmaduros, siguiendo los maduros y en el extremo terminal se encuentran los proglotis grávidos, éstos contienen huevos. El tiempo que toma en desarrollarse y eliminar huevos es de aproximadamente 10 semanas (31). Las porciones de proglotis grávidos se separan del cuerpo del parásito y junto con las heces, son expulsadas hacia el exterior ². En ausencia de facilidades sanitarias, los huevos y/o proglotis grávidos junto con las heces humanas son dispersadas en el medio ambiente. En estas condiciones en zonas donde se crían cerdos al pastoreo o patrulleros, éstos tendrán fácil acceso al parásito. Los cerdos son coprófagos, por tanto consumirán las heces humanas contaminadas con huevos/proglotis de *T. solium* ³. Los huevos ingeridos eclosionan en el intestino del cerdo, por acción de enzimas proteolíticas presentes en el intestino del cerdo, liberando oncósferas (3). Es probable que las oncósferas se adhieran al intestino a través de microvellosidades que emiten las oncósferas (32) para ingresar al torrente sanguíneo del cerdo y de ahí llegar hasta los tejidos como músculos, órganos incluyendo el cerebro. De esta manera, los cerdos desarrollan las cisticercosis (porcina). Para completar el ciclo, el hombre al ingerir carne de cerdo mal cocida o cruda ⁴, puede ingerir cisticercos viables, los cuales al llegar al intestino se adhieren al mismo, desarrollando la tenia o parásito adulto y completando así el ciclo de vida.

El hombre puede adquirir cisticercosis, puede accidentalmente por una contaminación oral-fecal, ingerir huevos de *T. solium* y análogamente a lo que

sucede en el cerdo, desarrollar cisticercosis (humana) **5**, este es un punto muerto en el ciclo de vida del parásito, pues el hombre no ingiere carne humana.

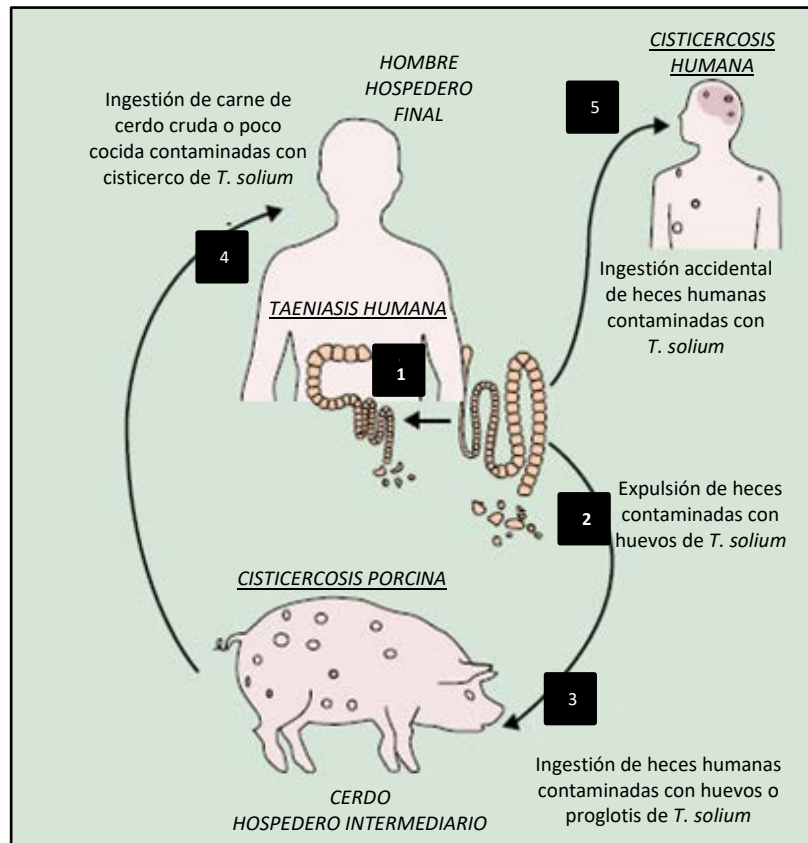


Figura adaptada de García y col. (2005) (33)

Figura 2. Ciclo de vida de *Taenia solium*

III.2 Estadios de *Taenia solium*

Estadio adulto: El estadio adulto de *T. solium* se desarrolla en el intestino humano, explicado anteriormente. Consta de tres partes, cabeza o escólex, cuello, cuerpo. El escólex del parásito es característico presenta una doble corona de ganchos y cuatro ventosas que le sirven para adherirse al intestino humano (Figura 3). La corona de ganchos lo diferencia de *T. saginata*, que no la presenta. El cuello es una porción delgada de unos 5 a 10 mm y es la porción con mayor

actividad biosintética, a partir de la cual se va generando los proglotis. El cuerpo o estróbilo de la tenia está compuesto de segmentos individuales denominados proglotis, que pueden llegar a 1000, y puede medir en total de 2 a 7 metros (34). Se pueden encontrar tres tipos de proglotis a medida que se aleja del cuello: inmaduros, maduros y proglotis grávidos. Éstos últimos se separan del estróbilo y son expulsados junto con las heces.

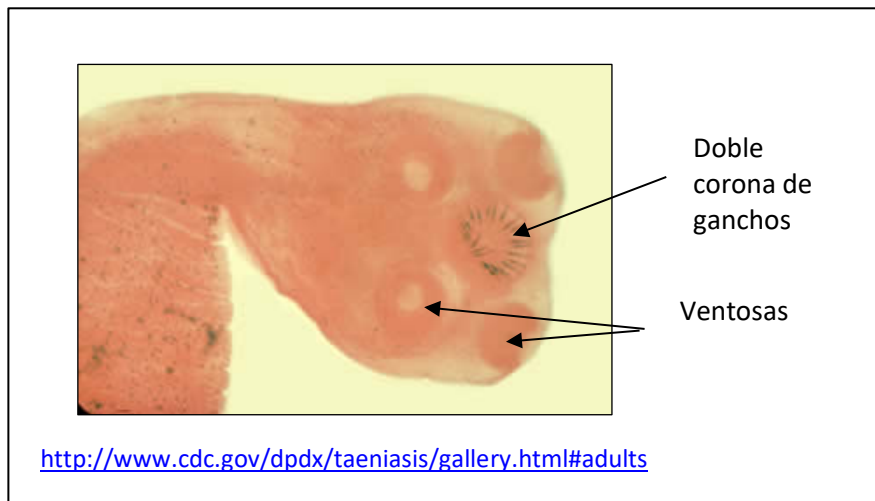


Figura 3. Escólex de *Taenia solium*

T. solium es un organismo hermafrodita, que se autofertiliza y cada proglotis contiene un aparato reproductor femenino y un masculino. El aparato genital en formación se encuentra en los proglotis inmaduros, sólo se pueden observar bien diferenciados en los proglotis maduros. El sistema reproductivo femenino está compuesto de una vagina, un receptáculo seminal, tres ovarios, un oviducto, glándulas vitelinas, glándulas de Mehlis y el útero. El sistema reproductor masculino consta de 375 a 500 testículos y un conducto espermático (Figura 4). Cada proglotis es capaz de producir aproximadamente $40-60 \times 10^3$ huevos (26, 35).

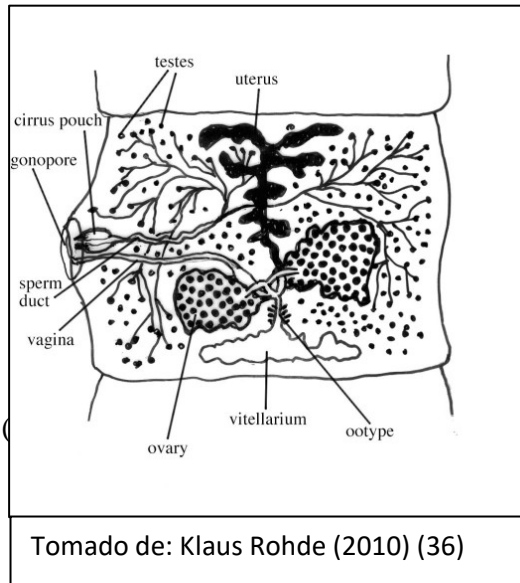


Figura 4 Proglótido maduro de *Taenia solium* mostrando las partes del sistema reproductivo

Estadio oncósfera - huevo (Figura 5). Los huevos se encuentran en el ovario de la tenia y normalmente son expelidos junto con las heces en los proglotis grávidos. Se sabe que los huevos no son móviles. Al interior de los huevos se encuentra la oncósfera, ésta se libera por acción de los jugos gástricos en el intestino del cerdo o el hombre (por contaminación accidental). Aunque todavía no se ha descrito el mecanismo por el cual las oncósferas se adhieren y atraviesan el intestino, se ha especulado que es a través de microvellosidades y por acción de enzimas proteolíticas (32).



Figura 5. Huevo de *Taenia* spp.

Estadio larval (cisticercos). El estadio larval se desarrolla habitualmente en el cerdo (hospedero intermediario), y accidentalmente en el hombre en un periodo aproximado de dos meses (26, 35, 37). Una vez que la oncósfera ha penetrado el intestino y llega al torrente sanguíneo del animal, esta se aloja en diferentes órganos, como los músculos estriados y lisos donde se desarrolla hasta cisticerco. También se ha encontrado en órganos como el corazón, hígado, ojos y cerebro. El cisticerco mide aproximadamente 5.6-8.5 x 3.1-6.5 mm (35). Es el agente infeccioso para el hombre. Si la carne de cerdo es consumida cruda o insuficientemente cocida, entonces la larva tendrá oportunidad de llegar al intestino humano y desarrollarse en tenia adulta.

III.3 Aspectos reproductivos y genéticos de organismos hermafroditas y *Taenia solium*

III.3.1 Definiciones y conceptos básicos

Organismo hermafrodita.- Es aquel que tiene órganos sexuales femeninos y masculinos a la vez. Muchos organismos en la naturaleza son hermafroditas especialmente los invertebrados, tales como los gusanos parásitos y de vida libre.

Gametos.- Son las denominadas células sexuales: el espermatozoide y el óvulo. Estas células son haploides, es decir contienen un juego de cromosomas, o la mitad del número normal de cromosomas. Los gametos se forman durante la meiosis. Durante la fertilización, los gametos masculinos y femeninos se unen produciendo un cigoto diploide (que contiene dos juegos de cromosomas).

Reproducción sexual.- Es el tipo de reproducción que involucra la fusión de núcleos haploides, usualmente gametos

División de células germinales primaria por meiosis.- A diferencia de las células somáticas, que se dividen por mitosis, la formación de los gametos o células sexuales haploides se realiza mediante el proceso denominado gametogénesis y la **división meiótica** es parte de este proceso. Los gametos se producen a partir de células germinales primordiales, que son diploides. Estas células especializadas se encuentran en el ovario y los testículos. Los procesos se denominan oogénesis y espermatogénesis para la generación de óvulos y espermatozoides, respectivamente (Figura 6). Las células germinales se dividen siguiendo el proceso de mitosis y a través de sucesivas generaciones dan lugar a los espermatogonios u oogonios, luego siguen su proceso hacia espermatocito u oocito primario (o de primer orden). Hasta este punto, todas las células son diploides. El espermatocito y el oocito se dividen por meiosis (meiosis I), dando lugar a los espermatocios y oocito secundario y siguiendo una división meiótica final (meiosis II) dan lugar a las espermétidas, que luego se diferencian en espermatozoides y en el caso de los oocitos, dan lugar al óvulo. En el caso de los espermatozoides, un espermatocito genera 4 espermatozoides; mientras que en el caso del oocito, la meiosis I genera un oocito secundario grande y un cuerpo polar. La meiosis II del óvulo da lugar a un óvulo maduro y dos cuerpos polares, que luego degeneran.

Como resultado de la meiosis, existe un reparto y reducción del material genético contenido en las células germinales originales (diploides). En la meiosis I, el

gametocito primario separa cada uno de sus pares de cromosomas homólogos. Es decir tanto el oocito secundario como el espermatocito secundario reciben uno de los pares de los cromosomas de manera diferente cada vez (hay segregación de los cromosomas), según la primera Ley de Mendel. Adicionalmente, en meiosis II, hay un reparto de las cromátides de cada cromosoma. Estos repartos se hacen al azar e independiente para cada cromosoma, siguiendo la segunda ley de Mendel. De esta manera cada gameto recibe diferente material genético, lo que genera polimorfismo genético (38).

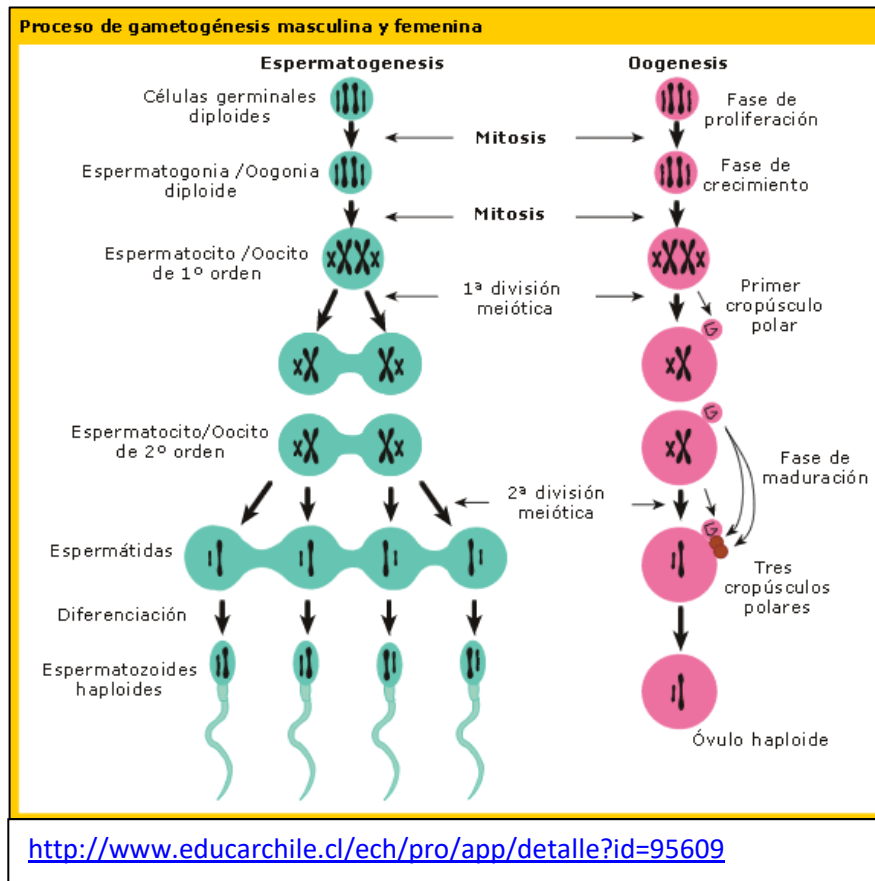


Figura 6. Proceso de gametogénesis: Formación de espermatozoides y óvulos.

III.3.2 Reproducción en parásitos hermafroditas

Como se ha indicado anteriormente, muchos gusanos tanto de vida libre como parásito son hermafroditas. Los mecanismos de reproducción, especialmente en los parásitos son importantes, pues éstos deben interactuar directamente con su hospedero y deben tener la capacidad de cambiar y adaptarse a ellos.

En organismos con reproducción sexual, las células sexuales (espermatozoide y óvulo), que son haploides, se producen mediante el proceso de gametogénesis a partir de células germinales (diploides), mediante meiosis, lo que genera variabilidad genética. Además, la segregación independiente de los cromosomas es una fuente inicial de variabilidad genética, que se sumaría al de la recombinación de los cromosomas durante fecundación.

Caenorhabditis elegans es un organismo distante de *T. solium*, y sería poco apropiado extender los mecanismos fisiológicos a los céstodos, específicamente a *T. solium*. Sin embargo, este es uno de los organismos hermafrodita mejor estudiados y se ha descrito que existe meiosis tanto en la oogénesis como espermatogénesis y se ha sugerido que la segregación que sigue a la reproducción es de tipo Mendeliana (39). Es importante notar que *C. elegans* es un organismo de vida libre y que en la naturaleza, dos o más individuos pueden participar en la fertilización cruzada.

A la fecha no se ha estudiado en detalle la reproducción en *T. solium*. Sin embargo, en el caso de los céstodos, uno de los organismos mejor estudiado es el *Schistocephalus solidus*, de la familia *Diphyllobothriidae* (en el Anexo 1 se muestra la relación taxonómica con *T. solium*). *S. solidus* parasita peces y aves

marinas que comen peces, siendo éstas hospederos definitivos. Su ciclo de vida incluye dos hospederos intermedios, pero la reproducción se realiza en el hospedero final, igual que *T. solium* (40).

Schistocephalus solidus tiene otras similitudes con *T. solium*, por lo que es pertinente la descripción en este trabajo de investigación. En algunas ocasiones cuando hay baja densidad poblacional, se encuentra solo un parásito en el hospedero final, por lo que se sabe que se produce no sólo mecanismos de fertilización cruzada, sino de autofertilización (40, 41). Incluso cuando existe múltiple infección en el hospedero existe una proporción de auto-fertilización que permite mantener el pool genético de esta característica en caso no haya pareja para apersearse (41, 42).

III.3.3 Espermatogénesis en *Taenia solium*

Taenia solium es un organismo hermafrodita en cuyas unidades funcionales (proglotis) se encuentran al mismo tiempo el sistema reproductor femenino y el sistema reproductor masculino. Sin embargo, existen pocos estudios acerca de la reproducción de *T. solium*. En la literatura se ha descrito principalmente los aspectos relacionados a la espermatogénesis y desarrollo de testículos en algunos parásitos cultivados artificialmente (43, 44).

El desarrollo de los testículos comienza en los proglotis distales de aproximadamente 20-25 días de edad (44). A los 40-60 días ya se pueden observar espermatogonios (2n). En los proglotis maduros, se pueden observar espermatoцитos primarios (2n) y secundarios (n).

El estudio realizado por Willms (2003) en *T. solium*, fue realizado en ejemplares cultivados artificialmente en hamsters. Se ha descrito meiosis I (de espermocitos primarios (2n) a espermocitos secundarios (n)) en proglotis inmaduros de 40 días. Así mismo ha descrito espermátidas en diferentes grados de desarrollo (43). Esto indicaría, aunque no se ha observado, la meiosis II debe ocurrir ya que se han encontrado los espermátidas (n).

III.3.4 Reproducción de *Taenia solium*

T. solium es un parásito monoico que se auto-fertiliza, aunque también es posible que exista fertilización cruzada entre más de un individuo (22, 35, 45, 46). Normalmente se reporta infección simple en el intestino humano (de ahí el nombre *solitaria*), sin embargo, también se ha reportado infección múltiple hasta en un 20% de personas diagnosticadas con *teniasis* (47). Así mismo, es posible una fertilización cruzada entre diferentes proglotis de un mismo individuo, aunque todavía no se haya reportado para *T. solium* u otro cestodo (48). La fertilización ocurriría de la siguiente manera: cada uno de los 500 testículos es capaz de generar esperma (35), el cual pasa a través del conducto espermático hacia la vagina a través del poro genital. Por otro lado el huevo no fertilizado aún, producido por el ovario viaja desde éste hacia el oviducto (45). El esperma viaja por la vagina hacia el oviducto donde se produce la fertilización. Luego de la fertilización, las glándulas vitelina y Mehlis secretan sustancias que cubren el cigoto. El cigoto queda en el útero donde se desarrolla hasta que el proglotis grávido se desprende del estróbilo (35).

III.4 Aspectos epidemiológicos de *Taenia solium*

Teniasis.- *T. solium* es endémico en nuestro país, principalmente en las zonas andinas rurales, donde se crían cerdos al pastoreo y donde no existen facilidades sanitarias adecuadas y la disposición de excretas es al aire libre. Se ha reportado diversos niveles de prevalencia, llegando hasta 7% (49, 50), lo cual categoriza las zonas como hiperendémicas. Es importante mencionar que muchas de las estimaciones se realizó utilizando el método microscópico, donde se examina las heces para verificar la presencia de proglotis y/o huevos de *T. solium*. Se sabe que este método tiene sensibilidad limitada, y que utilizando otro método como el denominado coproantígeno (51), se ha evidenciado que la prevalencia puede ser realmente hasta 2.6 veces reportada por el método microscópico, por lo que es muy probable que dichas prevalencias se hayan subestimado (52).

Cisticercosis humana.- Es muy difícil contar con cifras reales sobre la prevalencia/incidencia de cisticercosis humana, debido a que el diagnóstico es complicado. El diagnóstico más certero sería encontrar evidencia del parásito en el cuerpo, sin embargo esto supone el uso de tecnologías de imágenes de alto costo e improbables de ser usadas en las zonas endémicas, normalmente rurales. Se cuenta por ello con pruebas inmunológicas. Estudios realizados en diferentes zonas endémicas del país, que incluyeron costa, sierra y selva, reportaron seroprevalencias de 8%, 13% y 16%, respectivamente (53).

Cisticercosis porcina.- Por otro lado, la seroprevalencia en cerdos puede alcanzar el 60%. Siendo el cerdo un animal que es coprófago, esta prevalencia indicaría altos niveles de contaminación en dichas comunidades.

La teniasis/cisticercosis es considerada una de las enfermedades que se puede erradicar de la faz del planeta (2). Esto es, principalmente, por las características de su ciclo de vida, en el que se sabe que solo existe una fuente de infección para el hombre, y es el cerdo infectado. Además la *T. solium* ha sido eliminada de los países desarrollados hace varias décadas por medio de medidas sanitarias principalmente. *T. solium* es endémica actualmente en países en vías de desarrollo donde se crían cerdos al pastoreo y donde se encuentran deficiencias sanitarias, en estos lugares, el principal obstáculo es demostrar que se puede eliminar el parásito a nivel nacional. En este sentido el CWGP a través de intervenciones dirigidas al tratamiento de la teniasis humana así como la cisticercosis porcina ha demostrado la factibilidad de la eliminación del parásito en un área de 100,000 habitantes en Tumbes (12). Sin embargo, resultados de estudios de campo posteriores (13) sugirieron que el mantenimiento de eliminación en esta región y la exportación de la estrategia a otros lugares endémicos requieren una comprensión completa de la dinámica de transmisión y los mecanismos de dispersión de huevos con el fin de optimizar la eficiencia de las intervenciones.

Actualmente no se conoce totalmente la dinámica de transmisión del parásito en las comunidades afectadas. Se sabe que existe mayor probabilidad de encontrar cerdos infectados a 50 m de distancia alrededor de la casa de un teniásico, sin embargo existen cerdos infectados a lo largo de toda la comunidad (54), y es difícil explicar el **movimiento** del parásito. Se sabe que los proglotis de *T. solium*, a diferencia de *T. saginata* no son móviles, por lo tanto esta no es una medida de dispersión.

Por la característica de *T. solium* de ser hermafrodita y que se autofertiliza, se ha reconocido la necesidad de identificar “clonas” de *T. solium* a través de una herramienta que pueda vincular las tenias con los cerdos infectados (14), y esto podría ser a través de un marcador molecular que conecte el genotipo de una tenia determinada con el genotipo de los cisticercos de los cerdos.

III.5 Diversidad genética de *Taenia solium*

Siendo *T. solium* un organismo hermafrodita que se autofertiliza, se espera que su diversidad genética sea baja (55).

El uso de dos marcadores mitocondriales, como la subunidad 1 del citocromo C oxidasa (COI) y el citocromo b, reveló la existencia de dos genotipos de *T. solium* distribuidos en el mundo. El genotipo asiático y el genotipo americano/africano (19). Lamentablemente, estos marcadores no han sido útiles para identificar genotipos locales o circunscriptos a un área geográfica más reducida. Por ejemplo, al estudiar 15 muestras del parásito adulto de *T. solium* obtenidas en distintas áreas de Perú utilizando COI se encontró que todas las muestras tenían secuencias de COI idénticas (18). Posteriormente, y con el avance de la biotecnología y el estudio del ADN, diversas herramientas adicionales se han desarrollado, tales como RAPD (del inglés: *Random amplified polymorphic DNA*) que han permitido describir la variabilidad genética de *T. solium* en diversas comunidades en México y diferenciarlas de muestras obtenidas en Madagascar (22, 56). Así mismo, ha reportado diversidad genética en cisticercos obtenidos a partir de infecciones artificiales de cerdos (21). En dichos estudios se ha observado la naturaleza clonal

de la reproducción de *T. solium*, pero también se ha sugerido que existiría recombinación. Sin embargo, por la naturaleza de la técnica, se sabe que estos marcadores no permitirían el discernimiento de individuos verdaderamente heterocigotos, pero más importante sería difícil establecer una relación de consanguinidad, además de ser poco reproducibles.

Recientemente se han identificado siete loci de microsatélites polimórficos en el genoma de *T. solium* (25). Estos marcadores han evidenciado diversidad genética de *T. solium* en Perú, concordante con resultados encontrados en México. Además, estos marcadores han sido utilizados para el estudio de genética poblacional, encontrándose una correlación positiva entre los marcadores y la ubicación geográfica de los parásitos de *T. solium* en poblaciones peruanas. De esta manera se ha diferenciado genotipos del norte y del sur de Perú.

III.6 Marcadores Microsatélites

Los microsatélites o (repeticiones de secuencia simples: SSR, del inglés simple sequence repeats) son secuencias de 1 a 6 nucleótidos que se repiten de dos hasta 60 veces (57, 58). Estas repeticiones conocidas como tándems pueden variar de un individuo a otro, es decir son altamente polimórficas. Uno de los mecanismos propuestos más importantes para explicar la variación en el número de repeticiones es el “resbalón” (o *slippage*) (59, 60) de la polimerasa durante la replicación del ADN, que hace que se aumenten o disminuyan los tándems. Estas secuencias se encuentran distribuidas a lo largo de los genomas en regiones codantes y sobre todo en regiones no codantes (25, 61) y son consideradas neutras

y co-dominantes. Estas características hace a los microsatélites especialmente útiles para el estudio de estructuras poblaciones, ya que a diferencia de otros genes, no están bajo presión de selección. Los microsatélites tienen una tasa de mutación más alta que otros genes de hasta 10^{-3} (62), por lo que es posible encontrar mayor variabilidad genética que la encontrada con genes mitocondriales o nucleares. Los microsatélites han sido utilizados para la genotipificación de diversos organismos, tales como *Echinococcus granulosus*, *Echinococcus multilocularis*, *Plasmodium vivax*, *Leishmania braziliensis*, *Schistosoma*, *Trypanosoma cruzi*, entre otros (15, 17, 63-66).

Los microsatélites se han usado para el estudio de la dinámica de transmisión de *P. vivax* y *P. falciparum* en África, Asia y América. En Etiopia, por ejemplo permitió establecer relaciones genéticas entre distintas áreas del país (67). En un estudio basado en poblaciones en Uganda, se ha encontrado que hay transmisión local sostenida de cepas resistentes a los antimaláricos sulfadoxina-pirimetamina, y poca evidencia de ingreso de cepas de Ruanda (68). Otro estudio que refuerza la utilidad del uso de microsatélites en estudios poblacionales y que permite identificar subpoblaciones con características, por ejemplo de resistencia a artemisina, la brinda Imwong en la región asiática de Mekong. Sus resultados indican la probable ruta de diseminación de las poblaciones resistentes a artemicina (69). El uso de microsatélite también permitió la caracterización molecular y sugerir la fuente de infección en el área de Punta Cana para seis pacientes que habían viajado a esa zona (70). Así mismo, ha sido útil en la identificación de sub poblaciones de parásitos de *P. falciparum* que además están relacionados a la presentación asintomática de *P. falciparum* (71). En el caso de

P. falciparum, los microsatélites inclusive facilitaron el monitoreo de la infección durante el embarazo, en una cohorte en Malawi, para estudiar la ocurrencia de malaria placentaria y establecer la infección que la provocaba (72)

La utilidad de los microsatélites también ha sido evaluada para la diferenciación genética de *S. japonicum*. Moendeg estudió la diversidad genética de *S. japonicum* en diferentes áreas de Filipinas utilizando microsatélites, encontrando gran variabilidad genética en áreas más endémicas (73).

La utilidad de microsatélites en el estudio de la diversidad genética y transmisión para *E. multilocularis* ha sido mostrada en diversos estudios. El microsatélites EmsB, que consta de repeticiones de repeticiones ha permitido evaluar y establecer relaciones genéticas de individuos de distintas áreas, principalmente de Europa (15, 16, 74-78). Ha permitido identificar nuevas zonas de expansión del parásito en Europa del Este, específicamente en Polonia (79)

IV Justificación

Estudios previos han demostrado que las intervenciones comunitarias con quimioterapia masiva tanto en la población de cerdos como en humanos teniásicos, complementada con vacunación de los cerdos de la comunidad, han reducido la parasitemia pero esta reducción no se ha logrado sostener en el tiempo. Esto indica que los parásitos ingresan por rutas externas de otras comunidades, comprometiendo así los esfuerzos por controlar esta enfermedad. Por lo tanto es importante conocer bien las rutas de transmisión intra e inter-comunitarias para diseñar mejores intervenciones o estrategias de control. El control y posible eliminación de *T. solium* requiere una serie de acciones científicas y técnicas complementarias. Un aspecto importante es conocer en detalle cómo es la dinámica de transmisión de la cisticercosis porcina y teniasis humana en las comunidades endémicas y para ello sería útil contar con una herramienta suficientemente sensible o de alta resolución, tal como los marcadores genéticos moleculares. El desarrollo de las técnicas de biología molecular, permite hoy en día diferenciar individuos dentro de una población e inclusive el foco de transmisión de un brote epidémico utilizando la información genética. En el caso de *T. solium*, gracias al secuenciamiento del genoma de dos aislados peruanos, se ha identificado marcadores microsatélites para evaluarlos en cuanto a su utilidad para la identificación genética y diferenciación del parásito dentro de una comunidad. Algunos estudios previos han demostrado que los microsatélites pueden proporcionar un nivel de precisión alto para diferenciar individuos a diferentes escalas, tal como es el caso de *E. multilocularis* y *S. solidus* (42, 80, 81).

De verificarse la utilidad de los marcadores microsatélites, esto tendría inmediata utilidad en las estrategias para el control de *T. solium* que viene desarrollando el CWGP en el norte del Perú. Esta utilidad no solo se limitaría a comunidades específicas, sino que potencialmente podría extenderse a todo el territorio peruano, obteniendo un mapa detallado de los genotipos de *T. solium* en el Perú y las rutas de transmisión entre regiones, pueblos y hasta comunidades. Así mismo esta técnica sería de utilidad en otras regiones endémicas del mundo.

V Objetivo general

Evaluar la utilidad de los marcadores microsatélites para la identificación genética de *T. solium* y proporcionar una herramienta para la evaluación exploratoria de las relaciones genéticas y de la transmisión de la teniasis y cisticercosis en una comunidad.

V.1 Objetivos específicos

1. Estudiar la variabilidad genética en los cisticercos obtenidos de cerdos infectados experimentalmente con proglótidos de *T. solium*, para establecer evidencia empírica acerca de la identidad genética de la progenie respecto al genotipo de la Taenia parental. Así mismo esta información nos permitirá conocer el nivel de variación genética espontánea en los marcadores de microsatélites, lo cual es importante para conocer el punto de corte que indica si dos genotipos provienen de un mismo genotipo parental o si provienen de tenias diferentes.
2. Evaluar la identidad genética de cisticercos obtenidos de cerdos infectados naturalmente y de tenias en una comunidad rural de Piura, Perú para establecer las asociaciones genéticas entre ellos y explorar las posibles rutas de transmisión entre ellos

V.2 Objetivo secundario

Evaluar la concordancia de resultados de polimorfismo de los marcadores microsatélites obtenidos mediante el sistema de electroforesis capilar QiAxel y el polimorfismo obtenido por secuenciamiento de dichos marcadores.

VI Metodología de la investigación

VI.1 Diseño del estudio

Para cumplir el objetivo general de este estudio, se diseñó una primera parte experimental, donde se evaluó la identidad y variabilidad genética de cisticercos provenientes de un individuo de *T. solium*, para ello se infectó artificialmente seis cerdos con proglotis de uno de dos individuos genéticamente diferentes de *T. solium*. Este experimento fue importante para informar el segundo estudio, de campo, en el que se evaluó la identidad genética de cisticercos provenientes de cerdos infectados naturalmente identificados en una comunidad rural de Piura, se comparó con los genotipos de las tenias (parásitos adultos) de *T. solium* identificados en la misma localidad y se estableció su relación filogenética y su correlación con la distribución geográfica de los parásitos.

VI.2 Muestras

Para el primer estudio, de la variabilidad genética de cisticercos obtenidos de cerdos infectados artificialmente, los individuos adultos de *T. solium* fueron donados por el Grupo de Trabajo de Cisticercosis en el Perú (CWGP). Los individuos fueron identificados como “Tenia A”, proveniente de una persona de Apurímac y “Tenia B”, proveniente de una persona de Cajamarca. Las partes más próximas al escólex fueron utilizadas para genotipificar a la tenia.

Para el segundo estudio, de campo se realizó un muestreo de cerdos con cisticercosis porcina, identificados por la presencia de nódulos compatibles con

cisticercosis en la lengua de los animales. Las tenias adultas se obtuvieron de un estudio previo en la misma comunidad de Pampa Elera en Piura (50).

VI.3 Procedimientos y técnicas

VI.3.1 Variabilidad Genética de cisticercos recuperados de cerdos infectados experimentalmente

Ensayo de viabilidad. Para proceder a la infección artificial de cerdos, es importante saber si las oncósferas contenidas en los proglotis grávidas eran viables. Esto se realizó de acuerdo a lo descrito por Verástegui y col. (82). Las oncósferas se liberaron utilizando hipoclorito al 0.75% por 10 minutos para debilitar la capa de los huevos. Posteriormente se lavaron por 3 veces con medio RPMI 1640, se adiciona azul de tripán 0.4%. Se observa al microscopio y las oncósferas que excluyen el colorante son consideradas viables.

VI. 3.1.1. Prueba de Western Blot o EITB (Del inglés: Enzyme – linked Immunoelctrotransfer Blot)

Se realizó de acuerdo a lo descrito por Tsang (83). Las glicoproteínas fueron proporcionadas por la División of Enfermedades Parasíticas - CDC, Atlanta GA, USA. Los antígenos fueron separados por electroforesis.

Luego fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa. Las muestras de suero fueron eluidas 1:10 con PBS- solución de tween al 0.3% (conteniendo 5% de leche descremada en polvo). Las tiras de nitrocelulosa fueron incubadas a 4 °C y luego lavadas con la solución de PBS-Tween a 56 °C. Al final de la última

lavada, se adicionó IgG anti-cerdo de cabra marcada con peroxidasa de rábano (horseradish peroxidase) diluido 1:6000 en PBS-Tween 0.3%.

Se incubó por dos horas a temperatura ambiente, y luego se adicionó una solución de DAB (3,3'-diaminobenzidina) en PBS con 30% peróxido de hidrógeno. Al cabo de 10 minutos los anticuerpos unidos se visualizaron. Este ensayo fue realizado en la Unidad de Investigación en Neurocisticercosis en el Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas.

VI. 3.1.2. Infección artificial de cerdos. Se adquirieron 6 lechones hembra de un mes de edad de una granja de la ciudad de Lima, libre de cisticercosis. Se transportaron a la facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM para proceder a la infección. Los cerdos fueron vacunados contra cólera porcino y se realizó un control para determinar si eran negativos a *T. solium*, mediante la prueba de Western blot.

Los lechones fueron infectados según el siguiente esquema:

- a. 3 lechones con proglotis de *T. solium* de genotipo A (Tenia TA)
- b. 3 lechones con proglotis de *T. solium* de genotipo B (Tenia TB)

Cada cerdo fue infectado vía oral, con 1 proglotis incrustado en un trozo de plátano (84) (Figura 7).

Mantenimiento de los cerdos

Los cerdos se mantuvieron en corrales apropiados a su tamaño con luz natural, agua y alimentos *ad libitum*.



Figura 7. Infección de cerdos con proglótididos de *T. solium*, utilizando un trozo de plátano

Sangrados:

Los sangrados se realizaron de la siguiente manera:

- Todos los sangrados se realizaron con tubos vacutainer con gel separador de suero, aproximadamente 6 mL de sangre por cada animal.
- Un sangrado control al momento de la llegada de los animales a las instalaciones de la FMV (sangrado control).
- Un Segundo sangrado control el día cero antes de la infección.
- Sangrado a los 15 días después de la infección

Al cabo de 7 semanas, los cerdos fueron sacrificados de manera humanitaria siguiendo los códigos de ética y se inspeccionaron los músculos para recuperar los cisticercos.

VI. 3.1.3. Sacrificio de animales

1. Cada animal fue pesado y de acuerdo al peso se calculó la cantidad de tranquilizante y anestésico necesario para evitar dolor u otro sufrimiento al

animal (20 mg/kg de ketamina, que es el anestésico y 2 mg/kg de xylacina, que es el tranquilizante). Esto se realizó para sedar a los animales y de esa manera poder luego aplicar el siguiente fármaco para producir eutanasia.

2. Luego se administró el pentobarbital sódico en una dosis de al menos 150 mg/kg, siguiendo la técnica de aplicación a nivel de la vena cava para producirle un paro cardiaco, y por ende la eutanasia.
3. Una vez sacrificado el animal, se cortó la piel y tejidos exponiendo las venas yugulares, para drenar la sangre.
4. Durante el sacrificio se cambió de cuchillo cada vez que se trabajó con un animal diferente para evitar la contaminación de la sangre.
5. Se cortó la cabeza para extraer el cerebro.
6. El cerdo fue colgado para proceder a hacer una incisión longitudinal en la línea ventral desde la zona abdominal a la torácica, procediendo a realizar la evisceración de la cavidad abdominal y torácica. Se extrajo el corazón cortando las venas y arterias al final de las aurículas.
7. El animal fue descuartizado dividiéndolo en las siguientes partes: Brazo izquierdo, brazo derecho, pierna izquierda, pierna derecha, costillar izquierdo, costillar derecho, cuello/columna y sacro. Estas piezas al igual que el corazón, cerebro, lengua y músculos de la cabeza se colocaron en bandejas plásticas previamente rotuladas con el número de arete del animal con la indicación de miembro/órgano y lado, para luego pasar al conteo de cisticercos.

VI.3.1.4. Identificación de cisticercos

Definiciones

Quiste sano: Son vesículas translúcidas llenas de fluido transparente de 0,5 - 1,5 cm de diámetro, redondeadas u ovals, que contiene un escólex invaginado que puede ser visto como un gránulo sólido pequeño. El cisticerco está rodeado de una fina capa de tejido fibroso que lo separa del tejido circundante.

Quiste degenerado: Vesícula conteniendo líquido denso de color blanquecino o amarillento. Tienen apariencia de “arroz cocido”

Quiste cicatrizal: Estructura alargada y delgada de 1-2 mm de diámetro (de color blanquecino)

Quiste calcificado: Estructura de color blanquecino, dura y que crepita al corte

El examen de los músculos se realizó cortando con bisturí y cogiendo con una pinza roma la musculatura de cada pieza, tratando que este corte sea lo más fino posible; todo esto con el fin de realizar la búsqueda y contabilización de los quistes sanos, degenerados y/o cicatrizales (Figura 8).

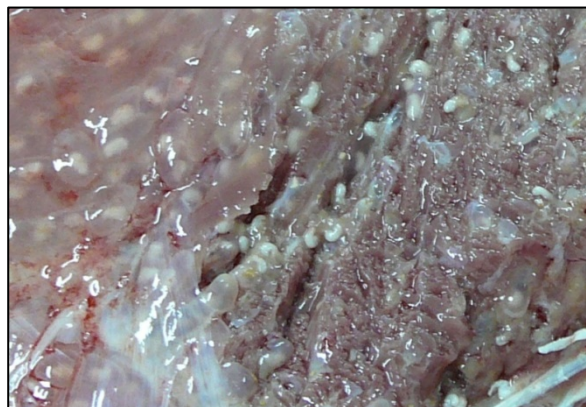


Figura 8. Identificación y extracción de cisticercos encontrados en la carcasa de los cerdos

Se registró la cantidad de quistes encontrados, correspondientes a quiste sano, degenerado o cicatrizal.

Se colectaron aproximadamente 30 quistes sanos intactos y saludables de distintos órganos o partes del animal

VI.3.1.5. Colección y preservación de quistes de *Taenia solium* para extracción de ADN

1. Se agregó 20 mL aproximadamente de solución salina estéril a una placa petri limpia, donde se colectaron los quistes sanos y libres de tejido
2. Se eliminó la solución salina y verter etanol a la placa. Cuando los quistes estén en etanol, se punzarán, eliminando nuevamente el etanol
3. Después de eliminar el etanol, se trasladó cada quiste a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL conteniendo no más de 1 mL, ni menos de 0.8 mL de etanol absoluto.
4. Las muestras se conservaron a -20 °C hasta su procesamiento

VI.3.1.6. Extracción de ADN a partir de parásito adulto de *Taenia solium* y de cisticercos con kit INVITROGEN. Para la extracción del ADN del parásito adulto de *T. solium*, se utilizó la parte más extrema cercana al escólex (proglotis inmaduros). El ADN genómico total se purificó de acuerdo a las instrucciones del kit. El ADN se resuspendió en un volumen de 100 µL de buffer Tris-EDTA, se verificó su calidad y cuantificó por espectrofotometría de UV (Nanodrop) y se guardó a -20°C.

VI.3.1.7. Amplificación por PCR de microsatélites para genotipificación. La mezcla de reacción para el PCR fue de 25 μ L y consistió de 20 ng de ADN, 1 μ mol de cada iniciador (Tabla 1), dNTPs 0.2 mM, buffer Invitrogen 1X (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 2 mM MgCl₂ (Qiagen) y 0.3 U de Taq polimerase® (Invitrogen). Las reacciones se realizaron en el termociclador MJ Research con cubierta caliente. Las condiciones de cada ciclo del PCR fueron: denaturación de 95 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos (45 segundos a 95 °C, 45 segundos a 62 °C y 2 minutos a 72 °C), y un paso final de extensión por 5 minutos a 72 °C (25).

Tabla 1. Lista de iniciadores de los microsatélites

Microsatélite	Secuencia de Iniciador hacia adelante (5'-3')	Secuencia del iniciador reverso (5'-3')
TS_SSR_09	TGGCATTCTGACTGGATGACC	AGAGAAGCAACAGAATACTGC
TS_SSR_27	AGGTAGACCACCTCCGTCTC	GGAAATTCGCATGGCTGTGG
TS_SSR_28	TCTACCCCGTCAGTTGAGGT	GGTGTGAATTAACCAGCTAG
TS_SSR_32	GGATGTGACGGGGTTTGACA	CATTAGGGGTTTCAGTCGGGG

VI.3.1.8. Electroforesis capilar de alta resolución. Los productos de amplificación se revelaron inicialmente en el equipo QIAxcel que utiliza un sistema de electroforesis capilar (EC) múltiple diseñado para superar los sesgos de las electroforesis en geles. Los datos obtenidos se analizaron con el software acoplado al sistema. Se determinó el tamaño de banda de cada marcador por cada uno de los individuos adultos y en estadio cisticercos de *T. solium*. Se utilizó un marcador de tamaño de 25 bp – 500 bp (Invitrogen) y el método OM700, que es el

método apropiado para el tamaño de los productos de amplificación (85) y que tiene mejor resolución (3-5pb).

VI.3.1.9. Secuenciamiento de los marcadores moleculares

El secuenciamiento se realizó mediante el método de Sanger y con el fin de obtener las secuencias completas de los marcadores, se diseñaron nuevos cebadores externos a los que se utilizan para la genotipificación. Los productos de amplificación de PCR se enviaron a secuenciar a la empresa Macrogen.

Amplificación por PCR de microsatélites para secuenciamiento. La mezcla de reacción para el PCR fue de 25 μ L y consistió de 20 ng de ADN, 1 μ mol de cada iniciador (hacia adelante y reverso), dNTPs 0,2 mM, buffer Invitrogen 1X (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 2 mM $MgCl_2$ (Qiagen) y 0.3 U de Taq polimerase® (Invitrogen). Las reacciones se realizaron en el termociclador MJ Research con cubierta caliente. Las condiciones de cada ciclo del PCR fueron: denaturación de 95 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos (45 segundos a 95 °C, 45 segundos a 62 °C y 2 minutos a 72 °C), y un paso final de 5 minutos a 72 °C. Los cebadores se muestran en la Tabla 2.

Debido a la poca cantidad de ADN extraído de los cisticercos obtenidos experimentalmente, y porque el marcador TS_SSR32 fue considerado monomórfico (Sección VII.3, Tabla 9), se priorizó el secuenciamiento de los marcadores TS_SSR09, TS_SSR27 y TS_SSR28.

Tabla 2. Lista de iniciadores externos para el secuenciamiento de microsatélites

Microsatélite	Secuencia de Iniciador hacia adelante (5'-3')	Secuencia del iniciador reverso (5'-3')
TS_SSR_09	TGGCATTTCGACTGGATGACC	AGAGAAGCAACAGAATACTGC
TS_SSR_27	AGGTAGACCACCTCCGTCTC	GGAAATTCGCATGGCTGTGG
TS_SSR_28	TCTACCCCGTCAGTTGAGGT	GGTGTGAATTAACCAGCTAG
TS_SSR_32	GGATGTGACGGGGTTTGACA	CATTAGGGGTTTCAGTCGGGG

VI.3.2 Caracterización molecular de cisticercos recuperados de cerdos infectados naturalmente

En un estudio previo se identificó la comunidad endémica de Pampa Elera en Piura. Esta es una comunidad de aproximadamente 600 habitantes y se identificaron cuatro personas infectadas, que luego mediante un tratamiento parasitológico se recuperaron las 4 tenias (50). Estas se genotipificaron, encontrándose genotipos diferentes. En el presente estudio, se realizó un censo y mapeo la población, para luego identificar cerdos infectados con cisticercosis. Estos fueron sacrificados, y se recuperaron los cisticercos, se genotipificaron y compararon con el genotipo encontrado en las tenias.

VI.3.2.1. Censo y mapeo de la población. Se realizó un censo de la población y mapeo de las casas con ubicación geográfica (coordenadas de latitud y longitud) de cada casa. Estos datos fueron registrados usando el sistema de posicionamiento global (GPS) (GeoExplorer CE XT; Trimble, Westminster, CO). En el censo se obtuvo información de cada persona que residía en la casa, tales como la edad,

sexo, la procedencia y las características de la casa, como el material de la casa, la presencia de letrinas, la eliminación de heces, fuente de agua, y el tratamiento de agua para el consumo. Las ubicaciones GPS de las casas de los propietarios de los cerdos se utilizaron para el análisis de la asociación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas.

VI.3.2.2. Identificación de cerdos infectados con cisticercosis

Examen de lengua: Es la búsqueda de los nódulos y/o identificación visual de los cisticercos

Cada animal fue inmovilizado por dos o tres personas y utilizando una tela se procedió a jalar la lengua para revisarla con las manos desde la base de ésta hasta la punta. La lengua fue examinada minuciosamente, palpándola con el propósito de buscar nódulos que indiquen la presencia de cisticercos (86).

Se consideró como criterios de diagnóstico:

- a. Positivo: La observación de los quistes en la superficie de la lengua o el hallazgo a la palpación de nódulos en la lengua y su base (Figura 9)
- b. Sospechoso: observación de cicatrices o marcas que sugieran que se les extrajo los quistes
- c. Negativo: La ausencia de quistes, protuberancias o cicatrices en la lengua

Cada animal fue identificado mediante el uso de un arete con un número. Este se registró junto con los datos del dueño



Fotografía tomada por Lauralee Woods

Figura 9. Examen de lengua en un cerdo

VI.3.2.3. Compra de animales

Una vez identificado un cerdo positivo, se negoció el precio del animal con el dueño. El pago se hizo de acuerdo al peso del animal y de acuerdo al precio de venta al mercado.

VI.3.2.4. Sacrificio de cerdos. Se realizó tal como se explicó en la sección VI.3.1.3.

VI.3.2.5. Obtención de cisticercos. Se realizó tal como se explicó en la sección VI.3.1.4. y VI.3.1.5.

VI.3.2.6. Extracción de ADN. Se realizó tal como se explicó en la sección VI.3.1.6.

VI.3.2.7. Amplificación por PCR para genotipificación (estudio de la variabilidad genética). Se realizó tal como se explicó en la sección VI.3.1.7.

VI.3.2.8. Electroforesis capilar de resolución. Se realizó tal como se explicó en la sección VI.3.1.8.

VI.3.2.9. Secuenciamiento de los marcadores moleculares. Se realizó tal como se explicó en la sección VI.3.1.9.

VI.4 Plan de análisis

VI.4.1. Evaluación de la concordancia entre el nivel de polimorfismo obtenido mediante EC (QIAxcel) y el secuenciamiento

Para evidenciar la concordancia de los resultados de polimorfismo del tamaño (en pb) de los marcadores microsatélites obtenidos mediante la EC y el secuenciamiento de los productos de amplificación se determinó la frecuencia de los tamaños de cada marcador obtenido mediante EC y se comparó con los obtenidos por secuenciamiento. Se comparó el número de alelos, los tamaños y sus frecuencias.

VI.4.2. Análisis de variabilidad genética

Los tamaños de los marcadores microsatélites (en pares de bases) de cada muestra fueron registrados en un archivo de Microsoft Excel© (2010).

VI.4.2.1. Heterocigosidad esperada

La heterocigosidad mide la proporción de individuos heterocigotos para un determinado marcador o conjunto de marcadores. La heterocigosidad es un estimado de la variabilidad genética pues está relacionada con la consanguinidad entre individuos en una población.

La **heterocigosidad esperada** se define como la probabilidad de que dos individuos dentro de una población, escogidos al azar sean diferentes en condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg (87).

La heterocigosidad esperada se estimó utilizando la fórmula

$$H_e = [n/(n - 1)][1 - \sum_{i=1}^N \text{alelos } p_i^2]$$

Donde H_e es la heterocigosidad esperada, n el número de aislados analizados y p la frecuencia alélica para cada marcador.

VI.4.2.2. Evaluación de las distancias genéticas en los individuos evaluados de *Taenia solium*

La distancia genética describe el grado de diferencia genética entre dos poblaciones. Las distancias genéticas estándar (D_S) de Nei (88) y la Distancia D_A de Nei (89) son las más usadas.

La D_S determina el número de mutaciones que se han acumulado, a nivel de nucleótidos, en las secuencias de dos poblaciones a partir del momento de su divergencia original. Es decir es una medida directa de las diferencias genéticas entre dos poblaciones. La D_A es un parámetro que permite realizar estimaciones no sesgadas en poblaciones pequeñas (88).

Para indicar la diferenciación genética entre tenias y cisticercos, se calcularon distancias genéticas (D_A) de Nei, según la siguiente fórmula (89):

$$D_A = 1 - \frac{1}{r} \sum_j^r \sum_i^{m_j} \sqrt{x_{ij}y_{ij}},$$

Donde x_{ij} e y_{ij} son las frecuencias de los alelos i y el locus j en la población X e Y , respectivamente, m_j es el número de alelos en el locus j , y r es el número de loci evaluados.

VI.4.2.3. Construcción del dendrograma

Las relaciones filogenéticas entre individuos basados en las distancias genéticas de Nei (D_A) se construyeron utilizando un dendrograma UPGMA (del inglés: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

El dendrograma fue mostrado usando el software FigTree ([http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/.](http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/))

VI.4.2.4. Evaluación de la asociación entre distancia genética y distancia geográfica

La asociación entre distancias (o similaridades) genéticas y las distancias geográficas fue evaluado utilizando el coeficiente de correlación de Spearman. Las distancias geográficas fueron calculadas usando el programa on-line para calcular distancias geográficas: Movable Type Scripts (disponible en <http://www.movable-type.co.uk/scripts/latlong.html>)

VI.4.3. Cálculo de tamaño de muestra y de poder

VI.4.3.1. Tamaño de muestra para el estudio de la variabilidad genética de cisticercos recuperados de cerdos infectados experimentalmente

Para determinar el tamaño de muestra en el cual se pueda detectar cada alelo en un locus en una frecuencia de ≥ 0.05 , se utilizó la siguiente fórmula (90):

$$\frac{\log \beta}{\log(p)}$$

Donde β es $1 - \text{chance}$, en este caso, la chance es 95%, $\beta=0.05$

p es la probabilidad de detectar cada alelo en un locus en una frecuencia ≥ 0.05 . Y

p está dado por: $(1 - 0.05)^n$, n es el número de cromosomas, en este caso 2.

Por lo tanto el número de individuos a evaluar es:

$$n = \frac{\log 0.05}{\log(0.95^2)} = 29.2$$

El número total de cisticercos que deben ser evaluados para tener una chance del 95% de detectar cada alelo en una frecuencia de ≥ 0.05 es 30.

VI.4.3.1. Tamaño de muestra para la caracterización molecular de cisticercos recuperados de cerdos infectados naturalmente

Asumiendo que quisiéramos detectar cada alelo en un locus en una frecuencia de ≥ 0.08 , que es el porcentaje de variabilidad espontánea hallado en la infección experimental, utilizando la fórmula anterior, sería necesario evaluar a 18 cisticercos por cerdo.

Por otro lado, si se quisiera identificar en un cerdo, al menos dos poblaciones de cisticercos, con una muestra de 10 cisticercos, se tendría un 99.99% de probabilidad de encontrar ambas poblaciones.

VI.5 Consideraciones éticas

Tanto el estudio de infección experimental, como el de estudio de campo cuentan con la aprobación del comité de ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Se adjuntan certificados de aprobación en el Anexo 2. Las tenias adultas utilizadas para la infección natural fueron donadas por el laboratorio de Neurocisticercosis del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas. Estas fueron obtenidas luego del tratamiento regular de desparasitación. Las tenias adultas provenientes de Pampa Elera fueron obtenidas en un estudio previo (50).

VII Resultados

VII.1 Caracterización molecular (genética) de *Taenia solium* proveniente de una infección artificial

VII.1.1. Infección artificial de cerdos.

Los 6 cerdos se infectaron exitosamente, tal como se confirmó por la prueba de Western blot y posteriormente en la necropsia (Figura 10). Se colectaron un total de 161 cisticercos (Figura 11), aproximadamente, 30 por cada cerdo, excepto por un cerdo infectado por la Tenia B, del cual colectamos 11 cisticercos.



Figura 10. Obtención de los cisticercos en la carcasa de los cerdos sacrificados

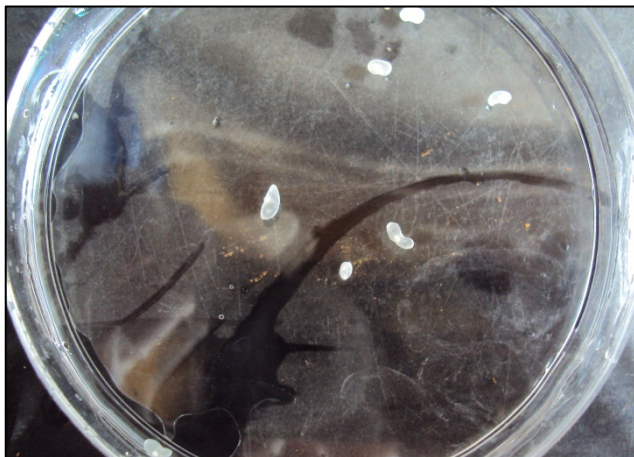


Figura 11. Cisticercos individualmente extraídos

Se obtuvo el ADN y se realizó la amplificación de cuatro marcadores: TS_SSR09, TS_SSR27, TS_SSR28 y TS_SSR32 en 157 cisticercos. Los tamaños de banda fueron estimados utilizando el equipo de EC QIAXcel. Los resultados se muestran en el Anexo 3. Sin embargo, los resultados de secuenciamiento que se realizó a una sub-muestra de cisticercos, indicaron que los tamaños de muestra estimados por el equipo de EC no eran exactos, ni precisos (ver más adelante en la sección VII.3).

Para el análisis de esta sección, se consideró a todos los cisticercos de los 3 cerdos infectados como descendientes (progenie) de cada tenia (TA y TB). De acuerdo a los resultados de secuenciamiento, se encontró que 36 cisticercos de 39 (92.3%, 95% CI: [79.1% - 98.4%]) provenientes cerdos infectados con la Taenia TA y 27 de 27 (100%, 95% CI: [87.2%-100%]) cisticercos procedentes de la Taenia TB tuvieron genotipos idénticos a las tenias parentales (Tabla 3). Encontramos mutaciones espontáneas (polimorfismo de tamaño) que parecen ocurrir naturalmente y que no son mayores de dos repeticiones (6 nucleótidos). Por lo tanto, tomando como ejemplo, los resultados de la Tenia TA, la probabilidad de que un cisticerco con una diferencia de una o dos repeticiones sea una mutación espontánea respecto a la tenia parental es 7.7% (95% CI: [1.6% -20.9%]). Si analizamos, por otro lado cada marcador individual, uno de 39 cisticercos por locus mutó (2.6%, 95% CI [0.1%-13.5%]). La heterocigosidad esperada fluctuó entre 0 y 0.016.

Tabla 3. Genotipos en los cisticercos resultantes de la infección artificial expresados en número de repeticiones por marcador.

		Número de cisticercos	TS_SSR09	TS_SSR27	TS_SSR28	Frecuencias genotípicas
Patrón (tamaño en pb ⇒ número de repeticiones) †			172⇒17	165⇒16	200⇒14	
Proglótitos <i>Tenia</i> TA		10	16	17	22	0.833
	Cerdo A1	1	16	17	20	0.083
		1	16	16	22	0.083
	Cerdo A3	13	16	17	22	0.929
		1	14	17	22	0.071
	Cerdo A7	13	16	17	22	1.000
Proglótitos <i>Tenia</i> TB	Cerdo B4	11	13	12	21	1.000
	Cerdo B5	5	13	12	21	1.000
	Cerdo B6	11	13	12	21	1.000

† El número de repeticiones se estimó en base a la secuencia patrón de *T. solium* (referencia) para cada marcador a partir del resultado del secuenciamiento.

VII.2 Caracterización molecular de *Taenia solium* en condiciones naturales

Censo y mapeo. Se realizó el censo en un total de 530 personas en 170 casas en la comunidad de Pampa Elera en Piura, Perú. 271 personas (51.2%) de la comunidad era del sexo femenino y 259 (48.8%), del sexo masculino. La edad mediana de la población fue de 26 años, el 50% de la población se encontraba entre los 11 y 45 años (Rango Intercuartil: [11-45]). El 94% de las familias censadas declaró que obtenía agua del río o de las acequias. 74% declaró que trataba el agua para

consumo, y un 20% declaró que no trataba el agua que consumía. El 86% de la población declaró que eliminaba las heces a campo abierto, mientras que sólo el 8% lo hacía en un silo.

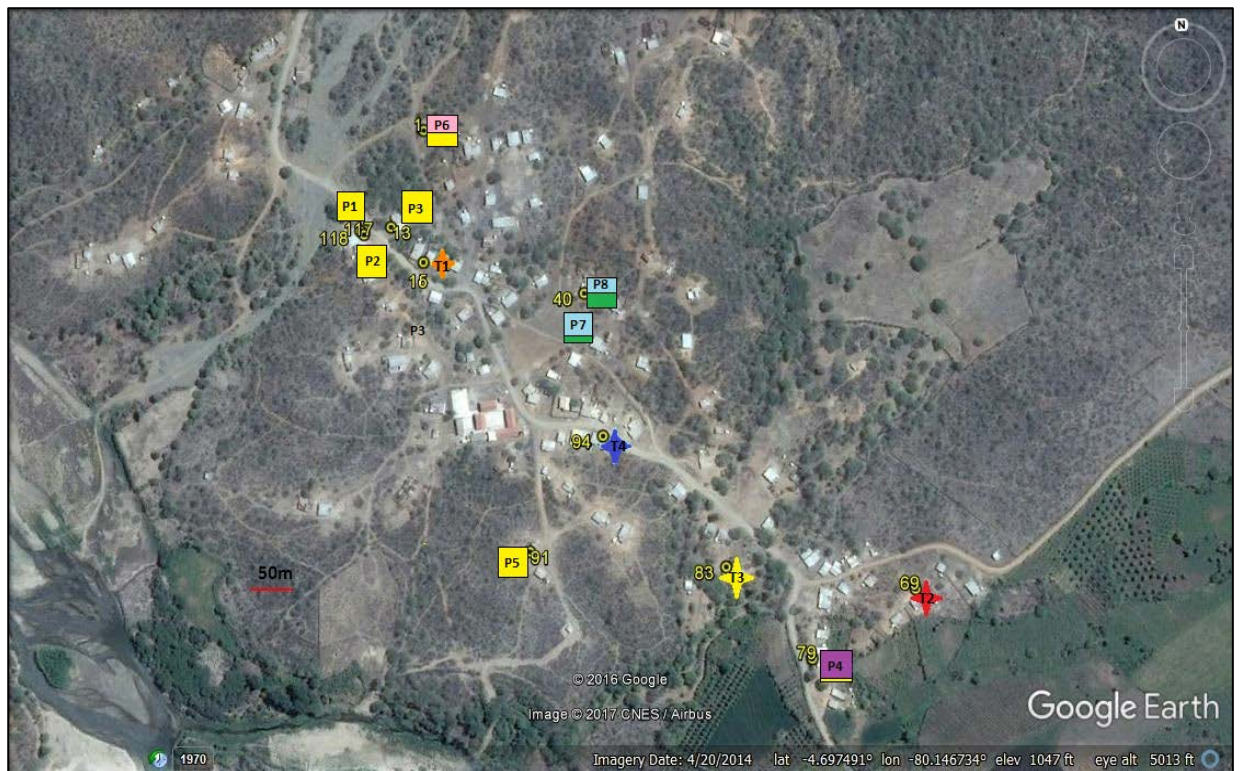
Setenta y nueve familias (46%) indicó que criaban un promedio de 3.5 cerdos por familia (rango: 1 - 12 por familia). Se observó que la mayoría era criados “al pastoreo”, es decir que caminaban libremente por la comunidad en busca de alimentos. El mapa de la comunidad, mostrando la localización de las casas donde se ubicaron a los cerdos infectados y de personas teniásicas identificadas previamente por Watts y col (50) en Pampa Elera se muestra en la Figura 12.

Entre las cuatro familias donde se encontraban los teniásicos, dos de ellos (T3 y T4) declararon no tener letrina y que defecaban a campo abierto. Los otros dos teniásicos declararon que tenían letrina y lo usaban (Tabla 4). Por otro lado, los dueños de ocho los cerdos sacrificados declararon que los cerdos se alimentan de desperdicios, y que no los tenían en corrales, sino que “patrullan” libremente por la comunidad.

Identificación de cerdos infectados. Durante el trabajo de campo se evaluaron aproximadamente 303 cerdos, un número ligeramente mayor del proyectado según el censo realizado días antes. Se identificaron un total de 9 cerdos cuyo examen de lengua fue positivo (Figura 9), de los cuales se sacrificaron a 8 cerdos. Se colectó aproximadamente 30 cisticercos por cerdo (Figura 13). La Tabla 5 muestra las características de los cerdos. Todos los cerdos infectados provenían de la comunidad, es decir nacieron y fueron criados en Pampa Elera.

Tabla 4. Características de las personas infectadas con *T. solium*

Tenia	Casa	Crianza de cerdos	Facilidades sanitarias
T1	16	Tiene 2 cerdos libres. Son alimentados con desperdicios.	Tiene letrina, consume agua tratada (hervida), obtenida del río
T2	69	Tiene 12 cerdos libres. Son alimentados con desperdicios	Tiene letrina, consume agua no tratada, obtenida del río
T3	83	Tiene 2 cerdos libres que se alimentan de desperdicios	No tiene letrina, consume agua del río, no tratada
T4	94	No tiene cerdos	No tiene letrina, consume agua no tratada, obtenida del río.



Mapa de Pampa Elera mostrando la ubicación de las tenias (T1-T4) y de los cerdos (P1-P8). Los genotipos de las tenias y los cisticercos extraídos de los cerdos se muestran a través de los colores.

Figura 12. Mapa de Pampa Elera Baja



Figura 13. Identificación y extracción de cisticercos en Pampa Elera

Tabla 5. Características de los cerdos infectados naturalmente en Pampa Elera, Piura

Cerdo	Casa	Sexo	Edad (meses)	Peso (kg)	Total	Cisticercos
					cisticercos encontrados	genotipificados †
P1	117	Macho	7	12	2276	29
P2	118	Macho	7	25	959	27
P3	13	Macho	7	35	1837	30
P4	79	Hembra	9	42	634	32
P5	91	Macho	9	18	1448	21
P6	1	Hembra	12	24	65	22
P7	40	Hembra	24	38	1064	28
P8	40	Hembra	24	40	114	30

† Cisticercos genotipificados y analizados por el Sistema de Electroforesis Capilar

Genotipificación.- De manera similar al primer experimento, en el segundo se usaron 4 marcadores microsatélites: TS_SSR09, TS_SSR27, TS_SSR28 y TS_SSR32. Inicialmente, los tamaños de banda fueron determinados utilizando la EC (Anexo 4). Igualmente se secuenció una sub-muestra de 9 a 14 cisticercos por cerdo evidenciaron error en la precisión de los estimados (Ver sección VIII.3).

Las tenias identificadas y obtenidas por Watts (2014) (50) se genotipificaron, al igual que los cisticercos. Los resultados de secuenciamiento se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Genotipos de las tenias aisladas en Pampa Elera expresados en número de repeticiones por marcador.

Tenia	TS_SSR09	TS_SSR27	TS_SSR28
T1	13	12	19
T2	13	13	20
T3	12	12	19
T4	13	12	20

El número de repeticiones se estimó en base a la secuencia patrón de *T. solium* (referencia) para cada marcador a partir del resultado del secuenciamiento.

Basado en los resultados de secuenciamiento, se define que dos genotipos son los mismos si tienen el mismo tamaño. De este modo, las cuatro tenias diferían en al menos un marcador entre ellas (Tabla 7). En el caso de los cerdos, seis cerdos (P1, P2, P3 y P5) tuvieron cisticercos con genotipo idéntico al de la tenia T3; dos cerdos (P4 y P6) tuvieron dos tipos de cisticercos, algunos que coincidían con la

tenia T3 y otros diferentes a los de las otras tenias. Finalmente dos cisticercos P7 y P8 tuvieron cisticercos con genotipo diferente al de las tenias identificadas.

Dos cerdos (P4 y P5) que tienen genotipo que concuerda con la Tenia T3, viven a 200 m de esa casa aproximadamente. Por otro lado, los otros cerdos viven más lejos, por ejemplo el cerdo P6 vive a una distancia de 590 m (Figura 12).

Los cisticercos recuperados de un mismo cerdo mostraron variabilidad genética. Cuatro cerdos tenían cisticercos con un único genotipo; mientras que los otros cerdos tenían cisticercos con dos tipos de genotipos diferentes en proporciones que van del 10% al 43% (Tabla 7). Basada en la variabilidad espontánea encontrada en la infección experimental, la probabilidad de que un cerdo tenga dos tipos diferentes de cisticercos en proporciones de aproximadamente 40%/60% debido sólo a variación espontánea, es baja. Por ello, es probable que al menos dos cerdos: P6 y P8 estuvieran infectados con dos tipos de cisticercos (de diferente origen parental). Asumiendo una variabilidad espontánea de aproximadamente 8%, podemos decir que 32% de los cisticercos recuperados de P6 y el 35% de los cisticercos recuperados del cerdo P8 probablemente tienen un origen parental diferente. La heteocigosidad esperada en cada cerdo fluctuó entre 0 a 0.34 (Tabla 8).

Tabla 7. Genotipos de los cisticercos aislados de los cerdos. Numero de repeticiones

Cerdo	Número de cisticercos	Genotipo			Frecuencias genotípicas
		SSR09	SSR27	SSR28	
P1	13	12	12	19	1.00
	1	†	12	19	-
	1	†	†	19	-
P2	12	12	12	19	1.00
	1	†	12	19	-
P3	11	12	12	19	1.00
	1	12	12	†	-
P4	9	13	12	21	0.90
	1	12	12	19	0.10
P5	8	12	12	19	1.00
	2	†	†	19	-
P6	6	13	12	21	0.60
	4	12	12	19	0.40
P7	9	13	13	19	0.82
	2	13	13	21	0.18
	1	13	†	19	-
P8	8	13	13	19	0.57
	6	13	13	21	0.43

† Muestras no pudieron ser secuenciadas, debido a poca cantidad de ADN

Tabla 8. Heterocigosidad esperada

Locus	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	Promedio
SSR09	0.00	0.00	0.00	0.189	0.00	0.505	0.00	0.00	0.058
SSR27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
SSR28	0.00	0.00	0.00	0.189	0.00	0.505	0.290	0.508	0.124
Promedio	0.00	0.00	0.00	0.126	0.00	0.337	0.097	0.169	0.061
DE	0.00	0.00	0.00	0.109	0.00	0.292	0.167	0.293	0.072

Análisis de las relaciones genéticas de los parásitos evaluados

El análisis de las relaciones genéticas, se realizó a través de la construcción de un árbol filogenético UPGMA. Este muestra las siguientes relaciones. La Tenia T3 se agrupa con los cisticercos de los cerdos P1, P2, P3, P5 y parte de los cisticercos obtenidos de P6 y estos a su vez se agrupan con la Tenia T1. Por otro lado los cerdos P7 y P8 también se agrupan juntos. Los cisticercos de P4 y P6 se agrupan junto con los anteriores y la Tenia T4. Finalmente la Tenia T2 se agrupa con cisticercos de los cerdos P8 y P7 (Figura 14). Los valores de bootstrap son moderados.

Los resultados indicaron que no hubo correlación entre las distancias genéticas y geográficas (coeficiente de correlación de Spearman Rank $r = 0.253$, $p < 0.001$).

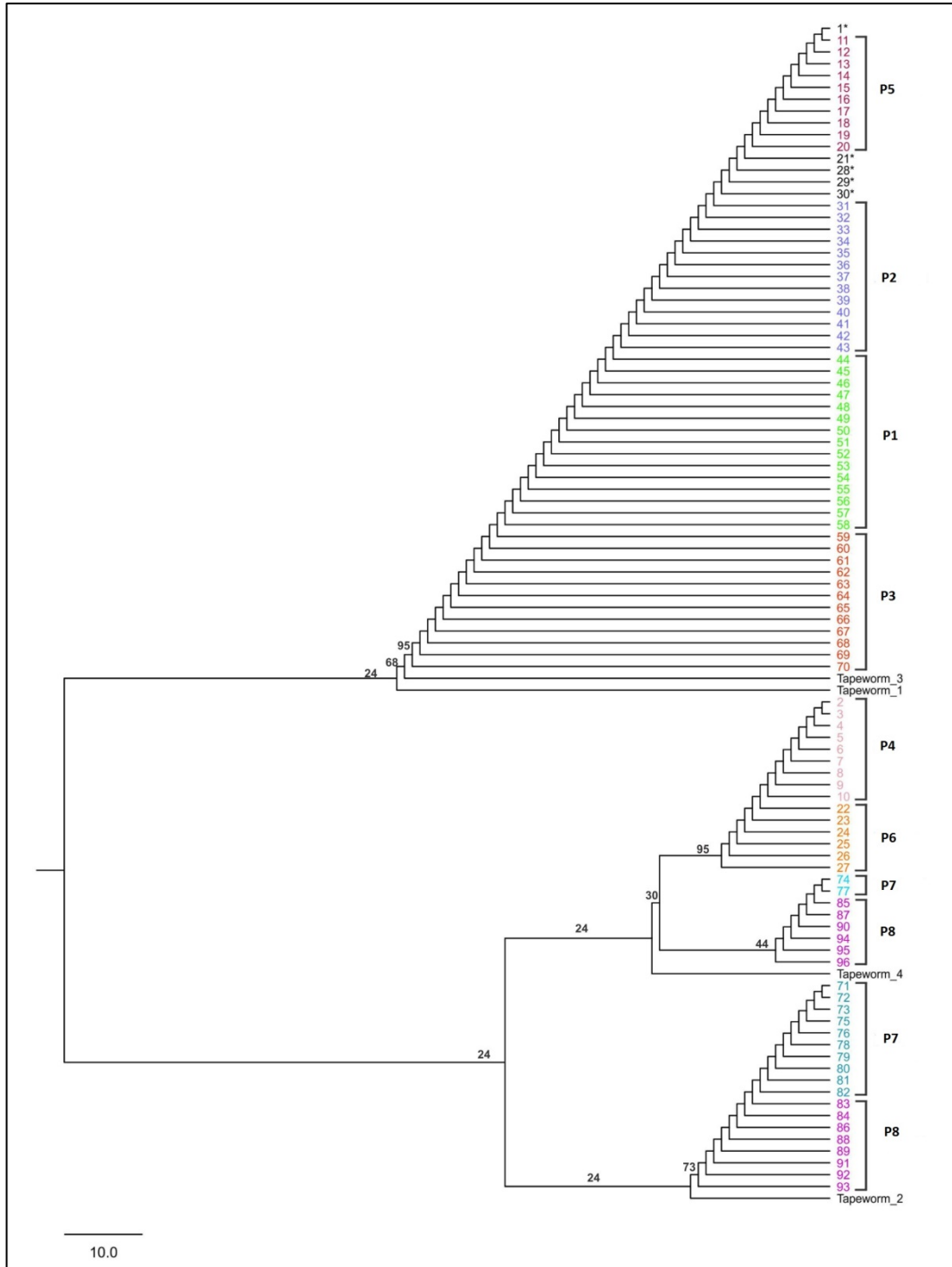


Figura 14. Dendrograma UPGMA mostrando las distancias genéticas entre cisticercos basados en el polimorfismo de microsatélites.

VII.3 Análisis de los resultados del sistema de electroforesis capilar, comparado con los resultados de secuenciamiento.

Con la finalidad de confirmar los resultados obtenidos por EC, se secuenció una submuestra de cisticercos. Los resultados de polimorfismo de tamaño de los marcadores obtenidos no fueron exactos, ni precisos. En la Tabla 9 se muestra un resumen de las diferencias encontradas en cuanto al tamaño de los alelos y las frecuencias encontradas en cada caso. En el Anexo 5 se muestran los resultados en detalle de la comparación realizada con los resultados de secuenciamiento.

Tabla 9. Comparación de frecuencias alélicas entre los resultados de secuenciamientos y de Electroforesis Capilar (QIAxcel)

Alelo	SSR09				SSR27				SSR28				SSR32			
	EC	Secuenciamien	EC	Secuenciamien.	EC	Secuenciamien.	EC	Secuenciamien.	EC	Secuenciamien						
1	160	(0.024)	157	(0.313)	155	(0.116)	153	(0.583)	211	(0.011)	215	(0.407)	180	(0.714)	176	(1.000)
2	163	(0.422)	160	(0.488)	158	(0.416)	156	(0.156)	214	(0.264)	218	(0.016)	183	(0.185)		
3	166	(0.331)	163	(0.012)	161	(0.179)	168	(0.260)	217	(0.137)	221	(0.313)	186	(0.092)		
4	169	(0.036)	169	(0.187)	164	(0.029)			220	(0.220)	224	(0.258)	189	(0.008)		
5	172	(0.072)			170	(0.179)			223	(0.209)						
6	175	(0.115)			172	(0.006)			224	(0.005)						
7					173	(0.075)			226	(0.121)						
8									229	(0.017)						
9									232	(0.005)						
10									233	(0.006)						
11									235	(0.006)						

VIII Discusión

En el presente estudio, se muestra evidencia importante respecto a la variabilidad genética de *T. solium* utilizando marcadores microsatélites, mostrando su potencial utilidad como herramienta de genotipificación y para establecer relaciones genéticas filiales a nivel local. En primer lugar, se establece que la probabilidad de que un cisticerco tenga el mismo genotipo que la tenia parental, en una infección artificial es de 92%, sugiriendo que la mutación espontánea en cisticercos provenientes de una misma tenia ocurre en el 8% de veces para 2 o menos repeticiones por generación. Por tanto, esta herramienta tiene alta probabilidad de identificar correctamente la progenie de una tenia adulta. Segundo, los cerdos infectados naturalmente en una comunidad endémica rural alojan subgrupos de cisticercos con diferentes genotipos, lo que podría ser explicado por infecciones provenientes de diferentes tenias parentales. A continuación se discute en detalle, los resultados de ambos estudios.

VIII.1 Estudio de la identidad genética de *T. solium* proveniente de una infección artificial

En el primer experimento, de infección artificial, definiendo un genotipo como la combinación única de alelos de cada microsatélite, se muestra que la progenie (cisticercos) de un parásito adulto de *T. solium* tienen prácticamente el mismo genotipo que el parental. Esto se notó principalmente en los cisticercos provenientes de una tenia de Cajamarca (*Taenia TB*), en los que todos los

cisticercos secuenciados, tuvieron exactamente el mismo genotipo. Esto sugiere una baja variabilidad genética por locus por generación y que *T. solium* tiene una reproducción, en la práctica, semejante al tipo clonal y que sería posible establecer relaciones filiales entre tenias (obtenidos de personas infectadas) y cisticercos (obtenidos de cerdos) en una comunidad endémica. Esto, a su vez, permitiría estudiar los patrones de distribución de los parásitos en la comunidad, y así, determinar rutas de transmisión.

El presente estudio no intenta estimar la verdadera tasa de mutación de microsatélites en *T. solium*, pues el número de individuos estudiados es muy bajo y los marcadores estudiados no son en absoluto representativos de la población total de microsatélites. Los marcadores elegidos en este estudio fueron de los más polimórficos y con al menos tres nucleótidos en el motivo repetido, para evitar generar repeticiones artificiales durante los procesos de PCR.

Se asume que los marcadores evaluados son homocigotes y no alelos nulos, aunque no se descarta tal posibilidad de que así lo sean. Por otro lado, son informativos pues se ha demostrado que son polimórficos. De hecho las dos tenias usadas para la infección tienen genotipos diferentes en los tres microsatélites: 4, 5 y 1 repeticiones para los microsatélites TS_SSR09, TS_SSR27 y TS_SSR28, respectivamente.

Las mutaciones por generación de microsatélites suelen describirse como la adición o reducción de una repetición por generación (62, 92), en este estudio, de las 3 mutaciones encontradas, en dos de ellas hubo una reducción de 2 repeticiones por mutación y en una hubo una reducción de una repetición por

mutación. Por otro lado, todas las mutaciones de alelos se redujeron, independientemente del tamaño del alelo parental. Se ha reportado que los alelos tienden a reducirse o crecer hasta conseguir un equilibrio de 20pb (92), aunque por supuesto, *T. solium* puede comportarse de manera diferente.

La baja variabilidad genética encontrada en el presente estudio contrasta con los resultados obtenidos por Maravilla en una infección artificial (21). En el estudio de Maravilla (2008), se infectaron cerdos para recuperar cisticercos y estudiar la variabilidad genética utilizando la técnica RAPDs. Aunque sus resultados mostraron un agrupamiento genético de los cisticercos con las tenias parentales, también sugirieron variabilidad genética, mayor a la reportada en el presente estudio. Ellos obtuvieron una heterocigosidad esperada de 0.06-0.22 vs 0.00 – 0.016 obtenida en este estudio. Así mismo reportan mayor heterocigosidad esperada que la obtenida en estudio de infecciones naturales (22), en las que se atribuye la variabilidad genética al tipo de reproducción sexual (23). Aunque la ventaja de RAPD es la rapidez y el costo, tiene desventajas como la interpretación subjetiva de los resultados y la falta de reproducibilidad (93, 94). Los alelos son dominantes, por lo que no se pueden discernir individuos heterocigotos. Por lo tanto, no serían útiles para determinar relaciones entre parásitos (o poblaciones) a nivel local. Por el contrario, los genotipos obtenidos con microsatélites son reproducibles ya que las secuencias se amplifican a partir de regiones conservadas del genoma del parásito. Los genotipos obtenidos por microsatélites, pueden

además ser comparables con otros estudios, en otras regiones a nivel local y a nivel continental. Se han reportado estudios de diversidad y relación filogenética y evolutiva en regiones tan grandes como Europa (*E. multilocularis*).

La baja variabilidad genética obtenida en este estudio, por otro lado, puede explicarse porque *T. solium* es un parásito monoecio que se auto-fertiliza (35, 95) y porque la mayoría de infecciones son simples (de un solo parásito). Sin embargo, debe notarse que excluyendo el reporte de Maravilla (2008), el presente estudio demuestra que existe variabilidad genética espontánea mayor a la reportada anteriormente con otros marcadores genéticos (18, 19).

Cabe mencionar, que en el presente estudio no se ha desarrollado una infección múltiples de *Taenia* adultas, que en el caso de *T. solium* ocurre hasta en un 20% (47). En este caso es posible que ocurra una recombinación propia de los organismos con reproducción sexual. En otros organismos hermafroditas, como en *Oochoristica javaensis*, un cestodo que infecta lagartos, se evidenció una segregación de tipo mendeliana, utilizando microsatélites. Los lagartos pueden ser infectados por decenas de parásitos a la vez, lo que incrementa la probabilidad de fertilización cruzada y por ende de mayor diversidad genética. Detwiler sugiere que el tipo de reproducción de *O. javaensis* es sexual y que tendría una segregación de tipo mendeliana (39). De igual manera, la fertilización cruzada se ha observado en *Schistocephalus solidus*, cestode que parasita aves y peces, y en el que se ha estudiado en detalle los fenómenos de autofertilización y fertilización cruzada (40-42, 81).

VIII.2 Estudio de la identidad genética de *T. solium* en condiciones naturales

Con el resultado obtenido en la primera parte del estudio en el que se muestra que existe una alta probabilidad de identificar y relacionar correctamente cisticercos con una tenia parental, se realizó un segundo estudio en la comunidad de Pampa Elera Baja en Ayabaca, Piura. En éste, se confirmó la variabilidad genética de *T. solium* en la comunidad, y se exploró las posibles relaciones genéticas entre cisticercos y tenias adultas identificadas.

Pampa Elera es una comunidad típicamente rural, con pobres condiciones sanitarias y falta de acceso al agua corriente (o potable), y donde casi 9 de cada 10 familias declararon no tener letrina y por ende realizar sus deposiciones a campo abierto. Los cerdos que son coprófagos, tienen acceso fácilmente a las heces, aumentando su riesgo de infección, lo que se refleja en la prevalencia de teniasis (50) y de cisticercosis porcina. Estas condiciones ofrecen un buen escenario para explorar la distribución genética entre tenias y cisticercos en la comunidad.

VIII.2.1. Variabilidad genética

El estudio de la infección natural en esta comunidad confirmó que existe variabilidad genética de *T. solium* mayor a la encontrada en la infección artificial (H_e : 0-0.34 vs 0-0.011, respectivamente), lo cual era de esperarse. Las cuatro tenias tuvieron genotipos diferentes, y se identificaron 3 genotipos adicionales entre los cisticercos obtenidos de los cerdos.

VIII.2.2. Relación genética entre *Taenias* y cisticercos

Los dendrogramas sugieren un agrupamiento de cisticercos en torno al cerdo de origen, y relación cercana entre tenias que se encuentran geográficamente cerca. Sin embargo, seis cerdos distantes geográficamente tuvieron cisticercos cuyos genotipos correspondían al genotipo de la tenia T3, mostrando efectivamente un bajo grado de concordancia con las tenias lo cual fue corroborado con la baja correlación existente entre las distancias genéticas y las distancias geográficas. Lo esperado sería encontrar una correlación positiva entre la distancia genética y la distancia geográfica de los parásitos (tenia-cisticerco) puesto que se ha reportado que los cerdos “patrullan” aproximadamente el 83% del tiempo a sólo 100m de sus casas (96). Empero, también se ha reportado que los cerdos pueden caminar varios kilómetros lejos de las casas de sus dueños (96, 97), así en África se ha reportado que los cerdos pueden caminar y alejarse de sus hogares distancias cercanas a 1km (97). Por ello, no se descarta la posibilidad de que efectivamente, los cerdos se hayan infectado con huevos de la tenia T3. Además la familia reportó no tener letrina.

Por otro lado, se reconoce que el hecho de tener cerdos con cisticercos con el genotipo idéntico a una tenia que se encuentra a 590m de distancia, no es indicativo necesariamente que el cerdo y/o el humano se acercaron de alguna manera, sino que puede haber otra fuente de infección (v.g. tenia) con un genotipo idéntico o similar, en este sentido sería útil contar con un panel más amplio de marcadores microsatélites para definir los genotipos con mayor precisión. Así mismo, sería importante contar con genotipos de todas las tenias de la comunidad.

Otra información relevante encontrada en el presente estudio es la ocurrencia de cisticercos (específicamente en los cerdos P4, P6, P7 y P8) con genotipos diferentes a los genotipos de las tenias identificadas. Existen varias posibles explicaciones: (i) los cerdos pudieron haber sido obtenidos por sus dueños en otras comunidades aledañas, sin embargo, todos los cerdos estudiados fueron nacidos y criados en Pampa Elera Baja. (ii) los cerdos fueron infectados con huevos provenientes de teniásicos que estuvieron de paso en la comunidad. En el censo se reportó que el 23% de las personas provenían de diferentes comunidades de Piura, Tumbes (zonas endémicas) y algunos de Lima. (iii) los cerdos fueron infectados con tenias **no** identificadas previamente. Es posible que hubieran personas infectadas que no se identificaron en el estudio previo (50), resultando en otras fuentes de contaminación por *T. solium*.

Finalmente, se observa, que dos cerdos que viven en la misma casa (P7 y P8), tienen los mismos tipos de cisticercos. Pray y col (2016) describieron que los cerdos de la misma casa tienen rangos de “patrullaje” similares y esto es posible porque se mantienen juntos como manada (96).

VIII.2.3. Infecciones múltiples

En la primera parte de este estudio se estimó que la probabilidad de que un cisticerco tenga el mismo genotipo que el parental es 92.3% y por ende, están relacionados con un mismo origen, por ello, la presencia de dos tipos de cisticercos en un cerdo, puede sugerir que el cerdo tiene una infección múltiple.

Cuatro cerdos alojaban un solo tipo de cisticercos y otros cuatro cerdos alojaban dos tipos de cisticercos. El hecho de que sólo se hayan encontrado un solo genotipo entre los cisticercos, puede ser explicado posiblemente por una protección inmune adquirida. De Aluja y *col.* (1999) reportaron que cerdos infectados experimentalmente eran resistentes a la reinfección por un tiempo de al menos 5 meses (98). Todos los cerdos que alojaron dos tipos de cisticercos eran mayores de 9 meses, tiempo suficiente para tener re-infecciones.

El hallazgo de dos tipos de cisticerco en un cerdo sugiere ya sea infección múltiple (que el cerdo haya comido huevos o proglótidos de dos tenias diferentes) o que haya consumido huevos o proglótidos de una tenia que alojaba dos tipos de cisticercos (por ejemplo debido a una fertilización cruzada a nivel de tenias en una infección múltiple intestinal).

Otra característica es que estos cuatro cerdos son de los de mayor edad y hembras. Se ha reportado que los cerdos de 7 a 9 meses son los que caminan distancias más largas lejos de su hogar. De acuerdo al estudio de Pray y *col.*, los cerdos de 7 a 9 meses de edad pueden recorrer más área y llegar hasta una gran distancia (96). De tal modo que la probabilidad de haberse infectado de dos tenias diferentes y lejanas geográficamente es alta. El hecho de ser hembras también es un factor importante, pues durante la preñez los animales presentan una baja inmunidad durante el periodo cercano al parto, con mayor riesgo de infectarse (99).

VIII.3. Concordancia entre Electroforesis Capilar y el secuenciamiento.

En el presente estudio también se ha verificado y confirmado que las estimaciones de los tamaños de los productos de PCR de los marcadores microsatélites por el Sistema de EC, QIAxcel, tienen un error que no permite utilizar este método para la genotipificación en el caso de microsatélites con repeticiones son de 3pb o menos. Se ha reportado recientemente, este problema en marcadores microsatélites para *Plasmodium vivax* (65). Si bien es cierto, en dicho trabajo se reporta poca reproducibilidad y baja precisión, sobre todo con el uso de los cartuchos. En este caso, nuestros resultados mostraron ser reproducibles, al obtener los mismos resultados en dos repeticiones en algunos casos. Respecto a la precisión, nuestros resultados concuerdan con los de Manrique y col. ya que como se observa, los resultados de secuenciamiento mostraron un tamaño de producto diferente del encontrado por secuenciamiento. Por este motivo, se decidió secuenciar una muestra de los cisticercos. Más aun, los resultados de secuenciamiento que difirieron en el tamaño de banda, respecto al parental se secuenciaron dos veces, incluyendo la reacción de PCR, lo que indicaría que las diferencias en los genotipos de los cisticercos observados puede deberse a mutaciones intrínsecas de los microsatélites, lo que generaría la variabilidad genética.

Limitaciones

La limitación en este estudio, es que se han evaluado sólo 3 microsatélites polimórficos homocigotos (TS_SSR09, TS_SSR27 y TS_SSR28). En un estudio

previo se identificó 9000 posibles secuencias de microsatélites (25), por ello se recomienda ampliar el estudio, utilizando más marcadores para tener un resultado más robusto, respecto a la variabilidad genética en la infección artificial y para tener resultados más precisos cuando se quieran establecer relaciones genéticas a nivel local (comunidad). Se debe notar, sin embargo que para fines prácticos inclusive un solo marcador puede ser útil para genotipificar. Por ejemplo, en el caso de *Ecchinococcus*, el microsatélite denominado EmsB proporcionó información para diferenciar no sólo cepas de Europa y de Alaska, sino también diferentes cepas en Europa (15). EmsB es un microsatélite de peculiar estructura, consta de repeticiones de repeticiones. De manera similar, nuestro microsatélite TSSR01 diferencia bien entre cepas del norte y cepas del sur del Perú (25).

Los cerdos identificados en el presente estudio no son todos los cerdos infectados en la comunidad, aunque el método de la evaluación lingual es 100% específico, su sensibilidad es del 70%, por lo tanto existe un porcentaje de falsos negativos y por ende de cerdos infectados, que no se identificaron. Sin embargo los cerdos identificados con este método son cerdos severamente infectados y posiblemente cerdos alfa, es decir los que con alta probabilidad consumen directamente de las heces humanas, por lo tanto sí se consideraría una muestra representativa de los casos infectados.

Finalmente, en el estudio de Watts, en el que se identificaron las personas teniásicas, tuvo una baja cobertura, por lo tanto es posible que dentro de la comunidad hayan más personas teniásicas.

IX Conclusiones

1. Utilizando tres marcadores microsatélites polimórficos, se mostró que la progenie de *Taenia solium* tiene el mismo genotipo que la tenia parental en una proporción del 92%, indicando su uso potencial para el estudio de transmisión de *T. solium*.
2. En el estudio de la evaluación de los cisticercos extraídos de cerdos infectados naturalmente, se encontró hasta dos tipos de cisticercos por cerdo, lo que sugiere que esos cerdos pudieron haber tenido infecciones múltiples.
3. El diseño del estudio y sus limitaciones no permitieron encontrar una asociación entre genotipos de tenias y genotipos de los cisticercos a nivel local (comunidad rural).
4. El método de genotipificación utilizando QIAXcel no es preciso y no tiene la suficiente sensibilidad para genotipificar microsatélites de tres o menos pares de bases de repetición.

X Recomendaciones

1. Utilizar un panel más amplio de marcadores microsatélites a fin de identificar con mayor precisión la relación entre parásitos, específicamente entre cisticercos y tenias a una escala local.
2. Utilizar técnicas de estimación de polimorfismo de tamaño más preciso, tales como la electroforesis capilar **basado en cebadores fluorescentes**.
3. Para la evaluación y validación de una herramienta de genotipificación para establecer relaciones genéticas parentales en una comunidad, se recomienda emplear métodos de diagnóstico de teniasis y cisticercosis porcina con alta sensibilidad y especificidad, de modo que se puedan evaluar todos los individuos posiblemente involucrados.
4. Estudiar la segregación de alelos con marcadores heterocigotos.

XI Referencias Bibliográficas

1. Garcia HH, Del Brutto OH, Cysticercosis Working Group in P. Neurocysticercosis: updated concepts about an old disease. *Lancet neurology*. 2005;4(10):653-61.
2. Center for Disease Control and Prevention. Recommendations of the International Task Force for Disease Eradication. *MMWR* 1993;42(RR-16):12.
3. Schantz PM, Cruz M, Sarti E, Pawlowski Z. Potential eradicability of taeniasis and cysticercosis. *Bulletin of the Pan American Health Organization*. 1993;27(4):397-403.
4. Garcia HH, Gonzalez AE, Del Brutto OH, Tsang VC, Llanos-Zavalaga F, Gonzalez G, et al. Strategies for the elimination of taeniasis/cysticercosis. *Journal of the neurological sciences*. 2007;262(1-2):153-7.
5. Cruz M, Davis A, Dixon H, Pawlowski ZS, Proano J. Operational studies on the control of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis in Ecuador. *Bulletin of the World Health Organization*. 1989;67(4):401-7.
6. Engels D, Urbani C, Belotto A, Meslin F, Savioli L. The control of human (neuro)cysticercosis: which way forward? *Acta Tropica*. 2003;87(1):177-82.
7. Garcia HH, Gonzalez AE, Gilman RH, Moulton LH, Verastegui M, Rodriguez S, et al. Combined human and porcine mass chemotherapy for the control of *T. solium*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2006;74(5):850-5.
8. Ngowi HA, Carabin H, Kassuku AA, Mlozi MR, Mlangwa JE, Willingham AL, 3rd. A health-education intervention trial to reduce porcine cysticercosis

- in Mbulu District, Tanzania. Preventive veterinary medicine. 2008;85(1-2):52-67.
9. Sarti E, Flisser A, Schantz PM, Gleizer M, Loya M, Plancarte A, et al. Development and evaluation of a health education intervention against *Taenia solium* in a rural community in Mexico. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1997;56(2):127-32.
 10. Sarti E, Schantz PM, Avila G, Ambrosio J, Medina-Santillan R, Flisser A. Mass treatment against human taeniasis for the control of cysticercosis: a population-based intervention study. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2000;94(1):85-9.
 11. Garcia HH, Gonzalez AE, Rodriguez S, Gonzalvez G, Llanos-Zavalaga F, Tsang VC, et al. Epidemiology and control of cysticercosis in Peru. Revista peruana de medicina experimental y salud publica. 2010;27(4):592-7.
 12. Garcia HH, Gonzalez AE, Tsang VC, O'Neal SE, Llanos-Zavalaga F, Gonzalvez G, et al. Elimination of *Taenia solium* Transmission in Northern Peru. N Engl J Med. 2016;374(24):2335-44.
 13. Pajuelo M. Sustainability of interventions to control *T. solium* in northern Peru and Genetic variability of *T. solium* in Peru. Baltimore: Johns Hopkins University; 2013.
 14. Campbell G, Garcia HH, Nakao M, Ito A, Craig PS. Genetic variation in *Taenia solium*. Parasitology international. 2006;55 Suppl:S121-6.
 15. Bart JM, Knapp J, Gottstein B, El-Garch F, Giraudoux P, Glowatzki ML, et al. EmsB, a tandem repeated multi-loci microsatellite, new tool to investigate the genetic diversity of *Echinococcus multilocularis*. Infection, genetics and

- evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. 2006;6(5):390-400.
16. Knapp J, Bart JM, Maillard S, Gottstein B, Piarroux R. The genomic *Echinococcus microsattelite* EmsB sequences: from a molecular marker to the epidemiological tool. Parasitology. 2010;137(3):439-49.
 17. Umhang G, Knapp J, Hormaz V, Raoul F, Boue F. Using the genetics of *Echinococcus multilocularis* to trace the history of expansion from an endemic area. Infect Genet Evol. 2014;22:142-9.
 18. Hancock K, Broughel DE, Moura IN, Khan A, Pieniazek NJ, Gonzalez AE, et al. 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. 2001;31(14):1601-7.
 19. Nakao M, Okamoto M, Sako Y, Yamasaki H, Nakaya K, Ito A. A phylogenetic hypothesis for the distribution of two genotypes of the pig tapeworm *Taenia solium* worldwide. Parasitology. 2002;124(Pt 6):657-62.
 20. Sato MO, Sako Y, Nakao M, Wandra T, Nakaya K, Yanagida T, et al. A possible nuclear DNA marker to differentiate the two geographic genotypes of *Taenia solium* tapeworms. Parasitology international. 2011;60(1):108-10.
 21. Maravilla P, Gonzalez-Guzman R, Zuniga G, Peniche A, Dominguez-Alpizar JL, Reyes-Montes R, et al. Genetic polymorphism in *Taenia solium* cysticerci recovered from experimental infections in pigs. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. 2008;8(2):213-6.

22. Maravilla P, Souza V, Valera A, Romero-Valdovinos M, Lopez-Vidal Y, Dominguez-Alpizar JL, et al. Detection of genetic variation in *Taenia solium*. The Journal of parasitology. 2003;89(6):1250-4.
23. Bobes RJ, Fragoso G, Reyes-Montes Mdel R, Duarte-Escalante E, Vega R, de Aluja AS, et al. Genetic diversity of *Taenia solium* cysticerci from naturally infected pigs of central Mexico. Veterinary parasitology. 2010;168(1-2):130-5.
24. Information NCfB. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 2016 [Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrapd/>].
25. Pajuelo MJ, Eguiluz M, Dahlstrom E, Requena D, Guzman F, Ramirez M, et al. Identification and Characterization of Microsatellite Markers Derived from the Whole Genome Analysis of *Taenia solium*. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9(12):e0004316.
26. de Aluja AS. Cysticercosis in the pig. Current topics in medicinal chemistry. 2008;8(5):368-74.
27. Garcia HH, Gilman R, Martinez M, Tsang VC, Pilcher JB, Herrera G, et al. Cysticercosis as a major cause of epilepsy in Peru. The Cysticercosis Working Group in Peru (CWG). Lancet. 1993;341(8839):197-200.
28. Bern C, Garcia HH, Evans C, Gonzalez AE, Verastegui M, Tsang VC, et al. Magnitude of the disease burden from neurocysticercosis in a developing country. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 1999;29(5):1203-9.
29. Singh G, Burneo JG, Sander JW. From seizures to epilepsy and its substrates: neurocysticercosis. Epilepsia. 2013;54(5):783-92.

30. Náquira C. *Taenia solium*: Biological Cycle and Characteristics. In: Garcia HH, Martinez SM, editors. *Taenia solium*: Taeniasis/Cysticercosis. Second Edition. Lima, Peru: Editorial Universo; 1999. p. 8-14.
31. Craig P, Ito A. Intestinal cestodes. Current opinion in infectious diseases. 2007;20(5):524-32.
32. Verastegui M, Gilman RH, Arana Y, Barber D, Velasquez J, Farfan M, et al. *Taenia solium* oncosphere adhesion to intestinal epithelial and Chinese hamster ovary cells in vitro. Infection and immunity. 2007;75(11):5158-66.
33. Garcia HH, Del Brutto OH, Nash TE, White AC, Jr., Tsang VC, Gilman RH. New concepts in the diagnosis and management of neurocysticercosis (*Taenia solium*). The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2005;72(1):3-9.
34. CDC CfDCaP. Taeniasis Atlanta, US2016 [updated May 3, 2016. Available from: <https://www.cdc.gov/dpdx/taeniasis/>.
35. Pawlowski ZS. *Taenia solium*: Basic Biology and Transmission. In: Singh G, Prabhakar S, editors. *Taenia solium* Cysticercosis From Basic to Clinical Science. First Edition. London, UK: CAB International; 2002. p. 1-13.
36. Medical Publishing Internet RK. Tapeworms-Cestoda: *Taenia* (cysticercus), *Echinococcus* (hydatid), *Diphyllobothrium*, *Hymenolepis*, *Dipylidium*2010; (version 1):[Februaru 1 2013-Available from: <http://clinicalsciences.wordpress.com/article/tapeworms-cestoda-xk923bc3gp4-91/>. pp.]

37. Garrido GS, de Aluja AS, Casas FC. Early stages of development of the *Taenia solium* metacestode in pigs. *The Journal of parasitology*. 2007;93(2):238-41.
38. Herráez A. El genoma en el ciclo celular. In: España E, editor. *Biología molecular e ingeniería genética*. Segunda ed. Barcelona, España: Elsevier; 2012.
39. Detwiler JT, Criscione CD. Testing Mendelian inheritance from field-collected parasites: Revealing duplicated loci enables correct inference of reproductive mode and mating system. *International journal for parasitology*. 2011;41(11):1185-95.
40. Henrich T, Benesh DP, Kalbe M. Hybridization between two cestode species and its consequences for intermediate host range. *Parasit Vectors*. 2013;6:33.
41. Milinski M. Fitness consequences of selfing and outcrossing in the cestode *Schistocephalus solidus*. *Integrative and comparative biology*. 2006;46(4):373-80.
42. Christen M, Milinski M. The consequences of self-fertilization and outcrossing of the cestode *Schistocephalus solidus* in its second intermediate host. *Parasitology*. 2003;126(Pt 4):369-78.
43. Willms K, Caro JA, Robert L. Ultrastructure of spermatogonia and spermatocyte lobules in *Taenia solium* strobilae (Cestoda, Cyclophyllidea, Taeniidae) from golden hamsters. *Parasitology research*. 2003;90(6):479-88.
44. Willms K. Morphology and biochemistry of the pork tapeworm, *Taenia solium*. *Current topics in medicinal chemistry*. 2008;8(5):375-82.

45. Sciutto E, Morales J, Martinez JJ, Toledo A, Villalobos MN, Cruz-Revilla C, et al. Further evaluation of the synthetic peptide vaccine S3Pvac against *Taenia solium* cysticercosis in pigs in an endemic town of Mexico. *Parasitology*. 2007;134(Pt 1):129-33.
46. Bustos JA, Rodriguez S, Jimenez JA, Moyano LM, Castillo Y, Ayvar V, et al. Detection of *Taenia solium* taeniasis coproantigen is an early indicator of treatment failure for taeniasis. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2012;19(4):570-3.
47. Jeri C, Gilman RH, Lescano AG, Mayta H, Ramirez ME, Gonzalez AE, et al. Species identification after treatment for human taeniasis. *Lancet*. 2004;363(9413):949-50.
48. Smyth JD, Smyth MM. Self insemination in *Echinococcus granulosus* in vivo. *Journal of helminthology*. 1969;43(3):383-7.
49. Garcia HH, Gilman RH, Gonzalez AE, Verastegui M, Rodriguez S, Gavidia C, et al. Hyperendemic human and porcine *Taenia solium* infection in Peru. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2003;68(3):268-75.
50. Watts NS, Pajuelo M, Clark T, Loader MC, Verastegui MR, Sterling C, et al. *Taenia solium* infection in Peru: a collaboration between Peace Corps Volunteers and researchers in a community based study. *PloS one*. 2014;9(12):e113239.
51. Allan JC, Avila G, Garcia Noval J, Flisser A, Craig PS. Immunodiagnosis of taeniasis by coproantigen detection. *Parasitology*. 1990;101 Pt 3:473-7.
52. Allan JC, Velasquez-Tohom M, Torres-Alvarez R, Yurrita P, Garcia-Noval J. Field trial of the coproantigen-based diagnosis of *Taenia solium* taeniasis by

- enzyme-linked immunosorbent assay. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1996;54(4):352-6.
53. Garcia HH, Gilman RH, Gonzales AE, Verastegui M, Cysticercosis Working Group in P. Epidemiology of *Taenia solium* Infection in Peru. In: Garcia HH, Martinez M, editors. *Taenia solium* Taeniasis/Cysticercosis. Second. Lima, Peru: Editorial Universo; 1999. p. 297-305.
54. Lescano AG, Garcia HH, Gilman RH, Guezala MC, Tsang VC, Gavidia CM, et al. Swine cysticercosis hotspots surrounding *Taenia solium* tapeworm carriers. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2007;76(2):376-83.
55. Charlesworth B, Morgan MT, Charlesworth D. The effect of deleterious mutations on neutral molecular variation. *Genetics*. 1993;134(4):1289-303.
56. Vega R, Pinero D, Ramanankandrasana B, Dumas M, Bouteille B, Fleury A, et al. Population genetic structure of *Taenia solium* from Madagascar and Mexico: implications for clinical profile diversity and immunological technology. *International journal for parasitology*. 2003;33(13):1479-85.
57. Barker GC. Microsatellite DNA: a tool for population genetic analysis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2002;96 Suppl 1:S21-4.
58. Toth G, Gaspari Z, Jurka J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome research*. 2000;10(7):967-81.
59. Schlotterer C, Tautz D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic acids research*. 1992;20(2):211-5.

60. Schlotterer C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*. 2000;109(6):365-71.
61. Gur-Arie R, Cohen CJ, Eitan Y, Shelef L, Hallerman EM, Kashi Y. Simple sequence repeats in *Escherichia coli*: abundance, distribution, composition, and polymorphism. *Genome research*. 2000;10(1):62-71.
62. Ellegren H. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends in genetics : TIG*. 2000;16(12):551-8.
63. Oliveira RP, Broude NE, Macedo AM, Cantor CR, Smith CL, Pena SD. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(7):3776-80.
64. Rodriguez N, De Lima H, Rodriguez A, Brewster S, Barker DC. Genomic DNA repeat from *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Venezuelan strain) containing simple repeats and microsatellites. *Parasitology*. 1997;115 (Pt 4)(Pt 4):349-58.
65. Manrique P, Hoshi M, Fasabi M, Nolasco O, Yori P, Calderon M, et al. Assessment of an automated capillary system for *Plasmodium vivax* microsatellite genotyping. *Malar J*. 2015;14:326.
66. Valot B, Knapp J, Umhang G, Grenouillet F, Millon L. Genomic characterization of EmsB microsatellite loci in *Echinococcus multilocularis*. *Infect Genet Evol*. 2015;32:338-41.
67. Lo E, Hemming-Schroeder E, Yewhalaw D, Nguyen J, Kebede E, Zemene E, et al. Transmission dynamics of co-endemic *Plasmodium vivax* and *P.*

- falciparum* in Ethiopia and prevalence of antimalarial resistant genotypes. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(7):e0005806.
68. Lynch CA, Pearce R, Pota H, Egwang C, Egwang T, Bhasin A, et al. Travel and the emergence of high-level drug resistance in *Plasmodium falciparum* in southwest Uganda: results from a population-based study. Malar J. 2017;16(1):150.
69. Imwong M, Suwannasin K, Kunasol C, Sutawong K, Mayxay M, Rekol H, et al. The spread of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in the Greater Mekong subregion: a molecular epidemiology observational study. The Lancet Infectious diseases. 2017;17(5):491-7.
70. Chenet SM, Silva-Flannery L, Lucchi NW, Dragan L, Dirlikov E, Mace K, et al. Molecular Characterization of a Cluster of Imported Malaria Cases in Puerto Rico. Am J Trop Med Hyg. 2017.
71. Pava Z, Noviyanti R, Handayuni I, Trimarsanto H, Trianty L, Burdam FH, et al. Genetic micro-epidemiology of malaria in Papua Indonesia: Extensive *P. vivax* diversity and a distinct subpopulation of asymptomatic *P. falciparum* infections. PLoS One. 2017;12(5):e0177445.
72. Cohee LM, Kalilani-Phiri L, Mawindo P, Joshi S, Adams M, Kenefic L, et al. Parasite dynamics in the peripheral blood and the placenta during pregnancy-associated malaria infection. Malar J. 2016;15(1):483.
73. Moendeg KJ, Angeles JMM, Nakao R, Leonardo LR, Fontanilla IKC, Goto Y, et al. Geographic strain differentiation of *Schistosoma japonicum* in the Philippines using microsatellite markers. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(7):e0005749.

74. Knapp J, Bart JM, Glowatzki ML, Ito A, Gerard S, Maillard S, et al. Assessment of use of microsatellite polymorphism analysis for improving spatial distribution tracking of *Echinococcus multilocularis*. *J Clin Microbiol.* 2007;45(9):2943-50.
75. Knapp J, Guislain MH, Bart JM, Raoul F, Gottstein B, Giraudoux P, et al. Genetic diversity of *Echinococcus multilocularis* on a local scale. *Infect Genet Evol.* 2008;8(3):367-73.
76. Casulli A, Bart JM, Knapp J, La Rosa G, Dusher G, Gottstein B, et al. Multi-locus microsatellite analysis supports the hypothesis of an autochthonous focus of *Echinococcus multilocularis* in northern Italy. *Int J Parasitol.* 2009;39(7):837-42.
77. Maillard S, Benchikh-Elfegoun MC, Kohil K, Gottstein B, Piarroux R. Failure to observe cross-fertilization between the *Echinococcus granulosus* G1 and G6 strains after an experimental mixed infection of the definitive host. *Vet Parasitol.* 2011;175(1-2):80-3.
78. Knapp J, Staebler S, Bart JM, Stien A, Yoccoz NG, Drogemuller C, et al. *Echinococcus multilocularis* in Svalbard, Norway: microsatellite genotyping to investigate the origin of a highly focal contamination. *Infect Genet Evol.* 2012;12(6):1270-4.
79. Umhang G, Karamon J, Hormaz V, Knapp J, Cencek T, Boue F. A step forward in the understanding of the presence and expansion of *Echinococcus multilocularis* in Eastern Europe using microsatellite EmsB genotyping in Poland. *Infect Genet Evol.* 2017;54:176-82.

80. Sprehn CG, Blum MJ, Quinn TP, Heins DC. Landscape genetics of *Schistocephalus solidus* parasites in threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) from Alaska. PLoS One. 2015;10(4):e0122307.
81. Luscher A, Milinski M. Simultaneous hermaphrodites reproducing in pairs self-fertilize some of their eggs: an experimental test of predictions of mixed-mating and Hermaphrodite's Dilemma theory. Journal of evolutionary biology. 2003;16(5):1030-7.
82. Verastegui M, Gilman RH, Gonzales A, Garcia HH, Gavidia C, Falcon N, et al. *Taenia solium* oncosphere antigens induce immunity in pigs against experimental cysticercosis. Vet Parasitol. 2002;108(1):49-62.
83. Tsang VC, Brand JA, Boyer AE. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). The Journal of infectious diseases. 1989;159(1):50-9.
84. Deckers N, Kanobana K, Silva M, Gonzalez AE, Garcia HH, Gilman RH, et al. Serological responses in porcine cysticercosis: a link with the parasitological outcome of infection. International journal for parasitology. 2008;38(10):1191-8.
85. Dean DA, Wadl PA, Hadziabdic D, Wang X, Trigiano RN. Analyzing microsatellites using the QIAxcel system. Methods in molecular biology (Clifton, NJ). 2013;1006:223-43.
86. Gonzalez AE, Cama V, Gilman RH, Tsang VC, Pilcher JB, Chavera A, et al. Prevalence and comparison of serologic assays, necropsy, and tongue examination for the diagnosis of porcine cysticercosis in Peru. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1990;43(2):194-9.

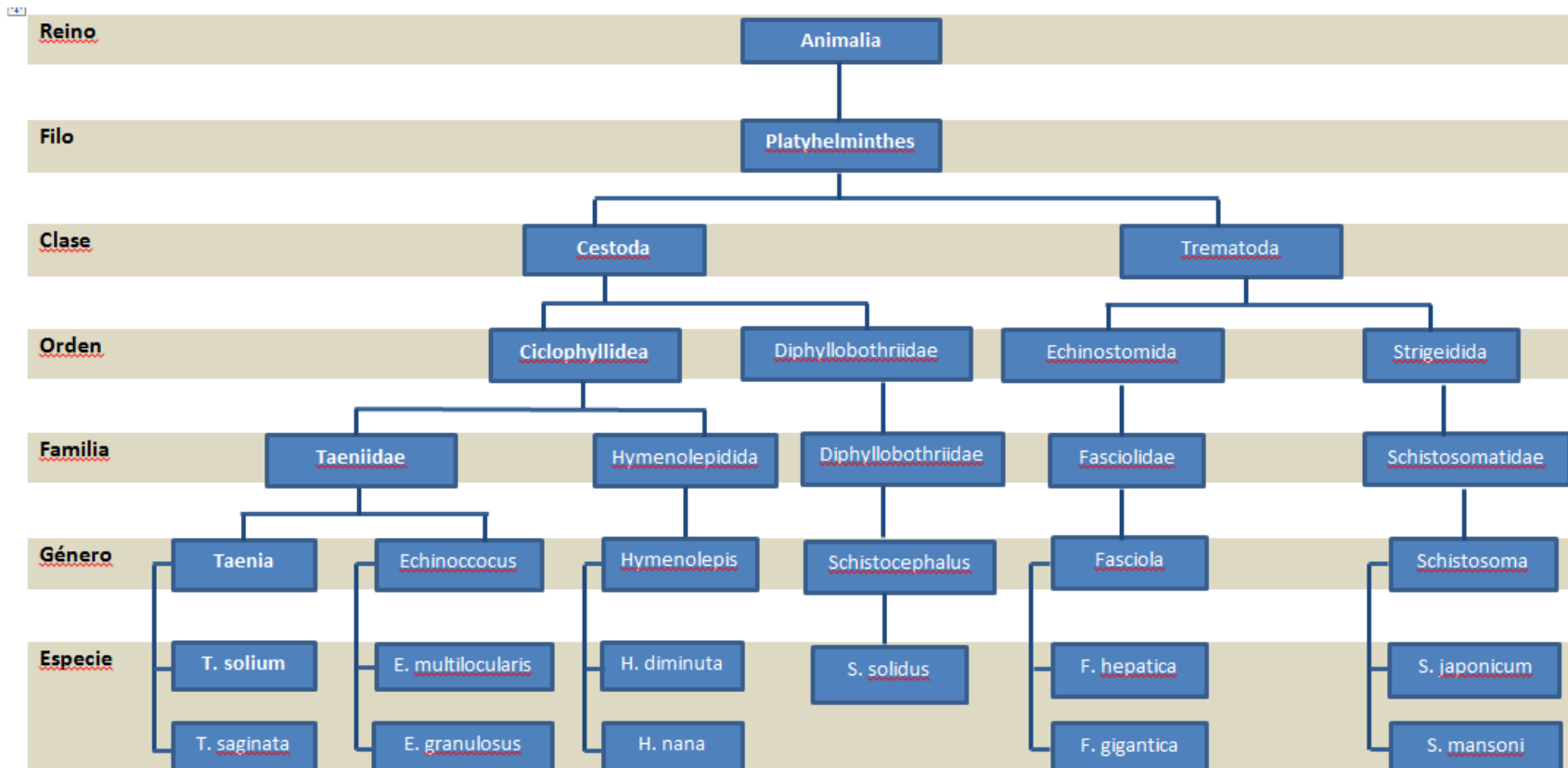
87. Weir B. Genetic Data Analysis: Methods for Discrete Population Genetic Data. Second edition: Sinauer Associates Incorporated; 1996.
88. Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1973;70(12):3321-3.
89. Nei M, Tajima F, Tateno Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. Journal of molecular evolution. 1983;19(2):153-70.
90. Dell RB, Holleran S, Ramakrishnan R. Sample Size Determination. ILAR Journal. 2002;43(4):207-13.
91. Hale ML, Burg TM, Steeves TE. Sampling for microsatellite-based population genetic studies: 25 to 30 individuals per population is enough to accurately estimate allele frequencies. PLoS One. 2012;7(9):e45170.
92. Whittaker JC, Harbord RM, Boxall N, Mackay I, Dawson G, Sibly RM. Likelihood-based estimation of microsatellite mutation rates. Genetics. 2003;164(2):781-7.
93. Speijer H, Savelkoul PH, Bonten MJ, Stobberingh EE, Tjhi JH. Application of different genotyping methods for *Pseudomonas aeruginosa* in a setting of endemicity in an intensive care unit. Journal of clinical microbiology. 1999;37(11):3654-61.
94. Wassenaar TM, Newell DG. Genotyping of *Campylobacter spp.* Applied and Environmental Microbiology. 2000;66(1):1-9.
95. Sciutto E, Fragoso G, Fleury A, Lacleste JP, Sotelo J, Aluja A, et al. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in

- developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2000;2(15):1875-90.
96. Pray IW, Swanson DJ, Ayvar V, Muro C, Moyano LM, Gonzalez AE, et al. GPS Tracking of Free-Ranging Pigs to Evaluate Ring Strategies for the Control of Cysticercosis/Taeniasis in Peru. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(4):e0004591.
97. Thomas LF, de Glanville WA, Cook EA, Fevre EM. The spatial ecology of free-ranging domestic pigs (*Sus scrofa*) in western Kenya. *BMC veterinary research*. 2013;9:46.
98. de Aluja AS, Villalobos AN, Plancarte A, Rodarte LF, Hernandez M, Zamora C, et al. *Taenia solium* cysticercosis: immunity in pigs induced by primary infection. *Vet Parasitol*. 1999;81(2):129-35.
99. Robinson DP, Klein SL. Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis. *Hormones and behavior*. 2012;62(3):263-71.

Anexos

Anexo 1

Clasificación taxonómica de *T. solium* y su relación con otros parásitos de interés en la salud humana y animal



Anexo 3

Resultados de la genotipificación de cisticercos por el sistema de electroforesis capilar (QIAxcel) – Infección experimental

La mayoría de los cisticercos obtenidos de la infección artificial: 80/87 (91.9%) para los cisticercos de la Tenia A y 65/70 (92.2%) para los cisticercos de la Tenia B, tuvieron tamaño similar ($\pm 3\text{pb}$) a las tenias parentales; (Tabla 10 y Tabla 11). Un porcentaje menor de los cisticercos tuvieron marcadores con tamaños de banda que diferían en 6 o más pares de bases respecto a la Taenia parental (Tabla 10 en rojo).

Tabla 10. Resultados de los tamaños de banda usando el Sistema de EC, QIAxcel en una muestra de cisticercos

Muestra	Cisticercos	SSR09	SSR27	SSR28	SSR32	
Proglótido Tenia A	Tenia A	175	170	223	180	
	Cerdo 1	8	172	170	226	180
		10	172	170	223	180
		18	175	170	226	180
		22	172	170	226	180
		26	172	170	223	180
		27	175	170	233	186
		28	175	170	226	180
	Cerdo 3	35	175	173	229	180
		40	175	170	235	180
		45	175	170	226	180
		47	175	173	226	180
		54	175	170	226	180
	Cerdo 2	178	175	173	229	180
		179	175	173	226	180
		185	175	173	223	180
		189	175	173	229	186
		190	175	173	232	186
		195	175	173	223	189

	Cisticerco	SSR09	SSR27	SSR28	SSR32	
Proglótido Tenia B	Tenia B	163	155	220	180	
	Cerdo 4	75	163	155	220	180
		78	163	155	220	180
		79	163	155	220	180
		82	166	158	226	186
		83*	166	158	226	186
		85	166	158	223	180
		88	163	155	220	180
		90	163	155	220	180
		95	166	158	223	186
	Cerdo 5	114	163	155	220	180
		116	163	155	220	180
		118	163	155	220	180
		121	166	155	223	180
		122	166	155	223	180
	Cerdo 6	128	166	172	223	180
		129	166	158	223	180
		138	166	158	223	180
		145	163	158	220	180
		152*	166	158	226	186

* Los marcadores microsátélites de los cisticercos 83 y 152 no pudieron ser secuenciados debido a la poca cantidad de ADN extraído

Tabla 11. Resumen de los resultados de la genotipificación de los cisticercos, utilizando el equipo de Electroforesis Capilar (QIAXcel)

Tenia A (87 cisticercos)	Nro cisticercos (%)	
Exactamente el mismo tamaño de banda	13	(15%)
Difieren en ± 3 pb en uno o más marcadores	67	(76%)
Difieren en ≥ 6 pb en uno o más marcadores	7	(9%)
Tenia B (70 cisticercos)	Nro cisticercos (%)	
Exactamente el mismo tamaño de banda	28	(40%)
Difieren en 1 ± 3 pb en uno o más marcadores	36	(51%)
Difieren en ≥ 6 pb en uno o más marcadores	6	(9%)

Anexo 4

Resultados de la genotipificación de cisticercos por el sistema de electroforesis capilar (EC) QIAxcel – Infección natural

Cerdo	Número de cisticercos	TS_SSR09 (pb)	TS_SSR27 (pb)	TS_SSR28 (pb)	TS_SSR32 (pb)	Frecuencia genotípica
P1 (n=30)	16	163	158	214	180	55.2%
	3	166	161	217	180	10.3%
	2	163	158	211	180	6.9%
	2	163	161	214	180	6.9%
	2	166	161	214	180	6.9%
	1	163	158	217	180	3.4%
	1	163	164	214	180	3.4%
	1	166	164	220	180	3.4%
	1	169	164	217	180	
	1	163	--	214	180	
P2 (n=30)	10	163	158	214	183	37.0%
	9	163	158	214	180	33.3%
	2	166	161	217	183	7.4%
	1	163	158	214	186	3.7%
	1	163	158	214	189	3.7%
	1	163	161	214	180	3.7%
	1	163	161	217	189	3.7%
	1	163	161	214	183	3.7%
	1	166	161	220	186	3.7%
	2	163	158	--	180	
	1	163	158	214	--	
P3 (n=30)	13	163	158	214	180	43.3%
	7	163	158	214	183	23.3%
	1	160	158	211	180	3.3%
	1	163	161	214	180	3.3%
	1	163	161	214	189	3.3%
	1	163	161	217	180	3.3%
	1	163	173	214	180	3.3%
	1	166	158	214	180	3.3%
	1	166	161	217	183	3.3%
	1	166	161	217	186	3.3%
	1	166	161	220	186	3.3%
	1	166	164	220	180	3.3%

Cerdo	Número de cisticercos	TS_SSR09 (pb)	TS_SSR27 (pb)	TS_SSR28 (pb)	TS_SSR32 (pb)	Frecuencia genotípica
P4 (n=32)	17	166	158	220	180	53.1%
	3	163	158	214	180	9.4%
	3	166	158	217	180	9.4%
	2	169	161	220	180	6.3%
	1	163	158	217	180	3.1%
	1	163	158	220	180	3.1%
	1	166	158	220	183	3.1%
	1	166	161	217	180	3.1%
	1	166	161	220	189	3.1%
	1	169	161	222	180	3.1%
	1	169	161	224	180	3.1%
P5 (n=25)	8	163	158	214	180	34.8%
	3	160	158	214	180	13.0%
	2	166	161	217	186	8.7%
	2	160	158	214	186	8.7%
	2	163	158	214	183	8.7%
	1	160	158	214	183	4.3%
	1	163	158	208	180	4.3%
	1	160	158	211	180	4.3%
	1	166	161	214	186	4.3%
	1	166	161	217	180	4.3%
	1	166	161	217	183	4.3%
	1	160	158	214	--	
P6 (n=24)	4	166	158	220	180	18.2%
	3	163	158	214	183	13.6%
	2	166	158	217	180	9.1%
	2	166	158	217	183	9.1%
	2	166	158	220	183	9.1%
	1	163	158	214	180	4.5%
	1	163	161	214	189	4.5%
	1	166	158	214	183	4.5%
	1	166	161	214	183	4.5%
	1	166	161	217	186	4.5%
	1	166	161	217	183	4.5%
	1	166	161	220	183	4.5%
	1	166	161	220	186	4.5%
	1	169	161	220	189	4.5%
1	166	--	217	183		
1	166	--	217	180		

Cerdo	Número de cisticercos	TS_SSR09 (pb)	TS_SSR27 (pb)	TS_SSR28 (pb)	TS_SSR32 (pb)	Frecuencia genotípica
P7 (n=29)	6	166	161	214	180	22.2%
	4	166	161	214	183	14.8%
	2	166	161	217	180	7.4%
	3	166	161	220	180	11.1%
	3	169	164	217	183	11.1%
	1	163	161	214	180	3.7%
	1	163	161	217	180	3.7%
	1	163	161	217	183	3.7%
	1	163	161	220	186	3.7%
	1	166	161	220	183	3.7%
	1	166	164	214	183	3.7%
	1	169	164	214	180	3.7%
	1	169	164	220	186	3.7%
	1	169	164	220	192	3.7%
	1	166	161	--	180	
	1	169	164	217	--	
	1	166	161	214	--	
P8 (n=30)	6	166	158	217	180	20.0%
	4	166	158	223	180	13.3%
	4	166	161	217	180	13.3%
	3	163	158	217	180	10.0%
	3	163	161	223	180	10.0%
	2	163	158	223	180	6.7%
	2	166	158	220	180	6.7%
	2	166	161	220	183	6.7%
	2	166	161	223	180	6.7%
	1	166	161	220	180	3.3%
	1	166	161	223	182	3.3%

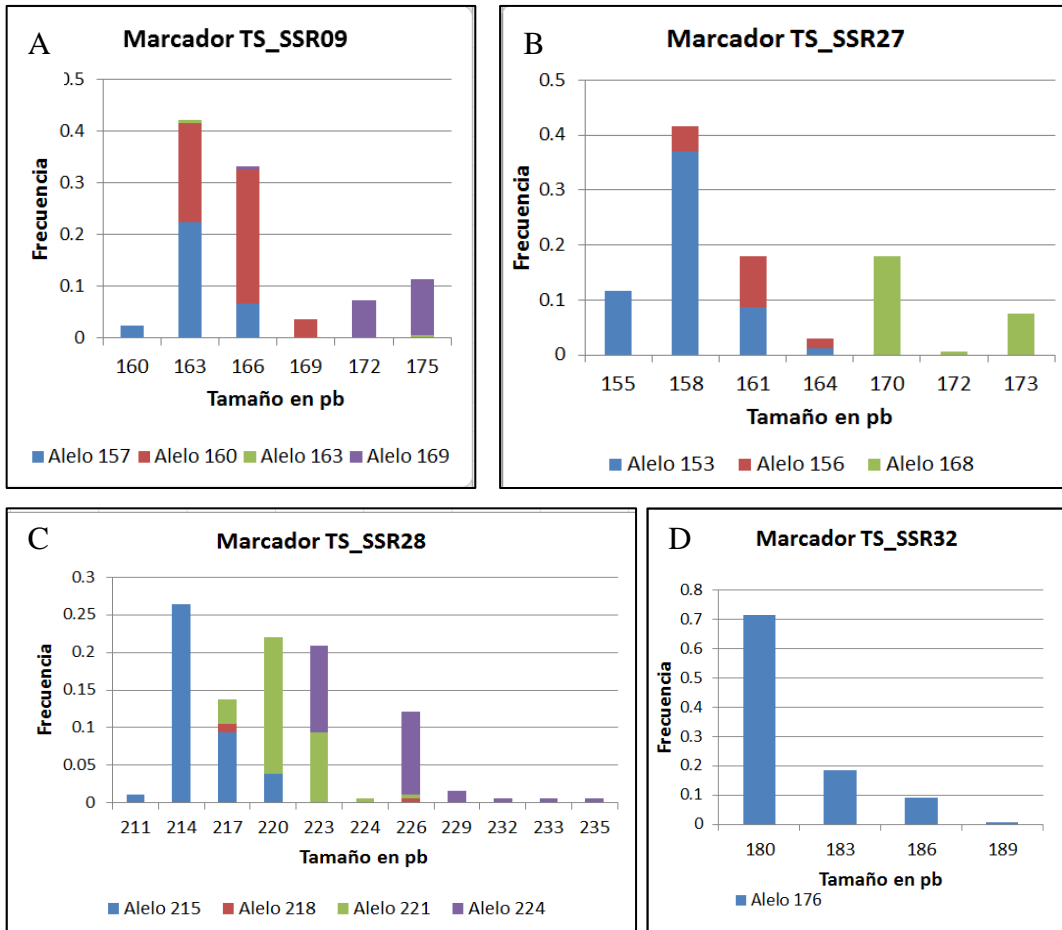
-- No amplificó

Anexo 5

Comparación de resultados de tamaño de secuencia de los marcadores, según el sistema de electroforesis capilar (EC) y según secuenciamiento de una muestra en una muestra de 15 cisticercos

Cisticercos	SSR09		SSR27		SSR28		SSR32	
	EC	Secuenc	EC	Secuenc.	EC	Secuenc.	EC	Secuenc.
1	172	169	170	168	223	224	180	176
2	172	169	170	168	223	224	180	176
3	163	160	155	153	220	221	180	176
4	166	160	158	153	223	221	180	176
5	163	160	155	153	220	221	180	176
6	166	160	158	153	223	221	186	176
7	175	169	170	168	223	224	180	176
8	163	163	155	153	220	221	180	176
9	163	160	158	156	217	215	180	176
10	166	160	158	156	217	215	180	176
11	163	160	158	156	223	221	180	176
12	166	160	158	156	217	215	180	176
13	166	160	161	156	223	221	180	176
14	166	160	161	156	220	215	183	176
15	166	160	161	156	220	215	183	176

Distribución de los alelos obtenidos por el Sistema de Electroforesis Capilar para el marcador TS_SSR09 (A), TS_SSR27 (B), TS_SSR28 (C), TS_SSR32 (D)



Frecuencias en base a un total de 214 muestras evaluadas. Se muestran las frecuencias de los diferentes tamaños de productos en pb obtenidos por EC. Los alelos ‘verdaderos’ se identificaron por secuenciamiento.