ARTÍCULO ORIGINAL

Determinación por medio de marcadores moleculares SSCP y RAPD de la diversidad genética en la especie Taenia solium en Colombia

MARCELA FERNÁNDEZ*,**, AMALIA MUÑOZ* y MAURICIO CORREDOR*,***

DETERMINATION BY SSCP AND RAPD OF GENETIC DIVERSITY
IN *Taenia solium* ESPECIES, MAIN CAUSATIVE AGENT OF TENIOSIS
AND CYSTICERCOSIS IN COLOMBIA

SSCP and RAPD techniques were performed in order to detect the genetic variability of Taenia solium cestode, using both mitochondrial and nuclear DNA fragments. The DNA was extracted from eight different cysts isolated of pigs originated from three distant Colombian provinces: Antioquia, Nariño and Sucre. Gene fragments corresponding to NADH dehydrogenase 1 (ND1) and cytochrome oxidase c subunit I (COI) were amplified by PCR using total DNA from individual cysts and later run on non denaturing SSCP acrylamide gels. Three different patterns were obtained by SSCP for both genes indicating that ND1 and COI mitochondrial genes are polymorphic in Colombian T. solium species. COI patterns were more polymorphic, related to the geographical origin. Furthermore, RAPD decameric primers showed a nuclear polymorphic DNA, that corroborates the genetic diversity between this isolates.

Key words: *Taenia solium*, genetic diversity, cytochrome oxidase c subunit I, NADH deshydrogenase 1, PCR, SSCP, RAPD.

INTRODUCCIÓN

Teniosis y cisticercosis son dos tipos de enfermedades que causa el gusano plano *Taenia solium*. Teniosis es causada por el adulto, mientras que la cisticercosis y su presentación clínica más frecuente, la neurocisticercosis (NCC), es causada por el estadio larval denominado metacestodo o cisticerco¹. La

cisticercosis es endémica en países latino-americanos continentales², donde Colombia permanece como un país con alta frecuencia y con una prevalencia de hasta el 0,7% para NCC³.

En el género *Taenia*, las variaciones genéticas han sido usadas para distinguir unas especies de otras, pudiéndose inferir la relación filogenética entre las especies⁴⁻⁸. Sin embargo, es muy poco lo que se sabe acerca de la variación genética

* Unidad de Genética y Bioquímica de Microorganismos de la Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín.

** Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

*** Dirección actual: Institute for Research in Immunology and Cancer, Pavillon Marcelle-Coutu. 2950, chemin de Polytechnique, Université de Montréal, Canada.

e-mail: m.corredor-rodriguez@umontreal.ca

dentro de la especie *T. solium*, hecho que es potencialmente importante para el entendimiento de las interacciones huésped-parásito, para evaluar la efectividad de varios tratamientos, para el desarrollo de métodos diagnósticos y de vacunas, y para la interpretación epidemiológica de teniasis y cisticercosis^{9,10}.

El empleo del gen COI ha sido muy utilizado para la caracterización de diferentes grupos de poblaciones de *T. solium* del mundo¹¹. Recientemente, se realizó la genotipificación de especies del género *Taenia* por medio de polimorfismo en la conformación de hebras sencillas, SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*), empleando los genes COI y ND1¹². El análisis SSCP permitió la delimitación entre ocho especies de *Taenia* de diferentes huéspedes, basándose en patrones característicos y permitiendo incluso la detección de variabilidad intra-especie entre algunos taxa.

En *Echinococcus*, uno de los géneros de la familia Taeniidae, agente etiológico de la hidatidosis, se han logrado identificar 9 genotipos mediante la secuenciación de los genes mitocondriales COI y ND1¹³⁻¹⁶ y se ha demostrado su correlación con la técnica SSCP¹⁷, la cual ha permitido además genotipificar muestras de acuerdo al análisis de los mismos genes en quistes aislados en diferentes huéspedes intermediarios, provenientes de áreas geográficas distintas¹⁸.

Por su parte, la técnica de RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*, polimorfismo del ADN amplificado al azar) se ha empleado en la identificación de polimorfismo en el ADN de tres clases de helmintos: céstodos, nemátodos y tremátodos¹⁹, siendo empleada además para la detección de la variación genética en *T. solium*⁹ y ha sido aplicada en el género *Echinococcus* demostrado su utilidad para discriminar entre especies y cepas de este parásito²⁰.

En el presente estudio se evalúa la utilidad de las técnicas SSCP y RAPD como marcadores moleculares de *T. solium* en Colombia, a fin de evidenciar la variabilidad genética entre aislados de cisticercos extraídos de cerdos, provenientes de tres regiones distantes del país. La técnica SSCP se empleó en la comparación de los genes COI y ND1 amplificados por PCR, y se probó la utilidad de 6 oligonucleótidos decaméricos en la identificación de variabilidad entre las mismas muestras por RAPD.

MATERIAL Y MÉTODOS

1). **Obtención de cisticercos:** Ocho diferentes cisticercos de *T. solium* provenientes de tres regiones geográficas de Colombia fueron aislados a partir de cerdos así: aislamientos 298, 699, 800 de Nariño; 300, 398 y 498 de Sucre; 698 y 798 de Antioquia. Los cisticercos fueron lavados varias veces con tampón fosfato salino (PBS) y conservados a -70°C hasta su utilización.

2). **Extracción de ADN:** Cisticercos de *T. solium* fueron sumergidos individualmente en nitrógeno líquido y posteriormente macerados hasta ser convertidos en un polvo fino que se recolectó en tubos eppendorf de 1,5 ml. Cada macerado fue tratado con tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 50 mM, pH 8,0; SDS 0,5%) y proteinasa K 20 mg/μl (Invitrogen, Alemania), se llevó a cabo la incubación de las muestras durante 1 hora a 60 °C, se hizo tratamiento con Ribonucleasa A (SIGMA, USA), durante 1 hora a 37 °C. La extracción de ADN se efectuó con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24: 1), y la precipitación del ADN con etanol absoluto y acetato de amonio 3M. Las muestras de ADN obtenidas, fueron resuspendidas en tampón TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) y almacenadas a una temperatura de -20 °C. Se hizo la extracción de ADN a partir de muestras de sangre periférica de cerdo y humano sin cisticercosis, que fueron usadas como control^{21,22}.

3). **Amplificación de regiones:** Las regiones de los genes de ADN mitocondrial fueron amplificadas por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Un fragmento de 525 pb del gen ND1 fue amplificado empleando los cebadores JB11 y JB12 descritos anteriormente²³. La amplificación de aproximadamente 460 pb de la secuencia COI fue llevada a cabo empleando los cebadores JB3 y JB4.5 descritos previamente²⁴. Tabla 1.

Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un termociclador MJ Research - PTC 100, en un volumen final de reacción de 50 μl, usando entre 10 - 50 ng de ADN extraído de cisticercos de *T. solium*, y de sangre periférica de cerdo y humano, como control. La amplificación de las secuencias fue desarrollada en tampón de PCR 1X, con MgCl₂ 1,5 mM, por cada dATP, dGTP, dCTP, y dTTP 0,2 mM, por cada cebador 0,2 mM, y de *Taq* polimerasa 2,5 U (Invitrogen). Se emplearon las siguientes

Tabla 1. Lista de oligonucleótidos utilizados en este estudio

Técnica y gen	Oligo	Secuencia	T° de alineamiento	Otros autores
SSCP COI	JB3	5' -TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT- 3'	57°C	Citado ²³
	JB4.5	5' -TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG- 3'		
ND1	JB11	5' -AGATTCGTAAGGGGCCTAATA- 3'	57°C	
	JB12	5' -ACCACTAACTAATTCACCTTTC- 3'		
RAPD	OPG11	5' -TGCCCCGTCGT- 3'	33°C	varios
	OPG18	5' -GGCTCATGTG- 3'	34°C	varios
	Ec1	5' -GGGAATTCGG- 3'	35°C	Citado ²⁷
	Oligo 1	5' -GGTGCGGGAA- 3'	34°C	Citado ³²
	Oligo 2	5' -GTTTCGCTCC- 3'	33°C	
	Oligo 3	5' -GTAGACCCGT- 3'	33°C	
	Oligo 4	5' -AAGAGCCCGT- 3'	34°C	
	Oligo 5	5' -AACGCGCAAC- 3'	35°C	
	Oligo 6	5' -CCCGTCAGCA- 3'	33°C	

condiciones: ciclo inicial de denaturación a 94 °C durante 5 min, seguido por 35 ciclos de denaturación a 94 °C durante 30 s, alineamiento a 57 °C durante 30 s y extensión a 72°C durante 1 min, seguidos por un ciclo final de extensión a 72 °C durante 5 min. Se emplearon geles de agarosa 1% teñidos con bromuro de etidio para visualizar los productos de PCR.

4). **Digestión con enzimas de restricción:** Los productos de amplificación de los fragmentos de los genes COI y ND1, fueron digeridos a una temperatura de 37 °C con las enzimas de restricción (Fermentas, Lituania) *AluI*, *RsaI*, *MboI* y *NlaIII* y 65 °C con la enzima *TaiI*, durante tres horas, siguiendo las indicaciones del fabricante. Cada reacción se llevó a cabo con 2 µl de tampón específico para cada enzima, 0,5 µl de enzima, 0,5 µl de agua desionizada y 17 µl de producto de PCR. Los productos de digestión con enzimas de restricción fueron separados en geles de poliacrilamida no denaturantes y visualizados por medio de tinción con plata. Se reliza luego el análisis de la digestión de fragmentos de PCR, PCR-REA (*Restriction Enzyme Analysis*).

5). **Denaturación de fragmentos por SSCP:** Se siguió un protocolo similar a otro descrito previamente²⁵. Un volumen de 15 µl de cada producto de PCR se mezcló con un volumen igual de tampón denaturante (NaOH 10 mM, formamida 95%, azul de bromofenol 0.05% y xileno cianol 0.05%). Posterior a una denaturación a 95 °C durante 8 min, se hizo un choque térmico

de las muestras en hielo, seguido por incubación a -20 °C durante 5 min. Las muestras se analizaron en geles de poliacrilamida no denaturantes preparados en tampón TBE estándar 0,5X, con acrilamida: bis-acrilamida 12%, TEMED 0,035% [v/v], persulfato de amonio 0,07% [p/v], glicerol 5%. La electroforesis se llevó a cabo con 30 µl de cada muestra en tampón de corrido TBE 1X a temperatura ambiente y a 5 W por 15 h. El procedimiento fue seguido por visualización, empleando tinción con plata²⁶. Adicionalmente, se corrió ADN de doble hebra de las secuencias analizadas, como control.

6). **Amplificación aleatoria por RAPD:** Los ensayos fueron llevados a cabo en un termociclador MJ Research PTC 100, en un volumen final de reacción de 25 µl, usando un rango de 10-50 ng de ADN extraído de cisticercos. La amplificación de las secuencias fue desarrollada en buffer de PCR 1X, con MgCl₂ 1,5 mM, por cada dATP, dGTP, dCTP, y dTTP 0,2 mM, por cada cebador 0,2 mM, y de Taq polimerasa 2,5 U (Invitrogen). Los cebadores empleados para el desarrollo de esta técnica fueron: oligo 1, oligo 2, oligo 3, oligo 4, oligo 5, oligo 6, OPG11, OPG18, Ec1, reportado anteriormente²⁷. El ensayo RAPD se desarrolló empleando un ciclo inicial de denaturación a 94 °C durante 5 min, seguido por 35 ciclos de denaturación a 94 °C durante 30 s, alineamiento a 33° C para los oligos 2 y OPG11 y a 35 °C para los oligos 5 y Ec1 durante 30 s y 1 min de

extensión a 72 °C, seguidos por un ciclo final de extensión a 72 °C durante 5 min. Los productos del ensayo RAPD se visualizaron en geles de agarosa 1,3% teñidos con bromuro de etidio.

RESULTADOS

1). **Amplificación de genes ND1 y COI:** La amplificación de fragmentos de exactamente 460 pb y 525 pb de los genes COI y ND1 respectivamente, se llevó a cabo a partir de ADN de 8 aislados de cisticercos de *T. solium* obtenidos en tres departamentos de Colombia: Nariño, Sucre y Antioquia (Figura 2 y 3, carriles 2-9). Adicionalmente, utilizó como control negativo ADN extraído a partir de sangre periférica de cerdos y humanos sin cisticercosis, a partir de los cuales no se obtuvieron productos de amplificación. Para cada gen respectivo, las bandas de amplificación obtenidas corrieron a

un mismo nivel en geles de agarosa, en los cuales no se detecta diferencias en el tamaño de las bandas entre las muestras analizadas (Figura 2A y 3A).

2). **PCR-REA:** A fin de detectar polimorfismo en los fragmentos amplificados COI y ND1 de *T. solium* de ADN de cisticercos procedentes de Nariño, Sucre y Antioquia, se llevó a cabo digestiones con enzimas de restricción tetraméricas *AluI*, *RsaI*, *MboI* y *NlaIII*. No se obtuvieron patrones de restricción diferentes entre los aislamientos analizados. Los resultados de la digestión del fragmento ND1 con la enzima de restricción *RsaI*, así como del fragmento COI con las enzimas *AluI*, *RsaI* y *MboI*, se ilustran en la Figura 1.

3). **Análisis por SSCP:** La técnica fue previamente estandarizada con un patrón conocido, el cual permitió demostrar que en varias corridas con preparación de soluciones y geles en tiempos diferentes, se obtuvo siempre los mismos resultados sin variación alguna del patrón. Los fragmentos de los genes COI y ND1 amplificados por PCR fueron sometidos a denaturación por SSCP, las cuales produjeron configuraciones secundarias al efectuarse una renaturación rápida de hebras sencillas, mostrando patrones de bandeo polimórficos en algunos de los ocho ADNs de los cisticercos amplificados (bandas 2 al 9 en Figuras 2B y 3B), que no aparecen en el control sin denaturar (bandas 1 en Figuras 2B y 3B).

Para el fragmento COI (Figura 2B) el SSCP produjo un total de nueve bandas, de la cuales sólo se muestran las dos superiores que resultaron ser polimórficas (indicadas por flechas). Según el origen de aislamiento, se observó un mismo patrón de bandeo entre dos muestras de Nariño y los tres aislamientos de Sucre (carriles 3-7), detectándose variación en uno de los cisticercos provenientes de Nariño 298 (carril 2). Los dos aislamientos de Antioquia 698 y 798 (carriles 8 y 9) compartieron un mismo patrón, que fue diferente a todos los anteriores. Para el fragmento ND1 (Figura 3B), el SSCP produjo un total de tres bandas, de la cuales dos resultaron ser polimórficas (indicadas por flechas). Según el origen de aislamiento se produjo un mismo patrón de bandeo entre los tres aislamientos de Nariño, dos aislamientos de Sucre y uno de Antioquia (carriles 2-4, 6, 7 y 9). Uno de los aislamientos de Antioquia 698 produjo un patrón similar a los

Figura 1. PCR-REA en geles de acrilamida. Fragmento COI digerido con las enzimas de restricción *MboI* (A), *RsaI* (B) y *AluI* (C) y fragmento ND1 digerido con la enzima *RsaI* (D). Se indican los aislamientos de *T. solium* a partir de los cuales se amplificaron los fragmentos COI y ND1. Muestras: 1- fragmento, sin digerir, 2- N298, 3- N699, 4-S300, 5- A698, 6- A798.

Figura 2. Amplificación por PCR y SSCP de la secuencia COI. A: gel de agarosa 1%, carril 1: marcador de peso molecular; carriles 2-9: productos de amplificación de la secuencia COI a partir de cisticercos de *T. solium*. B: gel acrilamida SSCP, 1-secuencia COI sin denaturar, 2-cisticerco 298 (Nariño), 3-cisticerco 699 (Nariño), 4-cisticerco 800 (Nariño), 5-cisticerco 300 (Sucre), 6-cisticerco 398 (Sucre), 7-cisticerco 498 (Sucre), 8-cisticerco 698 (Antioquia), 9-cisticerco 798 (Antioquia).

Figura 3. Amplificación por PCR y SSCP de la secuencia ND1. A: gel de agarosa 1%, carril 1: marcador de peso molecular; carriles 2-9: productos de amplificación de la secuencia COI a partir de cisticercos de *T. solium*. B: gel acrilamida SSCP, 1-secuencia ND1 sin denaturar, 2-cisticerco 298 (Nariño), 3-cisticerco 699 (Nariño), 4-cisticerco 800 (Nariño), 5-cisticerco 498 (Sucre), 6-cisticerco 300 (Sucre), 7-cisticerco 398 (Sucre), 8-cisticerco 698 (Antioquia), 9-cisticerco 798 (Antioquia).

anteriores, con una banda superior adicional (carril 8) y uno de los aislamientos de Sucre 498 produjo un patrón que fue diferente a todos los anteriores (carril 5).

4). **Análisis por RAPD:** Las amplificaciones aleatorias con los oligonucleótidos decaméricos utilizados en este estudio mostraron un alto grado de polimorfismo. Entre los nueve oligos probados, los oligos 1, 4, 5, 6 y Ec1 (Figura 4). El RAPD por ser una técnica de amplificación aleatoria que no discrimina entre ADN nuclear y

mitocondrial, mostró un polimorfismo más marcado entre los 8 cisticercos aislados en las 3 regiones de Colombia con los oligonucleótidos empleados. Las bandas polimórficas son señaladas con flechas a la derecha. El Oligo 1 muestra a los aislados de Sucre 498 y Antioquia 798 con patrones diferentes a los 6 restantes. El oligo 4 discrimina en dos grupos diferentes: los 5 primeros de Nariño y Sucre (carriles 1-5) y los tres siguientes de Sucre y Antioquia (carriles 6-8). El oligo 5 discrimina las dos muestras de

Figura 4. Patrones de RAPD.

Se observa la amplificación de fragmentos de ADN con los oligo 1 (A), oligo 4 (B), oligo 5 (C), oligo 6 (D) y Ec1 (E). Los números que identifican a los aislamientos de *T. solium* son indicados sobre el primer gel, siendo idéntico para todos los demás así: 1- cisticerco 298 (Nariño), 2- cisticerco 699 (Nariño), 3- cisticerco 800 (Nariño), 4- cisticerco 300 (Sucre), 5- cisticerco 398 (Sucre), 6- cisticerco 498 (Sucre), 7- cisticerco 698 (Antioquia), 8- cisticerco 798 (Antioquia). Las bandas polimórficas encontradas (no amplificadas en todas las muestras) son indicadas con flechas. El tamaño de las bandas del marcador de peso molecular, está indicado.

Antioquia 698 y 798 (carriles 7 y 8) de los restantes, por carencia de una banda. El oligo 6 fue el que produjo mayor polimorfismo, con bandas de alto y bajo peso molecular generando 7 patrones diferentes, siendo solamente idénticos

los aislados de Sucre 300 y 398 (carriles 4 y 5). Finalmente, el oligo Ec1 generó bandas muy claras que discrimina entre las dos aislados de Antioquia 698 y 798 (carriles 7 y 8).

5). Estudio filogenético: A fin de interpretar los

Figura 5. Relación filogenética entre aislamientos colombianos de *T. solium*, establecida por RAPD. Árbol filogenético por UPGMA, originado a partir de la matriz RAPD, las distancias fueron calculadas por *pairwise* entre los 8 aislamientos de *T. solium* de Colombia. En el mapa se observa los tres departamentos involucrados que hacen parte de tres grandes regiones geográficas colombianas: Costa Atlántica y Zona Andina.

resultados obtenidos por RAPD, las bandas polimórficas señaladas con flechas (Figura 4), fueron tabuladas en una matriz binaria, donde 1 equivale a banda presente y 0 equivale a banda ausente. La matriz fue construida con los cinco patrones polimórficos de RAPD, producidos con los 5 diferentes oligonucleótidos usando los 8 aislados de cisticercos (Figura 4). De esta forma se calculó la distancia por *Pairwise* y se construyó un árbol filogenético con el algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) (Figura 5). El árbol revela dos grupos muy ligados genéticamente entre Nariño 298, 699 y Nariño 800, Sucre 300, 398. Las muestras de Antioquia 698, 798 y Sucre 498 divergen del grupo mayoritario, mostrando que por lo menos existen dos o tres acervos genéticos de orígenes diferentes.

DISCUSIÓN

El estudio de la variabilidad dentro de la especie *T. solium*, es potencialmente importante para taxonomía, genética de poblaciones, evolución molecular, para el entendimiento de

las interacciones huésped-parásito, el desarrollo de métodos diagnósticos y de vacunas, y para interpretar la epidemiología de teniasis y cisticercosis^{11,28}. El empleo de genes altamente conservados como los mitocondriales y ribosomales, ha sido una herramienta conveniente para evidenciar variación genética al interior de una especie o entre las especies. En este estudio, se compararon los genes mitocondriales que codifican para las proteínas COI y ND1, así como regiones no codificantes de un fragmento de los espaciadores internos de transcritos (ITS) 1 y 2 del ADN ribosomal, mediante diferentes técnicas de biología molecular.

T. solium, ha sido estudiada genéticamente empleando los genes COI y ND1 por SSCP o usando el genoma total por RAPD. De esta forma se logró determinar su variabilidad genética de aislados procedentes de México, Perú, Brasil^{12,9}. Sin embargo, aunque *T. solium* es endémica desde Argentina hasta México, poblaciones menos estudiadas como las colombianas, han sido incluidas entre varias latinoamericanas en un estudio a nivel mundial¹¹. En este estudio se determina por secuenciamiento del gen COI (no

por SSCP), que las muestras colombianas son idénticas¹¹.

La ausencia de patrones de digestión diferentes en los fragmentos de los genes analizados, entre los aislamientos de *T. solium* de Colombia, nos condujo a la aplicación de la técnica de SSCP, en la cual, las hebras de ADN con secuencias diferentes, no toman la misma conformación y por lo tanto tienen distintas movibilidades en el gel. El SSCP se ha reportado como un método sensible, económico, rápido y adecuado para identificar muestras de ADN que dentro de un grupo difieren en algunas bases nucleotídicas dentro de la secuencia, evitando la secuenciación de gran cantidad de muestras. La sensibilidad de la técnica es generalmente, inversamente proporcional al tamaño del fragmento que se analiza. Por ejemplo, las diferencias en un solo par de bases tienen una resolución del 99% cuando los fragmentos de ADN tienen tamaños entre 100 y 300 pb, y mayor del 80% para fragmentos de 400 pb²⁹. Sin embargo, fragmentos de 775 pb pueden ser analizados exitosamente³⁰.

Los 8 fragmentos COI con idéntico peso molecular, correspondientes a los 8 aislamientos de *T. solium* en Colombia, produjeron 3 diferentes patrones mediante la técnica de SSCP, la cual fue lo suficientemente sensible para detectar el cambios, de una forma reproducible de por lo menos un nucleótido en los dos aislamientos de Antioquia, y 298 de Nariño. Empleando esta misma técnica, se obtuvo anteriormente patrones diferentes en los genes COI y ND1 entre especies del género *Taenia*, y se reportó un patrón muy similar entre los aislamientos de la especie *T. solium*¹². Sin embargo, las muestras analizadas en este trabajo, correspondientes a aislamientos procedentes de India y México, mostraron diferencias entre sí, confirmando la utilidad de la técnica para detectar variación dentro de una misma especie¹².

En nuestra investigación, las poblaciones de *T. solium* colombianas se muestran más diversas que lo reportado previamente¹¹. En ese trabajo previo se utilizan además muestras de India, China, Perú y México, y algunas colombianas las cuales son solamente una parte del acervo genético de todas las poblaciones colombianas. En el mencionado estudio se hizo un análisis de la variabilidad genética de *T. solium* utilizando la secuenciación del gen COI y la región

intergénica ITS1, obteniendo para 11 aislamientos de cisticercos provenientes de diferentes localizaciones geográficas de Perú, una secuencia idéntica para el gen COI, pero encuentra variación en 4 posiciones nucleotídicas al comparar esta secuencia con la de cisticercos de Colombia, las cuales presentaron además cambio de un aminoácido (valina para Perú e isoleucina para Colombia)¹¹. En nuestros ensayos de SSCP con el gen COI, se evidencian tres patrones diferentes para las ocho muestras de tres departamentos del país, demostrando muy probablemente, más cambios nucleotídicos que los reportados anteriormente¹¹. Las diferencias de patrón por SSCP revelan como mínimo un nucleótido de diferencia²⁴, agrupando la mayoría de los aislamientos de Nariño y Sucre es un mismo patrón. Un segundo grupo lo conforma los aislamientos de Antioquia y un tercero conformado por el aislamiento de Nariño 298 que tiene posiblemente nucleótidos diferentes con respecto a los dos grupos anteriores.

Los estudios previos realizados con el gen ND1 han permitido encontrar variabilidad genética al interior de la especie *T. solium*¹². Adicionalmente, el mismo estudio tuvo como objetivo genotipificar el género *Taenia* por SSCP, empleando cinco muestras de la especie *T. solium*, el cual determinó dos patrones diferentes entre dos muestras de India y dos patrones diferentes entre tres muestras de México¹². En nuestro caso encontramos tres patrones diferentes entre las ocho muestras colombianas, corroborando que SSCP evidencia variabilidad nucleotídica del gen ND1 en las poblaciones colombianas. De otra parte en el mismo estudio mencionado¹², los autores utilizan además, el gen COI y encuentran patrones diferentes entre los mismos aislados utilizados, sin una correspondencia evidente entre ambos genes. En nuestro estudio también encontramos el mismo resultado: la agrupación por patrones (*clusters*) de los aislamientos para el gen COI, no corresponden a la misma agrupación de patrones de los mismos aislamientos para el gen ND1. Sin embargo, con este último gen, un aislamiento de Antioquia se diferencia del resto.

Teniendo en cuenta la posición geográfica de las tres regiones analizadas, los patrones obtenidos por RAPD y SSCP del departamento de Antioquia difirieron siempre, mostrando que las poblaciones de esta región son disímiles a las

de Nariño y Sucre. Por el contrario las poblaciones de estos últimos departamentos ubicados en regiones opuestas y distantes del país no muestran una diferencia significativa entre ellas.

En la técnica de RAPD, los oligonucleótidos decaméricos tienen la capacidad de unirse al genoma de un organismo, bajo condiciones apropiadas, a un número de secuencias de ADN complementarias, de forma total o parcial³¹. El ADN genómico de dos individuos distintos, frecuentemente produce patrones de amplificación diferentes. En nuestro caso por RAPD, se pudo constatar la presencia de variación entre los aislamientos de *T. solium* analizados, procedentes de tres departamentos de Colombia, principalmente en aquellos procedentes de Antioquia. En estos ensayos, 6 de los 9 oligonucleótidos decaméricos utilizados, fueron informativos al respecto. El análisis por UPGMA muestra las poblaciones de Sucre bastante diversas, así como las poblaciones de Nariño y Antioquia, aparecerían como las más distantes entre las tres. Las poblaciones de Sucre se mezclarían a los tres aparentes agrupamientos

En conclusión, este trabajo logró demostrar una variabilidad genética importante en *T. solium* colombiana, tanto con el uso de SSCP de genes COI y ND1, altamente conservados, como con oligonucleótidos decaméricos, los que permitieron establecer una cantidad importante de mutaciones entre los dos o tres subgrupos de poblaciones. El secuenciamiento de estos genes y un análisis más profundo será emprendido.

RESUMEN

Utilizando las técnicas moleculares de SSCP y RAPD se pudo evidenciar rápida y claramente la variabilidad genética en Colombia de larvas del céstodo *Taenia solium* analizando fragmentos de genes de ADN mitocondrial y fragmentos aleatorios de ADN nuclear. El ADN estudiado se obtuvo de ocho aislados de cisticercos de cerdo provenientes de tres departamentos de Colombia: Antioquia, Nariño y Sucre. Los fragmentos obtenidos por PCR de los genes NADH deshidrogenasa 1 (ND1) y citocromo oxidasa c subunidad I (COI) al ser denaturados y analizados en geles no denaturantes de acrilamida, mostraron al menos tres patrones diferentes por cada gen analizado, verificando

que estos genes conservados mitocondriales son polimórficos en *T. solium* colombiana. Por otra parte, los cebadores decaméricos de RAPD produjeron patrones polimórficos, corroboraron la diversidad genética entre los diferentes aislamientos analizados.

REFERENCIAS

- 1.- NÁQUIRA C. *Taenia solium*: Ciclo Biológico y Características. En: Teniasis/Cisticercosis por *T. solium*. HH García, SM Martínez Editores. Editorial Universo S.A. Lima-Perú 1996; p. 7-15.
- 2.- BERN C, GARCÍA H H, EVANS C, et al. Magnitude of the disease burden from neurocysticercosis in a developing country. *Curr Infect Dis* 1999; 29: 1203-9.
- 3.- BOTERO D. Cisticercosis en Colombia. Investigaciones realizadas hasta 1988. *An Acad Med Medellín* 1989; (II) 2: 75-82.
- 4.- OKAMOTO M, NAKAO M, SAKO Y, ITO A. Molecular variation of *Taenia solium* in the world. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2001; 32: 90-3.
- 5.- NAKAO M, OKAMOTO M, SAKO Y, et al. A phylogenetic hypothesis for the distribution of two genotypes of the pig tapeworm *Taenia solium* worldwide. *Parasitology* 2002; 124: 657-62.
- 6.- DE QUEIROZ A, ALKIRE N L. The phylogenetic placement of *Taenia* cestodes that parasitize humans. *J Parasitol* 1998; 84: 379-83.
- 7.- VON NICKISCH-ROSENEGK M, SILVA-GONZÁLEZ R, LUCIUS R. Modification of universal 12S rDNA primers for specific amplification of contaminated *Taenia* spp. (Cestoda) gDNA enabling phylogenetic studies. *Parasitol Res* 1999; 85: 819-25.
- 8.- RISHI A K, MCMANUS D P. Molecular cloning of *Taenia solium* genomic DNA and characterization of taeniid cestodes by DNA análisis. *Parasitology* 1988; 97: 161-76.
- 9.- MARAVILLA P, SOUZA V, VALERA A, et al. Detection of genetic variation in *Taenia solium*. *J Parasitol* 2003; 89: 1250-4.
- 10.- VEGA R, PINERO D, RAMANANKANDRASANA B, et al. Population genetic structure of *Taenia solium* from Madagascar and Mexico: implications for clinical profile diversity and immunological technology *Int J Parasitol* 2003; 33: 1479-85.
- 11.- HANCOCK K, BROUGHEL D E, MOURA I N S, KHAN A, 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. *Int J Parasitol* 2001; 31: 1601-7.
- 12.- GASSER R B, ZHU X, WOODS W. Genotyping *Taenia* tapeworms by single-strand conformation polymorphism of mitochondrial DNA. *Electrophoresis* 1999; 20: 2834-7.
- 13.- BOWLES J, MCMANUS D P. Rapid discrimination of *Echinococcus* species and strains using a polymerase Chain reaction-based RFLP method. *Mol Biochem Parasitol* 1993a; 53: 231-40.

- 14.- BOWLES J, MCMANUS D P. (1993b) NADH dehydrogenase I gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. Int J Parasitol 1993; 23: 969-72.
- 15.- BOWLES J, MCMANUS D P. Molecular genetic characterization of the cervid strain ("northern form") of *Echinococcus granulosus*. Parasitology 1994; 109: 215-21.
- 16.- SCOTT J C, STAFANIAK J, PAWLOWSKI Z S, MCMANUS D P. Molecular genetic analysis of human cystic hydatid cases from Poland: identification of a new genotypic group (G9) of *Echinococcus granulosus*. Parasitology 1997; 114: 37-43.
- 17.- GASSER R B, ZHU X, MCMANUS D P. Display of sequence variation in PCR-amplified mitochondrial DNA regions of *Echinococcus* by single-strand conformation polymorphism. Acta Trop 1998; 71: 107-15.
- 18.- ZHANG L, GASSER R B, ZHU X, MCMANUS D P. Screening for different genotypes of *Echinococcus* within China and Argentina by single-Strand Conformation polymorphism (SSCP) analysis. Trans R Soc Trop Med Hyg 1999; 93: 329-34.
- 19.- ROMANOVA E A, SEMENOVA S K, BENEDIKTOV II, RYSKOV A P. Use of polymerase chain reaction for identifying helminth DNA from the species *Trichinella*, *Fasciola*, *Echinococcus*, *Nematodirus*, *Taenia*. Parazitologiya 1997; 31: 53-65.
- 20.- SCOTT J C, MCMANUS D P. The random amplification of polymorphic DNA can discriminate species and strains of *Echinococcus*. Trop Med Parasitol 1994; 45: 1-4.
- 21.- CHAPMAN A, VALLEJO V, MOSSIE K, et al. Isolation and Characterization of species-specific DNA probes from *Taenia solium* and *Taenia saginata* and their use in an egg detection assay. J Clin Microbiol 1995; 33: 1283-8.
- 22.- SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: A laboratory Manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- 23.- BOWLES J, BLAIR D, MCMANUS D P. Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. Mol Biochem Parasitol 1992; 54: 165-73.
- 24.- BOWLES, MCMANUS (1993c) NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. Int J Parasitol 1993; 23: 969-72.
- 25.- ORITA M, SUZUKI Y, SEKIYA T, HAYASHI K. Rapid and sensitive detection of point mutation and DNA polymorphisms using polymerase chain reaction. Genomics 1989; 5: 874-9.
- 26.- BASSAM B J, CAETANO-ANOLLÉS G, GRESSHOFF P M. Fast and Sensitive Silver Staining of DNA in Polyacrylamide Gels. Anal Biochem 1991; 196: 80-3.
- 27.- SCOTT J C, MCMANUS D P. The random amplification of polymorphic DNA can discriminate species and strains of *Echinococcus*. Trop Med Parasitol 1994; 45: 1-4.
- 28.- GASSER R B, CHILTON N B. Applications of single-strand conformation polymorphism (SSCP) to taxonomy, diagnosis, population genetics and molecular evolution of parasitic nematodes. Veterinary Parasitology 2001; 101: 201-13.
- 29.- SUNNUCKS, P, WILSON A C C, BEHEREGARAY, L B, et al. SSCP Is Not So Difficult: The Application and Utility of Single-Stranded Conformation Polymorphism in Evolutionary Biology and Molecular Ecology. Molecular Ecology 2000; 9: 1699-710.
- 30.- ORTÍ G, DE PEARSE, J C AVISE. 1997. Phylogenetic assessment of length variation at a microsatellite locus. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 10745-9.
- 31.- WILLIAMS J G K, KUBELIK A R, LIVAK K J, et al. DNA polymorphisms-amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 1990; 18: 6531-5.
- 32.- BAEZA L C, GIANNINI M J. Strain differentiation of *Trichophyton rubrum* by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). Rev Inst Med Trop S Paulo 2004; 46(6): 339-41.

Agradecimientos: Este trabajo fue financiado por Colciencias (cod. 2213-04-11903) y la Corporación para Investigaciones Biológicas. Expresamos nuestros agradecimientos a los Doctores Blanca Restrepo y Fernando Sanzón, por el aporte valioso de muestras a este estudio.