

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Estudio Piloto de la Dinámica de Transmisión de *Ascaris*
spp. de Humanos y Cerdos en Poblaciones Rurales y
Semiurbanas**

Proyecto de Investigación

Diana Sofía Mollocana Yánez

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera en Procesos Biotecnológicos

Quito, 01 de diciembre de 2017

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AMBIENTALES

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Estudio Piloto de la Dinámica de Transmisión de *Ascaris* spp. de Humanos
y Cerdos en Poblaciones Rurales y Semiurbanas**

Diana Sofía Mollocana Yáñez

Calificación:

.....

Nombre del profesor, Título académico

Sonia Zapata Mena , Ph.D.

Firma del profesor

Quito, 01 de diciembre de 2017

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante:

Nombres y apellidos:

Diana Sofía Mollocana Yáñez

Código:

00112348

Cédula de Identidad:

1723263818

Lugar y fecha:

Quito, 01 de diciembre de 2017

DEDICATORIA

A mis padres, Edwin y Jacqueline, por su apoyo y guía en este arduo pero maravilloso camino.

Los amo.

A Guillermo Yáñez y María Luisa Morán, mis amados abuelos, por juntos haber soñado y edificado la hermosa familia de la que hoy soy parte, sin importar las adversidades, por haberme mostrado desde muy pequeña que no hay mayor amor que el de Dios y mayor libertad que la educación.

A todas aquellas personas que día a día, desde las trincheras del laboratorio, las aulas y el campo, intentan llevar como Prometeo el fuego manumisor del conocimiento a sus hermanos aun a costa de ellos mismos. No hay mayor amor que quien da la vida por los demás.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Dios por haberme dado el regalo de la vida, y como parte de él, por sembrar en mí el amor y vocación por la ciencia y la investigación en el cual éste es uno de mis primeros pasos.

Agradezco a mi familia por su todo el apoyo, la fuerza y las sonrisas. Todo lo que soy es por ustedes y todos mis logros son suyos. A mis hermanos de alma Mónica, Xanny, Hugo, Andrés y Alexis.

Así mismo, quiero agradecer a Sonia Zapata, por haber confiado en mí para el desarrollo de este proyecto y especialmente por su paciencia, por compartir sus conocimientos conmigo y por su amistad durante el proceso. A Germán Burgos Figueroa, por su inestimable apoyo y enseñanzas sobre Biología Molecular y Genética Forense de principio a fin.

Al Laboratorio de Investigaciones de la Universidad de Las Américas y al Instituto de Microbiología de la USFQ, por acogerme y permitirme desarrollar la parte experimental de este trabajo en sus instalaciones.

A Francisco Yanqui-Rivera y al Dr. Manuel Calvopiña, por su gran ayuda en la colecta de muestras, así como por sus consejos, sin los cuales este proyecto no hubiera sido posible.

A Jaime Chaves, por su disposición y apertura para discutir.

Finalmente, quiero agradecer a todas aquellas personas que fueron una valiosa compañía durante mis estudios universitarios, especialmente a Saulo Erazo, Francisco Canet, Cristina Quijano, Maggi Bastidas, Sully Márquez y Paula Salazar. Agradezco a Dios por su vida y porque son alegría donde quiera que van. A Carlos Iglesias, Marco Jarrín, Michelle Pazmiño, Jorge Alvarez, Andrea Argudo, Gabriela Gavilanes, Juan Salazar, Carolina Armijos, Carlos Vintimilla, Miguel Orellana, María José Baquero, Brigitte Garzón, y Rebeca Cortez por todos los momentos compartidos de estudio y ocio. Son los mejores, colegas.

Gracias a todos por ser parte de esto.

RESUMEN

La Ascariasis se considera una de las geohelmintiasis más frecuentes a nivel mundial. Esta parasitosis producida por *Ascaris lumbricoides* presenta una distribución cosmopolita, afectando de forma considerable la salud de las personas de estratos socioeconómicos bajos y especialmente a niños e inmunocomprometidos. Este organismo comparte una morfología muy similar con *Ascaris suum*, especie asociada a hospederos porcinos, sin embargo, existen controversias relacionadas con su clasificación como dos especies separadas, lo cual dificulta en gran medida el establecimiento de medidas de control eficientes. Por ello, el presente estudio busca la caracterización molecular de parásitos adultos recuperados a partir de los dos tipos de hospederos conocidos para el género: humanos y cerdos, con miras a recopilar evidencias de una posible transmisión cruzada. Para ello, se extrajo el ADN de 66 parásitos (56 de cerdos y 9 de humanos) provenientes de las Provincias de Pichincha y Esmeraldas. La genotipificación fue posible mediante dos reacciones de PCR Multiplex-Heptaplex basadas en Microsatélites. La resolución de amplificadores mediante electroforesis capilar permitió identificar 267 alelos diferentes, con una media de 19 alelos por locus. Esto posibilitó la construcción de una Ladder con los alelos más representativos, a manera de estándar.

Fue notable que en el locus ALTN02, correspondiente a la Multiplex 1, todos los parásitos de humano resultaron homocigotos (alelo 7.2). Sin embargo, existieron muestras de cerdos con la misma condición. Se reportaron también cinco alelos nulos en muestras porcinas **lo cual sugiere** la presencia de mutaciones que imposibilitarían un anclaje adecuado de los cebadores. De esto se concluye que la gran diversidad alélica de *Ascaris* es un innegable indicador de su diversidad genética, la cual es importante para la diversificación de hospederos.

Existe evidencia para afirmar que la ascariasis en la región de estudio podría funcionar como una zoonosis directa pero condicional, causada por un posible fenómeno de especiación reciente, donde la pista principal viene a través del locus ALTN02.

Palabras clave: *Ascaris* spp., PCR Multiplex, Electroforesis Capilar, Ladder Alélica, Zoonosis

ABSTRACT

Ascariasis is considered one of the most frequent geohelminthiasis worldwide. This parasitosis is caused by *Ascaris lumbricoides* which has a cosmopolitan distribution and considerably affects the health of people from low socio-economic strata, especially children and immunocompromised. This organism shares a very similar morphology with *Ascaris suum*, which is associated with porcine hosts. However, there are controversies related to its classification as two separate species, which makes it very difficult to establish efficient control strategies. Therefore, the present study seeks the molecular characterization of adult *Ascaris* individuals recovered from the two types of known hosts for the Genus: humans and pigs, to search and collect evidence of cross transmission. DNA of 66 parasites (56 from pigs and 9 from humans) was extracted. The geographical source of the helminths were the provinces of Pichincha and Esmeraldas, Ecuador. To obtain the corresponding genotypes was possible by two Multiplex-Heptaplex PCR reactions based on microsatellites.

The resolution of PCR products by Capillary electrophoresis allowed to identify 267 different alleles, with a mean of 19 alleles per locus. This made it possible to construct a ladder with the most representative alleles, as a standard.

It was remarkable that in the ALTN02 locus, all human parasites were homozygous for allele 7.2. However, there were samples of pigs with the same condition. Five null-alleles were also reported in porcine samples that amplified at annealing temperatures lower than the conventional one (54.8 °C), suggesting the presence of mutations that would preclude an adequate anchoring of the primers.

It is concluded that the great allelic diversity of *Ascaris* is an undeniable indicator of its genetic diversity, which is important for the diversification of hosts. There is evidence to state that ascariasis in the study region functions as a direct but conditional zoonosis, caused by a possible recent phenomenon of speciation, where the main lineage comes through the ALTN02 locus.

Key words: *Ascaris* spp., PCR Multiplex, Capillary Electrophoresis, Allelic Ladder, Zoonosis

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción	12
1.1 Ascariasis y <i>Ascaris</i> spp.	12
1.1.2 Ciclo de Vida.....	13
1.1.3 Taxonomía	14
1.2 <i>Ascaris lumbricoides</i> y <i>Ascaris suum</i>, relaciones filogenéticas	15
1.3 Estrategias moleculares para elucidación específica	16
1.3.1 Marcadores de ADN ribosomal	16
1.3.4 Marcadores de ADN mitocondrial.....	17
1.3.5 Marcadores Microsatélite.....	17
1.4 Epidemiología Molecular de <i>Ascaris</i> spp.	18
2. Justificación	19
3. Objetivos	20
3.1 Objetivo General.....	20
3.2. Objetivos Específicos.....	20
4. Área de Estudio y Metodología de Muestreo	21
5. Materiales y Métodos	22
5.1 Materiales	22
5.1.1 Colección de Individuos de <i>Ascaris</i> spp.	22
5.1.2 Observación estructural y Método de disección	22
5.1.3 Extracción de ADN.....	22
5.1.4 Cuantificación de ADN	23
5.1.5 Amplificación del exón III de β -actina.....	23
5.1.6 Amplificación de la región COX1 de ADN mitocondrial	24
5.1.7 Electroforesis en gel de agarosa	24
5.1.8 Amplificación de Regiones Microsatélite en reacciones de PCR Multiplex -Heptaplex M1, M2 y Construcción de Ladder Alélica.....	25
5.1.9 Electroforesis Capilar	25
5.1.10 Pre-Secuenciación.....	25
5.1.11 Purificación Pre-Secuenciación AMPure ®	26
5.1.12. PCR de Secuencia.....	26
5.1.13 Purificación Post-Secuenciación Clean-Seq ®.....	27
5.1.14. Secuenciación.....	27
5.1.15. Análisis.....	27
5.2 Métodos	28
5.2.1 Preservación de Individuos, condiciones de pre-análisis	28
5.2.2 Disección y extracción de tejido útil	28
5.2.3 Extracción de ADN a partir de tejido visceral	28
5.2.4 Cuantificación de ADN	29
5.2.5 Amplificación del exón III de β -actina.....	29
5.2.6 Amplificación de la región COX1 de ADN mitocondrial	29
5.2.7 Electroforesis en gel de agarosa	29
5.2.8 Amplificación de Regiones Microsatélite en reacciones de PCR Multiplex -Heptaplex M1 y M2.....	30
5.2.9 Electroforesis Capilar	31
5.2.10 Genotipificación y Análisis	31
5.2.10 Pre -Secuenciación.....	32
5.2.11 Purificación Pre-Secuenciación AMPure ®	33
5.1.12. PCR de Secuencia.....	33

5.1.13 Purificación Post-PCR de Secuenciación Clean-Seq ®.....	33
5.1.14. Secuenciación.....	34
5.2.15 Construcción de Ladder Alélica.....	34
6. Resultados.....	35
6.1 Cuantificación y calidad de ADN.....	35
6.2 Amplificación del exón III de β -actina.....	35
6.3 Amplificación de la región COX1 de ADN mitocondrial.....	35
6.2 Amplificación de Regiones Microsatélite en reacciones de PCR Multiplex -Heptaplex M1 y M2	36
6.3 Diversidad Alélica	37
6.4 Amplificación y Secuenciación de Alelos STR de Interés	39
6.4.1 Alelos Nulos.....	39
6.4.2 Alelos Fuera de Rango.....	40
6.4.3 Alelo 7.2 en Humanos y Cerdos.....	40
6.5 Ladder Alélica	40
7. Discusión	41
10. Referencias bibliográficas	51
Tablas	57
Figuras	66
Anexos.....	70
ANEXO 1. Notación y Secuencia de Primers de Microsatélite empleados para la presecuenciación de alelos de interés.....	70
ANEXO 2. Protocolo de Extracción de ADN de Parásitos Adultos de <i>Ascaris</i> spp.	71
Método Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico.....	71
ANEXO 2. Párrafo Descriptivo del Procotolo de Purificación de Amplificados AMPURE ®	72
ANEXO 3. Párrafo Descriptivo del Procotolo de Purificación de Amplificados Post Secuenciación Clean-Seq ®.....	72
ANEXO 4. Frecuencias alélicas relativa obtenidas a partir de los genotipos asociados a la reacción de PCR Multiplex 1	74
ANEXO 5. Frecuencias alélicas relativa obtenidas a partir de los genotipos asociados a la reacción de PCR Multiplex 2	75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones de reacción para la Amplificación del exón III de β -actina a partir de ADN de <i>Ascaris</i> spp.	57
Tabla 2. Programa de Amplificación para la amplificación del exón III de β -actina a partir de ADN de <i>Ascaris</i> spp.	57
Tabla 3. Condiciones de reacción para la Amplificación de la región ASCO1-COX1 a partir de ADN de <i>Ascaris</i> spp.	57
Tabla 4. Programa de Amplificación para la amplificación del exón III de β -actina a partir de ADN de <i>Ascaris</i> spp.	58
Tabla 5. Condiciones de Preparación de los Mastermix de Primers Fluoromarcados M1 y M2 para regiones Microsatélite	58
Tabla 6. Programa de Amplificación Simultáneo de las Reacciones de PCR M1 y M2 para ADN de <i>Ascaris</i> spp.	59
Tabla 7. Condiciones de Amplificación de Regiones Microsatélite Pre-Secuenciación	59
Tabla 8. Programa en Termociclador para Regiones Microsatélite Pre-Secuenciación	59
Tabla 9. Condiciones de PCR de Secuencia	60
Tabla 10. Programa de Amplificación para reacciones de PCR de Secuencia.....	60
Tabla 11. Comparación entre los rangos y número de alelos observados en este estudio y el estudio de Criscione et al. (2007) para cada locus utilizado en los perfiles de STR-PCR Multiplex para <i>Ascaris</i> spp.....	61
Tabla 12. Coeficientes estadísticos forenses de acuerdo a un análisis mixto (Muestras de cerdos y humanos) para <i>Ascaris</i> spp.	62
Tabla 13. Distinción entre alelos compartidos entre <i>Ascaris</i> spp. de humanos y cerdos, Multiplex 1	63
Tabla 14. Distinción entre alelos compartidos entre <i>Ascaris</i> spp. de humanos y cerdos, Multiplex 2	64
Tabla 15. Heterocigocidad Observada, Esperada, Probabilidad de Alelos Nulos y Riesgo de Alelos Nulos en <i>Ascaris</i> spp. de cerdos	65
Tabla 16. Heterocigocidad Observada, Esperada, Probabilidad de Alelos Nulos y Riesgo de Alelos Nulos en <i>Ascaris</i> spp. de humanos	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Electroforesis en Gel de Agarosa al 2% con productos de PCR purificados por AMPure para varios microsatélites..	66
Figura 2. Electroforesis en Gel de Agarosa al 1% con productos de PCR amplificados para el exón III de β -actina a partir de ADN de <i>Ascaris</i> spp. Como control interno se ha incluido a la muestra 294, constituida por ADN extraído de heces que dieron positivo por microscopía para <i>Ascaris</i> .	66
Figura 3. Electroforesis en Gel de Agarosa al 1% con productos de PCR amplificados para la región cox1 (ASCo1) del ADN mitocondrial de <i>Ascaris</i> spp. de origen porcino y humano.	67
Figura 4. Perfiles de Regiones STR vía electroforesis capilar para la muestra ASCL024. A) Multiplex 1. B) Multiplex 2	67
Figura 5. Comparación entre las secuencias HASCL2.3 Y HASCL5.1 para el locus ALTN02 efectuada en el software Geneious. Se aprecia dicha comparación de forma parcial entre las posiciones 265 y 336.	68
Figura 6. Ladder Alélica + LIZ600 de la Multiplex 1	68
Figura 7. Ladder Alélica + LIZ600 de la Multiplex 2	69
Figura 8. Ladder Alélica del Locus ALGA20 previa a Reamplificación	69

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Ascariasis y *Ascaris* spp.

Ascaris spp. es un género de parásito cosmopolita cuyos dos integrantes conocidos, *A. lumbricoides* y *A. suum* forman parte de los helmintos transmitidos por el suelo. De forma tradicional, *A. lumbricoides* está comúnmente asociado a infecciones intestinales en la población humana (Scott, 2008), como parte de lo cual secuestra las fuentes de vitamina A del intestino para su propia nutrición a la vez que deteriora las vellosidades intestinales del hospedero. Este deterioro nutricional tiene sin lugar a dudas repercusiones en el desarrollo físico y cognitivo (WHO, 2017).

Anualmente, esta infección recae en el 14.6% de la población a nivel mundial (Leles et al., 2012; Benthony et al., 2006; Cooper et al., 2003; WHO, 2017), sumándose a esto la incidencia en pérdidas económicas en granjas porcinas, debido a que *A. suum* parasita a cerdos. Se ha visto que por su causa los animales no ganan peso al padecer infestaciones severas, incluso en países del primer mundo. Así, en Dinamarca, del 20 al 25% del ganado porcino tiene ascariasis, y en este contexto, el riesgo potencial de que el parásito desarrolle resistencia a antihelmínticos es muy grande, ante la aplicación profiláctica de fármacos (Nesjum et al., 2005).

Las infecciones por *Ascaris* spp. prevalecen en comunidades sedentarias, con condiciones sanitarias deficientes, acceso no oportuno a medicamentos y carencia de agua limpia. Por ello, en estas localidades, la contaminación de bebidas y alimentos con huevos del parásito, que se transmiten por vía fecal-oral, es común (Leles et al., 2010). Uno de los problemas crecientes en torno a esto es que “a medida que aumenta la escasez de agua se utilizan cada vez más aguas residuales no tratadas para regar cultivos, aumentando de este modo el riesgo de transmisión” (Scott, 2008).

Se conoce que la carga de morbilidad relacionada con las helmintiasis transmitidas por suelo ha disminuido casi un 70% entre 1990 y 2010 (Murray et al., 2012), sin embargo, si tanto *A.lumbricoides* como *A. suum* fuesen una misma siempre existiría siempre un riesgo de transmisión hacia los humanos en sitios endémicos, o localidades donde sea común la convivencia en proximidad entre cerdos y humanos, tornando vulnerables a ciertos grupos. De esta forma, a pesar de la disminución aparente de la prevalencia, el parasitismo y la migración errática de estos endoparásitos podría ser una causa importante de sintomatologías de presentación clínica extraña, especialmente en cuadros de anemia y en gestantes (Caballero et al., 2011; Cerrillo et al., 2005). Por este motivo, se considera fundamental establecer medidas de control eficaces para la erradicación completa, especialmente en los países de mayor incidencia histórica, siendo uno de ellos el Ecuador, y en los sectores de convivencia cercana entre cerdos y humanos.

1.1.2 Ciclo de Vida

Los individuos de *Ascaris spp.* son dioicos, por ende, se reproducen sexualmente. Una hembra fertilizada comienza a producir huevos de 6 a 8 semanas después de la infección de su hospedero. Esta puede llegar depositar 200,000 huevos por día a través de las heces del mismo (CDC, 2015). Estos huevos son ovalados, con forma amelonada, que en los climas cálidos y húmedos, con suelos arcillosos, pueden permanecer viables varias semanas en tierra gracias a su cubierta protectora. Algunos estudios han estimado que los huevos de *Ascaris spp.* pueden permanecer viables e infecciosos incluso por diez años, resistiendo los climas fríos, desinfectantes y purificadores de agua (Das, 2014). En este medio, la larva madura en el huevo sin eclosionar hasta llegar a un estadio L2 (Leles et al., 2012). Tanto los humanos como los cerdos llegan a infectarse por vía oral, gracias a lo cual las larvas L2s son liberadas a nivel estomacal e intestinal. Tras ser estimulados por los jugos gástricos, se adhieren al duodeno,

desde donde la larva rhabditiforme migra hasta el ciego. Seguidamente, penetran los epitelios. Esto propicia la migración hacia los conductos biliares, la vena porta y el hígado, volviéndose larvas de estadio L3 (Jhonstone, 2000).

Al encontrarse en las venas hepáticas, algunas alcanzan también vasos linfáticos, desde donde son llevadas hasta los pulmones y el corazón. De esta forma, alcanzan el espacio alveolar y el árbol bronquial, donde permanecen de 10 a 14 días. Desde allí ascienden hacia la laringe y luego la hipofaringe, donde son reingresadas por el reflejo de deglución. Así, las etapas finales de maduración larval, L3 y L4, se completan en el intestino delgado de 3 a 4 semanas posteriores a la infección inicial (Jhonstone, 2000). Los gusanos adultos llegan a vivir en el lumen del intestino delgado, donde se nutren y reproducen. Se estima que los gusanos adultos pueden vivir de 1 a 2 años (Das, 2014).

1.1.3 Taxonomía

En la actualidad, el género *Ascaris* se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera:

Reino: Animalia

Subreino: Metazoa

Superfilo: Protostomia

Filo: Nematoda

Clase: Secerenentea

Orden: Ascaridida

Familia: Ascarididae

Género: *Ascaris*

Las dos únicas especies del género en cuestión son las ya mencionadas (Myers et al., 2008).

1.2 *Ascaris lumbricoides* y *Ascaris suum*, relaciones filogenéticas

Desde la descripción y nomenclatura original de *Ascaris lumbricoides* por Linnaeus en 1758 y más tarde la de *Ascaris suum* de cerdos por Goeze en 1782, ambas especies han sido consideradas como válidas (Leles et al., 2012). Se conoce además que ambas han acompañado la vida de los seres humanos desde tiempos prehistóricos, debido a la presencia de huevos en coprolitos, el intestino de momias y material arqueológico de diversos tipos (Gonçalves et al., 2003).

Hasta el momento, por su gran similitud morfológica, que difiere sin embargo, en la estructura anatómica de las dentículas y la porción labial (Ansel y Thibaut, 1973; Sprent, 1952), existen cuatro hipótesis principales que pretenden explicar la especiación entre estos aparentes dos organismos diferentes, así como las relaciones evolutivas en torno a sus hospederos (Leles et al., 2012). La primera de estas manifiesta que tanto *A. lumbricoides* como *A. suum* son especies válidas que se habrían originado de un mismo ancestro común en tiempos muy anteriores a la domesticación de los cerdos. La segunda hipótesis, por su parte, sostiene que *Ascaris lumbricoides* se originó a partir de *A. suum*, por lo que éste último resultaría ser en realidad un ancestro persistente. Este evento tendría sus principios en la relativamente reciente domesticación del género *Sus*, proceso que se estima tuvo lugar hace 9000 años en torno a dos centros geográficos: Anatolia, actual Turquía, y en el valle del Mekong (Frantz et al., 2015). A pesar de ello, la presencia de huevos de *Ascaris* spp. en humanos se ha encontrado presuntamente en material arqueológico de 30,000 años de antigüedad, por lo cual cronológicamente no se hallaría soportada, aun cuando, en dicho estudio nunca fue posible autenticar el origen humano de dichos huevos de forma concluyente (Leles et al., 2012).

La tercera hipótesis enuncia el caso contrario, siendo *A. suum* la especie más joven, mientras que la cuarta hipótesis expresa que ambas especies son conespecíficas, es decir, que pueden formar híbridos viables (Geyer y Palumi, 2005).

Hasta el momento, se han reportado casos de infecciones humanas asociadas a contaminación con huevos de *Ascaris* de origen porcino, necesitándose a su vez cargas parasitarias muy grandes para producir la infección en cerdos a partir de parásitos asociados a humanos. Así mismo, los estudios moleculares han demostrado además que las infecciones humanas de *Ascaris* spp. en los países desarrollados son predominantemente de origen porcino, mientras que en los países en vías de desarrollo la transmisión humano-humano parece predominar (Betson et al., 2014). No obstante, las diferencias geográficas sólo han podido explicar un 17% de la variación genética observada en varios estudios (Anderson et al., 1997)

Por ende, el escenario es ambivalente.

1.3 Estrategias moleculares para elucidación específica

A continuación se enuncian los tipos de acercamientos que se han desarrollado a este nivel para entender de mejor manera la epidemiología molecular de *Ascaris* spp. hasta el momento.

1.3.1 Marcadores de ADN ribosomal

Son varios estudios moleculares los que se han realizado en torno a *Ascaris* spp. que han vinculado la region ITS1 con nuevas formas de resolución de filogenia. El Espaciador Transcrito Interno es una region de ADN no codificante localizada entre los genes correspondientes a la subunidad ribosomal pequeña y larga. En los Eucariotas como *Ascaris* es característico el ITS1 que se encuentra entre las subunidades 18S y 5.3S (Lafontaine y Tollervey, 2001). Se han reportado alrededor de 9 genotipos asociados a esta región (Das et al., 2005). Sin embargo, los bajos polimorfismos y variabilidad alta entre réplicas y entre cromosomas complica la interpretación de los datos provenientes de secuencias ribosomales (Vilas et al., 2005). Cabe mencionar que el acoplamiento de la amplificación de este tipo de

fragmentos con el uso de marcadores RFLPs, ha sido más ampliamente extendido. Por ejemplo, en el estudio de Sparks y colaboradores (2015), sobre la epidemiología de Ascariasis en Ecuador y Zanzibar, se desarrolló digestión doble del amplificado con las enzimas RsaI y HaeIII, determinando evidencias de zoonosis en Zanzibar pero no en Ecuador.

1.3.4 Marcadores de ADN mitocondrial

De forma extendida, los estudios del genoma mitocondrial de *Ascaris spp.* se han basado en el análisis de exones e intrones de los genes COX y NAD, si bien ha ganado mucho más peso el análisis del genoma mitocondrial en su totalidad. Se estima que el mismo tiene más de 14,000 pb (Nesjum et al., 2017). Gracias a estos estudios, se ha podido dilucidar a través de simulaciones coalescentes y la topología de árboles filogenéticos, que al menos han ocurrido dos eventos de divergencia. El primero de estos habría ocurrido en el Neolítico a través de una diferenciación de poblaciones de *Ascaris* a partir de cerdos, y el segundo de forma más reciente, alrededor de 900 generaciones atrás, debido a actividades humanas (Nesjum et al., 2017). Sin embargo, se considera que las inferencias basadas solamente en ADN mitocondrial pueden ofrecer información incompleta debido a procesos de introgresión vía hibridización y clasificación incompleta de linajes (Ballard y Withlock, 2004), pero no se puede desestimar que estos ofrecen pistas importantes sobre las primeras etapas de separación de grupos poblacionales.

1.3.5 Marcadores Microsatélite

Para la generación de perfiles genéticos, suelen aprovecharse las características especiales de los denominados Marcadores Microsatélite, o STR (Short Tandem Repeats), los cuales son segmentos relativamente cortos, constituidos por repeticiones de motivos con una longitud de dos a seis pares de bases, (Sirvent y Gómez, 2012). Justamente, en el año 2007, Criscione y colaboradores describieron un listado completo de 35 microsatélites para *Ascaris*

lumbricoides, con tamaños comprendidos entre 99 y 312 pb clasificados como de repetición variable (Criscione et al., 2007). De esto se desprende que existe información amplia para una adecuada caracterización molecular de individuos del género. Se considera que el elevado polimorfismo alélico otorgado por los marcadores microsatélite debe aprovecharse debido a que estos permiten no solo estimar hibridación, sino también cuestiones relacionadas a migración, parentesco y tamaño efectivo de poblaciones (Criscione et al., 2007). Sin embargo, las técnicas utilizadas ofrecen información únicamente de un solo locus STR del genoma por reacción (Sirvent y Gómez, 2012), por lo que resulta ideal contar con una reacción de amplificación múltiple de STRs que permita obtener información de varios loci y no solo uno al final del proceso, lo que implica un considerable ahorro de tiempo y dinero.

1.4 Epidemiología Molecular de *Ascaris* spp.

Se sabe muy poco sobre la diversidad genética del género *Ascaris* en localidades geográficas específicas, usualmente endémicas, por lo cual, no se entiende cómo el parásito prolifera tan rápido y además desarrolla resistencia a fármacos (Cavallero et al., 2013).

En especies parasitarias como *A.lumbricoides* y *A.suum*, una mayor diversidad genética está indiscutiblemente asociada a una mayor adaptabilidad, por lo que el tener la mayor cantidad de información disponible con respecto a la misma se presenta como una aspiración.

Si bien no hay un marcador molecular definitivo que permita distinguir claramente entre los parásitos de humanos y de cerdos, una combinación de estos ha demostrado ser exitosa (Betson et al., 2014). Con respecto a lo anterior existen dos posibles estrategias moleculares. La primera de ellas es el uso de una Ladder o Escalera Alélica, la cual es una mezcla de todos los alelos potencialmente identificados en una muestra poblacional significativa (Schumm, 1997). Es empleada como estándar para la correcta asignación de alelos durante la genotipificación, con base en sus tamaños respectivos. Así, resultaría una herramienta muy

útil en la identificación y caracterización genética de *Ascaris* a partir de una reacción de PCR Multiplex, donde podrían amplificarse varios fragmentos informativos del genoma al mismo tiempo, a la vez que la identidad alélica sería fácil y rápidamente determinada. Por todo esto, se podría además evaluar la reproducibilidad del método de detección y así también contar con información veraz de los alelos a esperarse en una población (Schumm, 1997).

2. JUSTIFICACIÓN

Por todo lo anterior es necesario contribuir con el entendimiento de los mecanismos de transmisión, si es que existen, entre individuos adultos de *Ascaris* spp. de humanos y cerdos, especialmente a nivel local, con miras de identificación de riesgos reales que deberán ser considerados para su erradicación. A esto se suma que en Ecuador no existen hasta el momento estudios actualizados sobre la dinámica de transmisión de helmintiasis causadas por *Ascaris* spp. utilizando microsatélites y a pesar de la reportada prevalencia alta en ciertas comunidades y provincias a nivel nacional (Cooper et al., 2003), no se han realizado estudios que comprometan esta herramienta molecular con la epidemiología del parásito, considerando especialmente las áreas rurales y periurbanas donde es mucho más común que sus dos hospederos cohabiten y se enfrenten a situaciones que propiciarían el mutuo contagio (Sparks et al., 2015).

Es también relevante destacar que a nivel global, la genotipificación de este organismo con STRs se ha producido únicamente en reacciones de PCR simple, locus por locus (Betson et al., 2014; Criscione et al., 2007), por lo cual la implementación de reacciones Multiplex repercutirían positivamente en tiempo y costos de investigación.

En cuanto al impacto social que este parásito provoca en Ecuador, se sabe que consta dentro de los más importantes en infecciones intestinales generadas en niños menores de doce

años de edad y de niveles socioeconómicos bajos (Cooper et al., 2003). (Cavallero et al., 2013; James et al., 2012; Cooper et al., 2003), por lo cual, al elucidar la potencial presencia de una zoonosis desatendida, la estructuración de programas de salud que reduzcan o limiten la exposición en comunidades de riesgo resultaría en medidas de control efectivas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Analizar la informatividad de 14 microsatélites de *Ascaris* spp. como parte de dos reacciones de PCR Multiplex en muestras de ADN obtenidas a partir de parásitos adultos de humanos y cerdos en localidades rurales y periurbanas, específicamente de las Provincias de Pichincha y Esmeraldas.

3.2. Objetivos Específicos

- Determinar las frecuencias alélicas y los parámetros genético- poblacionales para 14 STRs reportados en *Ascaris* spp. .
- Construir una Escalera Alélica de loci microsatélites a partir de individuos adultos de *Ascaris* spp.
- Evaluar de manera preliminar la diversidad esperada de alelos y dinámica de transmisión de *Ascaris* para la localidad geográfica de estudio.

4. ÁREA DE ESTUDIO Y METODOLOGÍA DE MUESTREO

Para el presente trabajo se seleccionaron 50 parásitos adultos de *Ascaris spp.* obtenidos a partir del intestino de varios cerdos faenados en el Camal Metropolitano de Quito durante el mes de octubre de 2016, siguiendo una metodología de muestreo no probabilístico, por conveniencia. Si bien el sitio de colecta tuvo como ubicación el extremo sur de la ciudad de Quito (0°15'00"S 78°35'00"O), el día de recolección se faenaron cerdos tanto de la localidad como de la ciudad de Machachi (Cantón Mejía) y de otras comunidades del sur de la provincia de Pichincha, así como potencialmente de Santo Domingo de los Tsáchilas. De igual forma se colectaron 9 parásitos de *Ascaris spp.* entre los meses de febrero y junio de 2017. Todos ellos fueron de origen humano, provenientes de 6 personas distintas. 4 de ellas, radicadas en la Comunidad Zapallo Grande, del Cantón Eloy Alfaro-Provincia de Esmeraldas (1°15'N 79°00'O). Las dos personas restantes fueron pacientes del Hospital del Sur Enrique Garcés y de la Maternidad Isidro Ayora, ambos residentes de la provincia de Pichincha y con cuadros delicados en cuanto a infección parasitaria, siendo estos gestación y leucemia linfoblástica aguda. En todos los casos, se contó con el consentimiento informado, el cual fue aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad San Francisco de Quito. Al estudio, con el fin de fortalecer los análisis estadísticos ante un mayor número de individuos, se incorporaron siete muestras adicionales de cerdos, 6 de ellas provenientes de la comunidad de Otón de Vélez, Pichincha y la séptima proveniente del Camal Metropolitano de Quito. Todos los análisis fueron realizados tanto en el Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito como en el Laboratorio de Investigación de la Universidad de Las Américas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Colección de Individuos de *Ascaris* spp.

- Piperazina 20% en jarabe
- Frascos plásticos limpios y/o estériles
- Cedazos plásticos de diversos tamaños
- Pinzas metálicas
- Solución de Etanol 70% filtrada

5.1.2 Observación estructural y Método de disección

- Loza estéril o tabla de disección
- Mango de Bisturí de acero al carbono
- Hojas de Bisturí de acero al carbono N°10
- Tubos estériles de 1.5 mL THERMO SCIENTIFIC
- Balanza Analítica GHAUS

5.1.3 Extracción de ADN

- Tubos estériles de 1.5 mL THERMO SCIENTIFIC
- Buffer de Lisis ATL QIAGEN
- Pistilos plásticos autoclavados
- Cama Fría
- Proteinasa K Resuspendida INVITROGEN 20 mg/mL
- Vórtex IKA/SMENSAURO LAB MIXER
- Estufa programable con temporizador BIOBASE

- Solución de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico 25:24:1 pH 8
- Tiras de papel para determinación de pH ERBA
- Micro Centrífuga EPPENDORF
- Cloroformo Puro
- Solución Salina NaCl 3M
- Isopropanol Frío
- Etanol 70% Frío
- Agua Libre de Nucleasas

5.1.4 Cuantificación de ADN

- Agua Libre de Nucleasas
- Cuantificador NANODROP® 2000
- Cuantificador NANOVue® PLUS
- Pipetas LABNET
- Tubos de PCR de 0.6 y 1.5 mL

5.1.5 Amplificación del exón III de β -actina

- Pipetas LABNET
 - Termociclador BIORAD
 - Tubos de PCR Eppendorf de 0.2 mL
 - Primer Forward 10 μ M: (5'CGG AAC CGC TCA TTG CC3')
 - Primer Reverse 10 μ M: (5'ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA3')
- **Reactivos Genéricos de PCR:**
- H₂O de PCR
 - Buffer de Reacción Green GoTaq® 5X PROMEGA
 - dNTPs 2mM PROMEGA

- MgCl₂ 25mM, 1.5mL, PROMEGA
- Taq Polimerasa (TaqPol®) 5U/ml, 500U, PROMEGA

5.1.6 Amplificación de la región COX1 de ADN mitocondrial

- Primer Forward ASCo1 50μM:
(5'-TTTTTTGGTCATCCTGAGGTTTAT-3')
- Primer Reverse ASCo1 50μM: (5'-ACATAATGAAAATGACTAACAAC-3)
- Reactivos Genéricos de PCR
- Tubos de PCR de 0.2 MI THERMO SCIENTIFIC
- Pipetas LABNET
- Termociclador BIORAD

5.1.7 Electroforesis en gel de agarosa

- Agarosa Ultra Pura INVITROGEN
- Balanza Analítica METLER-TOLEDO/ADAM AQT-600
- Microondas PANASONIC UPS 4,942,516
- Matraz Erlenmeyer
- Buffer TBE 1X
- Bromuro de Etidio SIGMA
- Sybr Safe 400 mL, INVITROGEN
- Tiras de Parafilm
- Buffer de Reacción Green GoTaq® 5X PROMEGA
- Ladder 100 pb, 250 μL PROMEGA
- Cámaras de Electroforesis de diversos tamaños
- Camas para gel

- Fuente de Poder ENDURO 300V-LABNET
- Pipetas LABNET
- Peines de diversos tamaños
- Fotodocumentador BIORAD y Software ImageLab

5.1.8 Amplificación de Regiones Microsatélite en reacciones de PCR Multiplex - Heptaplex M1, M2 y Construcción de Ladder Alélica

- Primer MIX M1 y M2 (Ver Tabla 5) (Burgos et al., 2017)
- QIAGEN Multiplex PCR Mastermix ®
- Tubos para PCR de 0.2 µL THERMO SCIENTIFIC
- H₂O de PCR
- Termociclador SureCycler8800 Agilent
- Micropipetas LABNET y EPPENDORF

5.1.9 Electroforesis Capilar

- Placas de 96 pocillos THERMO SCIENTIFIC
- Septas de caucho
- Hi-Formamida ® THERMO SCIENTIFIC
- LIZ 600 THERMO SCIENTIFIC
- Analizador Genético ABI3130
- Polímero POP7® THERMO SCIENTIFIC
- Software Foundation Data Collection y Gene Mapper ID v3.2.

5.1.10 Pre-Secuenciación

- Primers de Microsatélites seleccionados 10 µm (Ver Anexo 1)

- Applied Biosystems ® Multiplex PCR Mastermix
- Agua de PCR
- Termociclador SureCycler8800 Agilent
- Tubos para PCR de 0.2 MI THERMO SCIENTIFIC

5.1.11 Purificación Pre-Secuenciación AMPure ®

- Micropipetas Simples y Multicanal LABNET
- Placa Magnética de 96 pocillos THERMO SCIENTIFIC
- Solución AMPure ® AGENCOURT-BECKMAN COULTER
- Temporizador
- Etanol 70%
- Papel Absorbente
- Estufa MEMMERT
- Agua MiliQ
- Vórtex VISION SCIENTIFIC
- Microcentrífuga CORNING
- Tubos Eppendorf de PCR de 0.2 mL

5.1.12. PCR de Secuencia

- Termociclador SureCycler 8800 Agilent
- Agua MiliQ
- BigDye Buffer 5X THERMO SCIENTIFIC
- Primer Forward y/o Reverse a concentraciones de 1µM (Mismos especificados en Anexo 1).
- Amplificados Purificados

5.1.13 Purificación Post-Secuenciación Clean-Seq ®

- Micropipetas Simples y Multicanal LABNET
- Placa Magnética de 96 pocillos THERMO SCIENTIFIC
- Solución CleanSeq ® AGENCOURT-BECKMAN COULTER
- Temporizador
- Etanol 85%
- Papel Absorbente
- Estufa MEMMERT
- Agua MiliQ
- Vórtex VISION CIENTIFIC
- Microcentrífuga CORNING
- Tubos Eppendorf de PCR de 0.2 mL

5.1.14. Secuenciación

- Analizador Genético ABI3130
- Software Foundation Data Collection y Sequencing Analysis v.5.3.1.
- Microcentrífuga CORNING
- Tubos Eppendorf de PCR de 0.2 mL
- Software Geneious 10.2.3 BIOMATTERS

5.1.15. Análisis

- Hoja de cálculo PowerStat PROMEGA
- Software Arlequin 3.5

5.2 Métodos

5.2.1 Preservación de Individuos, condiciones de pre-análisis

Las colectas fueron realizadas a partir de vísceras de cerdos faenados y por chemoexpulsión con piperazina al 20%, en el caso de seres humanos. Tras esto, los parásitos fueron guardados en frascos estériles adecuadamente etiquetados en una solución filtrada de Etanol al 70%, ya sea a temperatura ambiente o en refrigeración a 4°C. Se evitó la congelación puesto que *“las células del interior del tejido se descongelan antes de entrar en contacto con las soluciones de lisis y el ADN se fragmenta por acción de las DNAsas”* (Alejo-Velásquez et al., s.f.).

5.2.2 Disección y extracción de tejido útil

Un paso importante para una disección adecuada, fue el estimar el sexo de los parásitos de forma visual. La característica diferencial determinante fue una terminación con forma de gancho en el extremo distal en los machos. En las hembras, el extremo posterior o caudal es romo, mientras que el extremo anterior es puntiagudo (Hinojoza, 2005). La diferenciación entre sexos en *Ascaris* es importante para identificar el extremo del espécimen más cercano a la mayor concentración de vísceras. Por ello, una vez identificado los extremos proximal y distal, sobre una superficie estéril, se realizó un primer corte longitudinal con un bisturí a un tercio del mismo para exponer el material base de extracción.

5.2.3 Extracción de ADN a partir de tejido visceral

Para la extracción de ADN genómico total, se siguió el protocolo de Fenol:Cloroformo: Alcohol Isoamílico, como una adaptación del protocolo de QIAmp® DNA Mini-Kit.

La lista de pasos a seguir se muestra en el Anexo 2.

5.2.4 Cuantificación de ADN

Se determinó la concentración de las muestras obtenidas, así como sus indicadores de calidad, mediante los espectrofotómetros NANODROP 2000 ® y NANOVUE PLUS ®. Esta concentración permitió realizar diluciones en función del tipo de reacciones de PCR a ejecutar. Las concentraciones manejadas fueron de 5, 10, 15, 20, 30 y 50 ng/μL.

5.2.5 Amplificación del exón III de β -actina

Se prepararon reacciones con volúmenes de 10 μL, incorporando a las mismas los respectivos controles. La concentración empleada del template fue de entre 25 y 35 ng/μL.

Las condiciones del Mix de reacción se muestran en la Tabla 1. Por su parte, las condiciones de amplificación en el termociclador se encuentran en la Tabla 2.

5.2.6 Amplificación de la región COX1 de ADN mitocondrial

Se prepararon reacciones con volúmenes finales de 30μL. La concentración empleada del ADN molde, en esta ocasión, se situó entre 30 y 40 ng/μL. Las condiciones del mix de reacción se muestran en la Tabla 3. Por su parte, las condiciones de termociclado se encuentran en la Tabla 4. Cabe mencionar que estas últimas se establecieron como un protocolo modificado a partir del ofrecido en el trabajo de Liu y colaboradores (2012).

5.2.7 Electroforesis en gel de agarosa

Se realizaron tres tipos diferentes de geles, el primero de estos con el objetivo de observar los fragmentos amplificados a partir de las reacciones de PCR previamente descritas, los cuales fueron realizados a una concentración de agarosa del 1%. Los siguientes se establecieron como parte de las reacciones de pre secuencia y secuencia, que fueron realizados a concentraciones

de agarosa al 2%. Esta misma concentración se utilizó para evaluar tanto la concentración de primers como la integridad de muestras, en los casos necesarios. La disolución de la agarosa se realizó en buffer TBE 1X con ayuda de un horno microondas. En el caso de la visualización de fragmentos se utilizó bromuro de Etidio como agente de tinción, mientras que en los geles para pre secuencia y secuencia se empleó Sybr Safe®. Las muestras fueron cargadas en los pocillos directamente en algunos casos (visualización de fragmentos) y con ayuda del buffer Green GoTaq 5X® en proporción 1:4, utilizando tiras de Parafilm como superficie de mezcla en los amplicones sin color. En todos los casos se usó 1µL de Ladder de 100 pb. Con respecto a las condiciones de corrida, para el primer tipo de gel, se corrió la cámara de electroforesis a 80V, 200 mA por 45 minutos, mientras que en los geles 2 y 3 se corrió la cámara a 100V por 35 minutos.

Para revelar los geles, se empleó un fotodocumentador BIORAD con el sistema lumínico EPI WHITE.

5.2.8 Amplificación de Regiones Microsatélite en reacciones de PCR Multiplex - Heptaplex M1 y M2

Se realizaron dos reacciones de PCR Multiplex-Heptaplex por muestra, una por cada Multiplex, en volúmenes finales de 5µL. Estas reacciones fueron las mismas que las reportadas en el trabajo previo de Burgos y colaboradores (2017), que a su vez se estructuraron con base en 14 primers altamente informativos seleccionados de 35 publicados por Criscione y colaboradores (2007). Cada reacción se ejecutó añadiendo 2.5 µL de QIAGEN® Multiplex PCR Mastermix, 1 µL de Primer MIX, 0.5 µL de Agua de PCR y 1 µL de ADN, a una concentración de 5 ng/ ml de ADN molde. Las condiciones de preparación de las MIX de Primer fluoromarcados se muestran en la tabla 5. A su vez, las condiciones de termociclado se indican en la tabla 6.

5.2.9 Electroforesis Capilar

1 μL de producto PCR fue separado mediante electroforesis capilar en el Analizador Genético ABI3130 (Applied Biosystems). Para ello, se colocaron junto con éste 9 μL de Hi-Formamida como agente denaturalizante, y 0.15 μL de LIZ600, que funciona como estándar interno de tamaño en pocillos de plato de 96. Seguidamente, se procedió a programar la corrida en el software Foundation Data Collection y los resultados para obtener perfiles informativos se procesaron en Gene Mapper ID v3.2. La inyección de cada muestra se efectuó en un tiempo estimado de 5 segundos a un voltaje de separación de 15000 V, con un tiempo de corrida estimado en 28 min a 60 °C. Se utilizó además el polímero POP-7 3130/Buffer 1X ACE para la carga en el equipo, donde los capilares tuvieron 36 cm de longitud con un diámetro de 50 μm (Applied Biosystems). Esta misma técnica se utilizó para el montaje de amplificadores en la construcción de las dos Ladders Alélicas propuestas.

5.2.10 Genotipificación y Análisis

Con base en los perfiles dobles obtenidos para cada muestra (uno por reacción Multiplex) se construyó una matriz alélica en la hoja de cálculo Microsoft Excel 2010. En la misma se asignaron los nombres correspondientes a los alelos con base en la notación estándar ISFG y a 22 secuencias homocigotas previamente reportadas por Yanqui-Rivera (2017). Con esta información se estructuraron manualmente nuevos marcos de lectura para el analizador genético ABI3130. En la hoja de cálculo PowerStat fue posible con esta información la obtención de las frecuencias alélicas relativas por locus y también de coeficientes forenses de interés (debido a que esencialmente se está trabajando con individuos parasitarios y a la naturaleza de las técnicas empleadas, tradicionalmente asociadas a identificación de individuos (Butler, 2005). Los indicadores forenses estimados fueron: Probabilidad de Coincidencia (MP),

Poder de Discriminación (DP), Contenido de Información Polimórfica (PIC), Poder de Exclusión e Índice típico de Paternidad. Por su parte, otros estadísticos de interés se estimaron en el software Arlequín 3.5 mediante un análisis bayesiano de 10000 iteraciones siguiendo el modelo de Markov Chain Montecarlo (Excoffier, 2015), siendo estos principalmente Heterocigocidad Observada (Ho) y Heterocigocidad Esperada (He), tanto a nivel de *A. lumbricoides* y *A. suum* como a nivel global. Otros estadísticos que procuraron estimarse fueron el Índice de Fijación (Fst), Coeficiente de Endogamia (Fis) y Coeficiente de Endogamia Total (Fit) a partir de una prueba de Varianza Molecular entre los parásitos de cerdos y humanos, sin embargo, los resultados de estas pruebas se descartaron tanto por el sesgo introducido frente a una muestra no balanceada y a la imposibilidad de repartir el componente de varianza entre dos grupos heterogéneos a nivel geográfico y potencialmente específico (Cadena-Meneses y Castillo-Morales, 2002). Tanto la frecuencia mínima, la probabilidad de alelos nulos (r) como la distinción manual entre alelos humanos y porcinos se realizaron forma individual en Excel.

5.2.10 Pre –Secuenciación

Aquellas muestras (10ng/ul) que presentaron durante la genotipificación alelos nulos (ausencia de genotipo en un locus determinado, con amplificación presente en los demás) u homocigocidades particulares, se amplificaron con primers fríos 10uM en un volumen final de 15uL. Para la amplificación se emplearon muestras a concentraciones de 10 ng/ μ L así como el reactivo AB ® PCR Multiplex Mastermix, que destaca por tiempos de Hot Start menores. Las condiciones para la reacción de PCR se muestran en la tabla 7, mientras que el programa para amplificación en el termociclador se indica en la tabla 8.

5.2.11 Purificación Pre-Secuenciación AMPure ®

Al contar con los amplificadores pre-secuenciación, con el objetivo de garantizar la ausencia de los primers para evitar una doble lectura en el secuenciador, fue necesario un paso previo de purificación, basado en la solución Agencourt ®AMPure ® XP . Ésta consta de perlas paramagnéticas que se adhieren a los amplificadores, permitiendo que los excesos de cebadores, nucleótidos, sales y enzimas sean removidos (Agencourt Bioscience, s.f.).

El protocolo de esta técnica se muestra en el Anexo 3.

Para verificar el nivel de éxito de este procedimiento, se visualizaron los amplificadores purificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% como puede verse en la figura 1.

5.1.12. PCR de Secuencia

Los amplificadores purificados en el apartado anterior se utilizaron como molde para la reacción de secuenciación. Esta se ejecutó en pares por muestra de interés, ya que fue necesaria una reacción por primer (Forward y Reverse). En este caso, la concentración Stock de los primers a manejarse fue de 1µM y el volumen final de la reacción fue de 6.5 µL. Debido a la fotosensibilidad del Big Dye, los tubos se preservaron alejados de fuentes de luz en todo momento. En las Tablas 9 y 10 se incluyen las condiciones de reacción y el programa de amplificación pertinente.

5.1.13 Purificación Post-PCR de Secuenciación Clean-Seq ®

Una vez ejecutada la reacción, fue importante eliminar los remanentes de reactivos, como exceso de ddNTPs y primers que pudieran permanecer en el tubo. Por ello, resultó importante el uso de CleanSeq ®, el cual es una solución muy similar a AMPure e igualmente

basada en la tecnología de Inmovilización Reversible en Fase Sólida (SPRI) (Beckman Coulter-Agencourt, s.f.). El protocolo de esta técnica se muestra en el Anexo 4.

5.1.14. Secuenciación

Las muestras purificadas se sometieron a electroforesis capilar, en el analizador genético ABI 3130 durante 30 minutos a 50°C, en polímero POP7, con un tiempo de inyección de 30 segundos a 10 KV, y un tiempo de corrido de alrededor de 50 minutos a 15 KV. Los electroferogramas se analizaron y editaron con el Software Sequencing Analysisv5.3.1 de Applied Biosystems; las secuencias se compararon con los alelos tipo reportados, con el fin de verificar su tamaño. Una vez obtenidas las secuencias forward y reverse para cada muestra, estas fueron exportadas y alineadas para obtener la secuencia consenso en el software Geneious 10.2.3, realizándose los análisis de homología-BLAST directamente desde el mismo.

5.2.15 Construcción de Ladder Alélica

Una vez identificados los alelos homocigotos junto con sus respectivas alturas, las muestras de los cuales estos provinieron se usaron para generar un molde de ADN para dos ladders alélicas (Una por Multiplex). Se procuró lograr la amplificación del mayor número de alelos posibles con alturas similares, así como la reducción de stutters. Por ello, se evaluó el desempeño de las reacciones a distintos ciclos (30,35,40 y 45X) tiempos de elongación (1'15'' y 2'00 ''), así como a diferentes tiempos de extensión final (30 minutos y 1 hora). Las reacciones que se prepararon tuvieron volúmenes finales de 5 µL, a la vez que se utilizaron templates con concentraciones de 15 ng/µL, siguiendo las recomendaciones de van Asch et al. (2009). Las mix de amplificados locus por locus se visualizaron en el Analizador ABI3130 de la misma forma en la que se visualizaron genotipos, tras lo cual se mezclaron 4 µL de cada

amplificación por Multiplex. Tras someter a vórtex y a microcentrifugación, se comprobó la visualización simultánea de amplificadores como si fuera un perfil tradicional.

6. RESULTADOS

6.1 Cuantificación y calidad de ADN

Las concentraciones máxima y mínima de ADN de parásitos se encontraron en el rango de 297.4 y 7665.3 ng/μL respectivamente. En cuanto a los indicadores de calidad, los valores del coeficiente A260/A280 se encontraron en un rango entre 1.53 y 2.19, con una media de 2.00; por su parte, para el coeficiente A260/230 los valores oscilaron entre 0.47 y 2.47, con una media de 1.56.

6.2 Amplificación del exón III de β -actina

Tras realizar la reacción de PCR previamente descrita para cinco muestras seleccionadas al azar, como paso inicial para la estandarización, fue posible notar que en todas se produjo amplificación, por lo cual no hubo inhibición. Sin embargo, fue notoria la presencia de dos bandas de 300 y 600 pb (Fig.2), a pesar de que se esperaba un amplicón único de alrededor de entre 209 y 300 pb (Huang et al., 2008). Fue notable además la presencia de dímeros de primer, que se redujeron considerablemente al llevar muestras similares a una concentración uniforme de 20ng/μL. En dicho ensayo, se puede visualizar la incorporación de un control interno (triplicado) con una concentración de 21 ng/μL, basado en ADN extraído de heces, específicamente de una muestra la cual fue catalogada como *Ascaris* positiva por microscopía. En los mismos, la presencia de la banda de 300pb fue inexistente.

6.3 Amplificación de la región COX1 de ADN mitocondrial

En todas las muestras se obtuvieron amplificadores de calidad 3 y 2, es decir, bandas íntegras con ausencia de barridos o con presencia de smears muy leves (Banco Nacional de ADN, s.f.) en gel de agarosa al 1% (Fig. 3) Esto fue posible al llevar las concentraciones del template de ADN entre 30 y 40 ng/ μ L. El tamaño correspondiente de las mismas fue de alrededor de 400 pb, hecho que fue verificado mediante secuenciación comercial a partir de las muestras ASCL003 Y ASCL005 (349 y 353pb). Cabe mencionar que la secuenciación de los amplificadores *coxI* para las muestras previamente mencionadas permitió obtener secuencias consenso que al ser sometidas a análisis Nucleotide BLAST, tuvieron, en el caso de ASCL003, un 100% de identidad con la región asociada al genoma mitocondrial de *Ascaris suum* reportado por Nesjum y colaboradores en 2016 (2017), con el haplotipo US1 descrito por Jesudoss-Chelladuri et al. en el mismo año y con los haplotipos H62 (Betson et al., 2014) y H28 (Betson et al., 2012) Para la secuencia consenso de ASCL005 los resultados fueron equivalentes.

6.2 Amplificación de Regiones Microsatélite en reacciones de PCR Multiplex -Heptaplex M1 y M2

Se ejecutaron 118 reacciones de PCR Multiplex (2 diferentes por cada muestra), resultando en 59 genotipos combinados (dos de ellos iguales ASCL023-ASCL032) para 14 loci. Los 7 genotipos restantes fueron incorporados a partir del trabajo inicial de estandarización de las reacciones Multiplex, por lo que se contó al final con 132 perfiles finales para la estructuración de la matriz alélica.

Los stutters fueron especialmente frecuentes en loci de dinucleótidos, como los del fluoróforo 6-FAM de la Multiplex 1 y 2. Se realizaron además reacciones de control de prueba con ADN de cerdo y humano los cuales resultaron negativos para todos los loci. De esta forma, se obtuvieron perfiles dobles claramente definidos y de fácil lectura tanto en tamaño como en altura. Se puede apreciar un ejemplo de los mismos en la Figura 4. Los tamaños alélicos

determinados mediante Electroforesis Capilar se encontraron entre 105.06 y 339.34, con alturas entre 30 y 9515 RFUs. Para considerar alelos verdaderos, se esperó que la proporción entre ambos resultara siempre menor a 5:1, aun cuando la proporción promedio entre los picos de heterocigotos fue de 1.6:1.

Una vez obtenidos los perfiles de acuerdo a tamaños, se estructuraron bins nuevos de lectura. De esta forma, los alelos identificados y sus microvariantes respectivas recibieron nombres basados en secuencia que los permitieron situarse en un rango alélico entre 2.1 y 51. Es importante mencionar que de las 826 lecturas (14 por muestra), cinco loci, en tres muestras porcinas diferentes, presentaron drop-out alélico, lo cual permitió sospechar la presencia de alelos nulos.

6.3 Diversidad Alélica

Se identificaron 267 alelos distintos, incluyéndose en este número las microvariantes respectivas, resultando en una media de 19 alelos por locus. El locus con menor número de alelos fue ALAC09 en la Multiplex 1 (13), mientras que ALGA20 fue el que presentó el mayor número de los mismos (31). En la Tabla 14 se muestra una comparación locus por locus del número de alelos reportados entre este estudio y el de Criscione (2007) junto con una comparación entre rangos alélicos basados en tamaño.

En total, se pudieron identificar 60 alelos compartidos entre *Ascaris* de cerdos y humanos, mientras que existieron 39 alelos de parásitos de humanos que no se encontraron representados en los genotipos porcinos. Dicha distinción se muestra en las Tablas 13 y 14.

Gracias a los perfiles, fue además posible el análisis forense de genotipos. En cuanto a la probabilidad de coincidencia para un análisis de muestras mixtas (de humanos y cerdos en conjunto) el menor de los valores fue de 3.3% para el locus ALGA47 (M2) y el mayor fue de 24.7% para ALTN02 (M1), con una media de MP de 0.127 para la M1 y 0.054 para la M2. Por

su parte, el Poder de Discriminación (PD), determinado como la diferencia entre la unidad y la probabilidad de coincidencia (1-MP) (Planz, 2004), fue establecido entre 75.3% (ALTN02) y 96.7% (ALGA47). El PD global fue de 0.883 para la M1 y de 0.946 para la M2. Con respecto al PIC, o coeficiente que describe la capacidad de un marcador para reflejar polimorfismos (Butler, 2005), se encontró en un rango comprendido entre 0.596 (ALTN02-M1) y 0.918 (ALGA20-M2).

El Poder de Exclusión, o indicador de la probabilidad de encontrar por azar genotipos globales exactamente iguales (Planz, 2004) fue de 3.189×10^{-8} para la M1 y M2 combinadas, o expresado en proporciones, de 1 en 31,355,948. De forma individual, se obtuvo un PE de 2.51×10^{-5} para la M1 y 1.27×10^{-3} para la M2. Así mismo, el índice típico de paternidad resultó en 3.07 para la M1 y 57.36 para la M2. La Tabla 12 muestra los valores correspondientes a los coeficientes y razones previamente descritos, así como a la H_o y Frecuencia Mínima, que fue de 0.0379 para muestras mixtas (de humanos y cerdos). Sin embargo, las H_o fueron recalculadas como parte del Análisis en Arlequín 3.5 juntos con las H_e . Fue notable que las heterocigocidades observadas para un análisis de muestras mixtas se encontraron entre 0.303 (ALGA32) y 0.848 (ALGA47), siendo siempre menores a la H_e . Por su parte, las heterocigocidades observadas exclusivamente en muestras porcinas fueron también siempre menores a las esperadas con un rango entre 0.315 (ALGA32) y 0.842 (ALGA47). En el caso de las muestras de parásitos de humanos, en dos loci (ALAC09, ALGA31) la H_o fue mayor a H_e . Para ALTN02 no fue posible en este caso ejecutar el cálculo por un 100% de individuos en homocigocidad. Tanto H_o como H_e pueden observarse por separado para *A.lumbricoides* y *A.suum* en las Tablas 15 y 16, acompañadas de la probabilidad y riesgo de alelos nulos, de las cuales fue notoria la de ALAC07, por tener el valor más alto para porcinos con 31.61% de riesgo. Los valores semejantes en *Ascaris* de origen humano fueron principalmente negativos. Las frecuencias alélicas asociadas a estos cálculos se presentan a manera de gráficas en los Anexos 4 y 5.

6.4 Amplificación y Secuenciación de Alelos STR de Interés

6.4.1 Alelos Nulos

Se identificaron alelos nulos exclusivamente en dos loci y en tres muestras porcinas, hallándose todos ellos en la Multiplex 2. De forma específica, fueron: Locus ALAC07, Muestra ASCL019; Locus ALAC07, Muestra ASCL026; Locus ALGA15, Muestra ASCL026 y Locus ALGA15, Muestra ASCL031. Para el caso de la muestra ASCL019, el Locus ALAC07, se obtuvo un amplificado con tamaño de 238.3 a una temperatura de 52.8°C. Por su parte, la muestra ASCL026 permitió obtener a 50.2°C un amplificado de 120 RFUs y un tamaño similar al anterior, de 238.29, es decir, correspondiente al mismo alelo (13 en notación estándar).

En el Locus ALGA15, muestra ASCL026 no se obtuvo un amplificado en la región destinada a una temperatura de annealing de 54.8°C, pero sí se observó un pequeño pico de altura considerable en el extremo izquierdo, sospechando de una posible inespecificidad. Sin embargo, en annealing a 52.8°C se observaron dos picos amplificados de 7200 y 4000 RFUs con tamaños respectivos de 299.74 (alelo 18.3) y 321.26 (alelo 24.1) (Fig.13). Finalmente, en el mismo locus, la muestra ASCL031 permitió observar un amplificado único de 3300 RFUs y un tamaño de 284.37 (alelo 15).

El análisis de homologías de los alelos en homocigocidad, a partir de la secuencia consenso proveniente del alineamiento en el software Geneious, permitió determinar que el alelo ALAC07-ASCL019 presentó un 91.9% de identidad por pares con el clon de ALAC07 (Criscione et al. 2007). Así mismo, el alelo ALAC07-ASCL026 tuvo un 93.4% de identidad por pares con el clon previamente mencionado.

Un análisis semejante para ALGA15 de la muestra ASCL031 ofreció un 90.4% de identidad por pares al compararse con la secuencia clonal del mismo estudio.

6.4.2 Alelos Fuera de Rango

Fue notoria además en ALAC07 la presencia de un amplificado de pequeña altura con tamaño aparente de 314 (alelo 51). Este que en un principio fue confundido con inespecificidades, sin embargo, se identificó en 13 muestras porcinas diferentes, algunas de las cuales parecían en primera instancia casos de drop-out alélico. En una de las muestras donde esta observación resultó más evidente, se realizaron reacciones de PCR a diferentes temperaturas de annealing como se describió en la sección 6.4.1. De esta forma, fue posible la visualización del amplificado.

El análisis de homología post secuenciación respectivo mostró un 99.1% de identidad con una muestra ecuatoriana de *A.lumbricoides* (LK872627) (NCBI, s.f.) y un 93.9% con el clon del estudio de Criscione (2007).

6.4.3 Alelo 7.2 en Humanos y Cerdos

En el locus ALTN02, en las 9 muestras humanas, se observó homocigocidad con respecto al alelo 7.2, con un tamaño de 245. Cabe mencionar que existieron individuos de origen porcino que también resultaron homocigotos para este alelo, así como varios heterocigotos. A pesar de que la muestra de parásitos de humanos es pequeña, fue notable que esta condición se compartiera entre todas las muestras, incluso en aquellas de origen hospitalario de la provincia de Pichincha. Tras la secuenciación y alineamiento de las muestras HASCL2.3 y HASCL5.1, se registró un 98.7% de identidad por pares con la muestra ecuatoriana de *A. lumbricoides* LK877441 y un 96.8% de identidad con el clon de ALTN02 de Criscione (2007). Al alinearse las dos muestras de este estudio no mostraron diferencia alguna a nivel de secuencia (Fig.5).

6.5 Ladder Alélica

Se obtuvieron dos Ladders Alélicas susceptibles a reamplificación (Una por cada PCR Multiplex). En las mismas, fue posible mostrar los alelos más representativos de cada región

microsatélite. Para ello, se consideró la frecuencia mínima, la cual fue comparada con la frecuencia alélica individual.

De esta forma, se logró la representación de 178 alelos con diferentes alturas.

La funcionalidad de las Ladder no se comprobó únicamente con la reamplificación de la misma, sino también con el uso de una muestra de genotipo conocido (ASCL011) para verificar la forma de asignación de alelos. Esta fue exitosa.

El producto final de las Ladders alélicas se observa en las Figuras 6 , 7 y 8.

7. DISCUSIÓN

Como punto de partida, es importante mencionar que la calidad del ADN de trabajo de las muestra fue aceptable, debido a la alta pureza con respecto a proteínas. A pesar de ello, en el 6% de las muestras, la pureza con respecto al contenido de compuestos fenólicos fue relativamente baja, considerando que los valores esperados para A260/230 se encuentran típicamente en el rango de 2.0 a 2.2 de acuerdo a los estándares del espectrofotómetro NANODROP 2000 (Thermo Fischer Scientific, 2007). Sin embargo, se estima que el ADN puede considerarse puro incluso hasta valores de 1.5 en técnicas de genética forense (Banco Nacional de ADN Carlos III, s.f.), por lo que se concluye que en aquellos casos específicos de valores menores, pudo haber existido contaminación asociada a la solución de extracción, presuntamente asociada a la fase de lavado. En contraposición, en otro 6% de las muestras donde los valores de calidad fueron superiores a 2.2, pudo haber ocurrido tanto contaminación con ARN, como problemas asociados al nivel de preservación de la muestra (Wilfinger et al., 1997).

Ya con respecto a la amplificación de dicho ADN, se debe destacar que los cebadores utilizados para la amplificación del exón III de β -actina son los mismos que los reportados en el estudio de Du Breuil, Patel y Mendelow (1993), para muestras inter específicas de mamíferos, siendo por ende, primers heterólogos aplicados en este estudio. Los mismos fueron utilizados debido a la alta conservación de dicha región entre diferentes organismos vivos y al uso extendido

de la misma como un control de PCR. Sin embargo, gracias al estudio de Huang et al., para *Ascaris suum* (2008), se pudo verificar que los primers empleados tienen una coincidencia de 5 en 20 bases para el primer Fw y 6 en 20 para el primer Rv con respecto a los utilizados en el ensayo, aun cuando, las no coincidencias se deben a transiciones. Por ende, se infiere que este locus génico puede servir como un excelente indicador de la calidad del ADN, pero se requerirían pasos adicionales de purificación para su uso como fuente de información genómica, sumados a la necesidad de una mayor especificidad de cebadores.

Como control aplicado en las 66 muestras de trabajo, la amplificación de ASCO1-COX1 resultó mucho más exitosa en comparación a la anterior, debido a la alta intensidad de las bandas, a su integridad, y a la ausencia de dímeros de primers. Ya en cuanto a la coincidencia en el alineamiento con los haplotipos H28 y H62, se puede afirmar que el resultado es coincidente con el origen conocido de los parásitos, pues estos son haplotipos eminentemente porcinos (Betson et al., 2014). Dichos haplotipos se caracterizan además por diferir en un único par de bases, de acuerdo al Minimum Spanning TCS Network de Betson y colaboradores, así como por pertenecer al Cluster de Haplotipos A del mismo estudio, donde si bien no hay una correlación geográfica directa, sí es posible encontrar mayoritariamente parásitos provenientes de cerdos. Puesto que en primera instancia el objetivo de la estandarización de la técnica fue la verificación del tipo y calidad del ADN utilizado, no se consideró utilizarla para análisis posteriores, debido a las cuestiones relacionadas a la posible pérdida de información con respecto a variabilidad genética en comparación con los STRs (Anderson, 2001; Ballard y Whittlock, 2004). Sin embargo, esto se reconsideró por cuestiones que se comentarán más adelante.

En la aplicación de las reacciones de PCR Multiplex con STRs específicos, la posibilidad de transmisión cruzada resultó mucho más evidente, especialmente por constatar la presencia de 60 alelos compartidos. De forma específica en cuanto a la lectura de amplificadores de microsatélites y a la generación de la ladder, fue posible la obtención de picos de amplificación nítidos y diferenciables en la mayor parte de los casos, a pesar de lo cual, fueron comunes dos tipos de

artefactos de origen biológico. El primero de ellos fueron los stutters (ALAC09, ALGA31), los cuales son artefactos visualizados como picos extra, debido a un menor contenido de bases que el original, usualmente -4 (Butler, 2005). Los segundos artefactos fueron picos de adenilación incompleta (ALAC31, ALGA47, ALGA48, ALGA15). Este último caso se debe a que la ADN polimerasa cataliza la adición de un nucleótido extra, usualmente una adenina, en el extremo 3' terminal de los productos de PCR de doble cadena (Butler, 2005). Fue posible la observación de un patrón trialélico no atribuible a contaminación de ADN de machos en el locus ALAC07, relacionado a inespecificidades producidas por un descenso de la temperatura de annealing. Este descenso fue intencional, para lograr una mayor amplificación del alelo nulo detectado, el cual, por su baja altura inicial se atribuyó a una mutación en el sitio de unión al primer.

Se tuvo especial precaución ante la posibilidad del apareamiento de trialelos asociados a contaminación, porque si bien en el ADN extraído a partir de parásitos machos esto no es un problema, puede suceder que al diseccionar una hembra y obtener tejido para la extracción, se tome por accidente también espermatozoides almacenados o huevos fertilizados que introduzcan errores en la genotipificación. Esto puede suceder al cortar junto con el tejido visceral ya sea útero, ovarios u oviductos, lo cual es muy común pues en *Ascaris* el primero constituye el 17% del peso corporal de las hembras (Anderson et al., 2003). Justamente, se ha determinado en el estudio citado que un 22.2% de picos erróneos pueden atribuirse a contaminación por tejido uterino, mientras que un 3.5% por tejido ovárico. Afortunadamente, al ser relativamente común el apareamiento de picos extra en electroferogramas, los criterios de rango de interpretación y umbral analítico (30RFUs), es decir, aquellos que permitieron distinguir entre alelos verdaderos y artefactos, facilitaron una diferenciación eficiente. En este estudio sucedió que existieron pocas muestras con contaminación de este tipo, por lo que fueron re extraídas y re amplificadas con réplicas respectivas.

En cuanto a artefactos producidos por causa del equipo, se observaron los denominados pull-up o falla de matriz en varias ocasiones. Estos son el resultado de una incapacidad del instrumento de detección de resolver correctamente los fluoróforos, originando un solapamiento

espectral entre estos (Butler, 2005; Graham, 2006). Sin embargo, estos fueron solucionables mediante la dilución del material de amplificación. En mínimo grado fue posible la observación de burbujas de fluoróforo o dye blobs que ocurren cuando dichos compuestos se separan de sus primers respectivos y migran independientemente en el capilar. A pesar de ello su presencia se redujo mediante la realización de réplicas de ensayo, puesto que no son reproducibles.

No obstante, la calidad final de los picos en los perfiles de amplificación Multiplex fue idónea para la determinación de genotipos legibles, a pesar de que en general, ciertos tipos de STRs que constituyeron los mapas de Multiplex utilizados, son conocidos por una propensión a los mismos. Esto se refiere particularmente a los STR con repeticiones de dinucleótido, los cuales presentaron una mayor tendencia a presentar artefactos asociados al fenómeno del deslizamiento de la polimerasa (Corach, 2005). Los dinucleotidos utilizados como parte de las PCR Multiplex utilizadas fueron ALAC09, ALGA31,ALGA32, ALAC08, ALAC32, ALGA20, ALGA47, ALAC07, ALGA48 y ALAC01, y pueden ser reconocibles porque en la matriz alélica cuentan únicamente microvariantes asignadas con notación decimal 0.1, es decir, un par de bases adicional al motivo de repetición (Butler, 2005). Los restantes fueron exclusivamente microsatélites con motivo central de tetranucleótidos, contando con microvariantes de notación 0.1 a 0.3 y una menor incidencia de artefactos.

Se infiere que aunque el 71.43% de los loci utilizados en el estudio fueron dinucleótidos, su tendencia natural a stutters fue reducida debido al uso de Taq Platinum, que cuenta con una actividad terminal transferasa no dependiente del template que añade una 3' deoxyadenosina al extremo final del producto, contando además con una actividad exonucleasa 5' 3' (Thermo Fischer, 2017), así como a las condiciones de estandarización (Burgos et al., 2017).

A esta problemática se suman también los alelos nulos o silenciosos, los cuales, debido a la alta calidad de amplificados obtenidos en la mayor parte de loci, se atribuyeron tanto a mutaciones en el sitio de inserción al primer como en su extremo 3' (Butler et al., 2005). Esto imposibilitó una amplificación directa como parte de las reacciones Multiplex. Lo anterior fue percibido

particularmente en el alelo 51 de ALAC07, el cual se puede considerar no sólo como un alelo nulo sino como un alelo off-ladder, debido a que es mayor al esperado dentro del rango alélico reportado en estudios previos (Criscione et al., 2007). La explicación más plausible a su apareamiento es la tendencia de las regiones microsatélite en los nematodos hacia el alargamiento, “*un proceso que pudo haber contribuido al incremento en el tamaño del genoma*” (Molnar et al., 2012). Lo anterior también es una explicación interesante para el apareamiento de microvariantes, que son repeticiones incompletas. Esto contribuyó a la estimación de un elevado número de alelos identificables, a pesar del tamaño pequeño de la muestra de trabajo.

Con respecto a esto último, se explica que en la comparación de número de alelos de la Tabla 11 se muestren valores similares a los reportados en el estudio de Criscione y colaboradores (2007), a pesar de las diferencias geográficas debido al ya mencionado 17% de contribución en la variabilidad dado por la localización (Anderson, 1997). Esto sucede con los loci ALGA20 y ALAC07, a pesar de que en este último posiblemente hay subestimaciones asociadas al conteo de alelos nulos. De igual forma, en aquellos loci donde se obtuvieron número mayores a los reportados por el autor, como lo son ALTN04, ALTN01, ALTN04, ALAC08 (M1) y ALGA47, ALGA48, ALAC01 y ALGA15 (M2), se considera que esto se debió a que Criscione se basó únicamente en tamaños alélicos para la asignación y conteo, mas no en secuencias, por lo cual es posible que dicho autor haya desestimado en número a las microvariantes en los casos previamente mencionados. Así, es posible inferir una gran diversidad alélica a pesar del tamaño en la muestra de trabajo.

Como parte de dicha variabilidad, que el análisis BLAST ofreciera coincidencias cercanas de las regiones analizadas con secuencias de *A. lumbricoides* y con clones de las librerías utilizadas para generar los primers empleados, es un punto de partida indirecto para afirmar posibilidades de transmisión entre humanos y cerdos. Dichas librerías fueron generadas a principalmente a partir del ADN de *Ascaris* humana proveniente de Bangladesh, Guatemala y Nepal (Criscione et al., 2007), por lo que al existir transferibilidad de los primers a muestras porcinas locales, así como

alelos compartidos entre muestras de humano y cerdo, se obtiene una nueva evidencia de la similitud entre ambos tipos de parásitos y de su cercanía a nivel genético.

Al ser el Poder de Exclusión total de 3.189×10^{-8} , por lo que la posibilidad de que un individuo tomado al azar en una población sea considerado como parental de otro, cuando en realidad no lo es (Martínez Jarreta, 1999) es de 1 en 31 millones, por lo cual, el poder de resolución de las dos Multiplex combinadas es idónea para procesos de identificación de individuos con una gran variedad de aplicaciones, desde la identificación de factores de riesgo de transmisión (que es uno de los objetivos principales de este estudio), hasta problemas relacionados a bioterrorismo, trazabilidad de grupos humanos y de ganado porcino, entre otros (Burgos et al., 2017).

Aunque el poder de exclusión combinado es muy alto, existen diferencias entre el PE de la M1 y la M2, siendo más alto el de la M1, 2.51×10^{-5} , versus 1.27×10^{-3} , las cuales no se reflejaron en la probabilidad de coincidencia. Esta última debe tener valores que mientras más cercanos a cero, aseguran una probabilidad menor de que dos genotipos coincidan sin parentesco real. En el caso de la M1 se reflejó esta posibilidad con un valor de 11.7%, mientras que en la M2 con 5.4%, sugiriendo que en general un mejor poder de resolución de la M2. Esto se atribuye al monomorfismo de las muestras humanas en el locus ALTN02 en M1. Por su parte, el índice típico de paternidad indicó que es 3.07 veces más probable encontrar a un individuo parental a partir de una muestra conocida en la M1, mientras que en la M2 este valor fue de 57.36 veces, reforzando lo anteriormente expuesto.

La contribución de ALTN02 para los coeficientes totales de la M1 se refleja en su PIC, que al ser de 0.596 indica que sólo es posible cubrir el 59.6% de diversidad con este locus, a diferencia del resto de loci que pueden explicar más del 70%, con un máximo de 91.8 con ALGA20, que por su número alélico también obtuvo el mayor valor de heterocigocidad esperada (0.922). Este, al igual que el resto de microsatélites, presentó valores menores de heterocigocidad observada para muestras mixtas, sugiriendo que existen procesos que generan desviaciones en el equilibrio de Hardy-Weinberg. Justamente, dicha reducción en la heterocigocidad es atribuible al efecto

Wahlund, que implica los resultados obtenidos debido a posibles estructuras en una subpoblación (Garnier-Géré y Chiki, 2013). Estas pueden ser causadas debido a barreras geográficas o flujo génico, considerando además la endogamia natural en los sistemas de vida parasíticos.

Por lo anterior, se entiende la presencia de un gran número de alelos raros, que además sugirió que *Ascaris* spp. puede tener marcas muy diversas en su genoma, incluso al ser comparado con parásitos de hospederos diferentes pero cercanos geográficamente, por lo que se refuerza lo anterior considerando los modelos de mutación de microsatélites (Lorente, 2004).

Los alelos raros justamente fueron excluidos de la ladder alélica al ser menores que la frecuencia mínima, considerando que esta es la potencial frecuencia del alelo menos común en un locus para una población específica, la se desarrolló para evitar modificar la base de datos de referencia cada vez que se observa un nuevo alelo, y más importante aún para evitar consignar un 0 en la frecuencia nueva (Sidore et al., 2015). Así, los alelos más frecuentes fueron reflejados con picos de amplificación más altos, siendo uno de estos justamente el alelo 7.2 de ALTN02.

Podría parecer que ante este tipo de información, lo anunciado por Betson con respecto a la no existencia de un marcador molecular ideal para la clasificación de muestras de *Ascaris* de humanos y cerdos continúa, sin embargo, se puede afirmar que el locus ALTN02 en combinación con los demás loci de la M1 , al evaluarse con muestras adicionales, sería una evidencia para contradecir dicho enunciado en la región geográfica en cuestión. Al ser todas las muestras de humanos no sólo homocigotas sino monomórficas para el alelo 7.2 y al observarse al mismo tanto en homocigocidad como en heterocigocidad en muestras de cerdo, es posible considerar a esta condición como un indicador de que grupo exclusivo de *Ascaris* spp., es decir, aquellos con el genotipo 7.2, 7.2 en el locus ALTN02, para la región geográfica en estudio, son los únicos capaces de parasitar a los dos hospederos posibles para el género. Dicho enunciado se refuerza al considerar los trabajos de Takata (1951), quien infectó a un grupo de voluntarios con *A. suum* y verificó diferencias con tendencia a la baja, en los patrones de recuperación de huevos del parásito con respecto a las esperadas. Esto sugiere que muy probablemente no todos los genotipos parasitarios

de *Ascaris* de origen porcino están adaptados para la vida en el huésped humano. Se entiende así que los parásitos con el genotipo monomórfico ALTN02 en su genoma, por factores desconocidos, podrían ser los únicos con la capacidad de sobrevivir. Se recalca que ante el tamaño pequeño de la muestra esta es una hipótesis, que deberá ser reforzada ante el cumplimiento a futuro de dicha condición en muestras de diverso origen y contexto, que debe corroborarse en estudios posteriores, frente a una mayor accesibilidad hacia parásitos de *Homo sapiens*.

Enfatizando sobre el contexto diverso de infestación en humanos, es necesario destacar que en áreas endémicas, la prevalencia de parasitosis intestinales en mujeres embarazadas oscila entre el 38 y el 90% (Rodríguez-García, 2002). Si bien esto no implica que las mujeres grávidas tengan susceptibilidad aumentada a este tipo de helmintiasis, la manifestación de los síntomas típicos como vómitos, diarrea, anemia, déficit de absorción de vitamina A, proteínas, grasa y lactosa e incluso las obstrucciones intestinales o viscerales en casos más severos, pueden reducir de forma significativa el aporte nutricional de madre a hijo. Esto último ha sido relacionado con transmisión placentaria e incluso prematuridad (Luoba, 2005) lo cual torna sumamente delicado el caso de la muestra HASCL6.1, que presentó justamente como hospedera a una mujer embarazada. Sin embargo, en muchos lugares del mundo este tipo de escenarios no es extraño.

Así, su uso en el genotipado podría mostrar pistas claras a las autoridades de salud si la fuente de contaminación es en realidad un lugar sospechoso en investigación, por ejemplo, debido a la contaminación de fuentes de agua de una comunidad por parte de los desechos de una granja de cerdos. La ventaja de este estudio, es que muestra un método sencillo de elaboración de ladders alélicas sin necesidad de recurrir a los usuales procedimientos de extracción de banda a partir de geles, donde la amplificación se da de forma directa a partir de reacciones de PCR. El contar con un estándar para asignación de genotipos en procesos de resolución de amplificadores es siempre útil, especialmente para la identificación rápida de alelos verdaderos con base en una notación conocida, y el mayor beneficio es que al ser de elaboración rápida, la inclusión de información nueva es posible. De esto se desprende también que el uso e implementación de Ladders Alélicas

en STRs es idónea no sólo para caracterizar casos de contaminación como los mencionados con anterioridad, sino también para proveer información sobre las posibles variaciones de sitio en la migración electroforética de la muestra (Schumm, 1997).

8. CONCLUSIONES

- *En este estudio se encontró que Ascaris spp. tiene una diversidad alélica alta, siendo un reflejo de esto tanto el número promedio de alelos por locus como el número máximo de alelos del locus ALGA48, lo cual se asocia indirectamente no solo con una gran adaptabilidad, sino con procesos de mutación que trascienden a la naturaleza de los marcadores moleculares en estudio.*
- *ALTN02 es un locus potencialmente monomórfico en parásitos de origen humano en la región en estudio. Los parásitos homocigotos para el alelo 7.2 de este locus serían los únicos capaces de infectar tanto a cerdos como a humanos. Al existir un conjunto identificable de parásitos, con independencia de cercanía geográfica, que es capaz de realizar esta acción, se desprende que existe efectivamente un tipo de zoonosis directa pero condicional en *Ascaris* para esta región. Esto no había sido reportado antes en muestras sudamericanas pero sí en muestras europeas, lo cual estaría asociado presuntamente a fenómenos recientes de especiación.*
- *Tanto la multiplex 1 como la multiplex 2 de Microsatélites para *Ascaris* utilizadas en el estudio tienen una resolución muy alta para la identificación de individuos parasitarios, lo cual es importante para la ampliación de la base de datos genotípica y un posterior análisis a nivel de localidades.*

- El uso de una Ladder Alélica para la tipificación de *Ascaris* spp. resulta un método muy eficiente para la genotipificación del parásito y entender la transmisión entre cerdos y humanos

9. RECOMENDACIONES

- Puesto que este se trata de un estudio piloto, es evidente que el tamaño de muestra para trabajos posteriores de diversidad genética, determinación de hospederos, identidad, niveles de endogamia y tipificación debe ampliarse, de tal forma que sea ahora posible comprender de mejor forma la diversidad genética del parásito dentro de comunidades y entre estas.
- Si bien en este trabajo fue posible la obtención de información preliminar y la caracterización de marcadores microsatélites para una pequeña muestra de estudio, no fue posible obtener información sobre la direccionalidad de la transmisión, para lo cual se aspira a la construcción de árboles filogenéticos basados en el linaje mitocondrial posteriormente.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agencourt Bioscience (s.f.) *AGENCOURT® AMPURE® XP PCR PURIFICATION*.
 Protocolo 000387v001. Disponible en Línea en:
https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/bibliography?docname=Protocol_000387v001.pdf
- Alejos-Velázquez, L., Aragón, M., Cornejo, A. (s.f.) Extracción y Purificación de ADN. En: *Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología*. UNAM
- Anderson, T., Jaenicke, J. (1997). Host specificity, evolutionary relationships and macrogeographic differentiation among *Ascaris* populations from humans and pigs. *Parasitology* 115 (Pt3):325-342
- Anderson, T. (2001). The dangers of using single locus markers in parasite epidemiology: *Ascaris* as a case study. *Trends in Parasitology*. 17 (4),183-188
- Anderson, J.D., Williams-Blanguero, S., Anderson, T. (2003). Spurious Genotypes in Female Nematodes Resulting From Contamination with Male DNA. *J. Parasitol.*, 89(6), 1232–1234
- Ansel, M., Thibaut, M. (1973). Value of the specific distinction between *Ascaris lumbricoides* Linne 1758 and *Ascaris suum* Goeze 1782. *Int. J. Parasitol* 3(3):317-319
- Ballard, J., Whithlock, M. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* 13:729-744
- Banco Nacional de ADN Carlos III. (s.f.). Programa de Control de Calidad de Muestras. FO-00.03-2. Universidad de Salamanca
- Beckman Coulter-Agencourt (s.f.). Agencourt CleanSEQ - Dye Terminator Removal. Catálogo. Disponible en Línea en:
https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsrportal.portal?_nfpb=true&_windowLabel=UCM_RENDERER&_urlType=render&wlpUCM_RENDERER_path=%252Fwrsr%252Fresearch-and-discovery%252Fproducts-and-services%252Fnucleic-acid-sample-preparation%252Fagencourt-cleanseq-dye-terminator-removal%252Findex.htm#2/10/0/25/1/0/asc/2/A29151///0/1/0/%2Fwsrportal%2Fwrsr%252Fresearch-and-discovery%252Fproducts-and-services%252Fnucleic-acid-sample-preparation%252Fagencourt-cleanseq-dye-terminator-removal%252Findex.htm/
- Bethony J, Brooker S, Albonico M, Geiger SM, Loukas A, et al. (2006) Soil transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *Lancet* 367: 1521–1532.
- Betson M., Nejsumc P., Bendall, R., Deb, R., Stothard, R. (2014). Molecular Epidemiology of Ascariasis: A Global Perspective on the Transmission Dynamics of *Ascaris* in People and Pigs. *J Infect Dis*. 210(6): 932–941.
- Betson, M., Nejsum, P., Llewellyn-Hughes, J., Griffin, C., Atuhaire, A., Arinaitwe, M., Adriko, M., Ruggiana, A., Turyakira, G., Kabatereine, N.B. and Stothard, J.R. (2012).

Genetic diversity of *Ascaris* in southwestern Uganda. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 106 (2), 75-83

- Burgos, G., Yanqui-Rivera, F., Mollocana, D., Camargo, M., Zapata, S., Arahana, V., Paz y Miño, C. (2017). Multiplex PCR in non-human DNA molecular identification of *Ascaris* spp. in forensic biology. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2017.09.227>
- Butler, J. (2004) Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. *Electrophoresis*. 25: 1397–1412
- Butler, J. (2005) *Forensic DNA Typing: Biology, Technology and Genetics of STR Markers*. (2da Ed.): Elsevier Academic Press
- Caballero, D., García-Valdés, R., Salabarría-Fernández, M. (2011). Presence of *Ascaris lumbricoides* in the heart of a pregnant woman. *Rev. Cubana Obstet. Ginecol.*, 37 (2), 243-250
- Cadena-Meneses, J., Castillo-Morales, A. (2002). Comparación de Diferentes Métodos para la Estimación de Componentes de Varianza. *Agrociencia* 36(6):713-723
- Cavallero, S., Snabel, V., Pacella, F., Perrone, V., & D'Amelio, S. (2013). Phylogeographical Studies of *Ascaris* spp. Based on Ribosomal and Mitochondrial DNA Sequences. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(4), e2170. doi:10.1371/journal.pntd.0002170
- CDC. (2015). Parasites - Ascariasis. Disponible en Línea en: <https://www.cdc.gov/parasites/ascariasis/biology.html>
- Cerrillo, M., García, P., del Valle, M., Navarro, A., Amezcua, A., González de Merlo, G. (2005). *Ascaris lumbricoides* as a cause of incoercible vomiting in 13-week pregnant woman. *Prog. Obstet. Ginecol.*, 48, 457-460
- Corach, D., 2005: “Actualización en técnicas moleculares de identificación humana”; Libronauta, Buenos Aires
- Cooper, G. M., Hausman, R. (2007). Capítulo 12: The Cytoskeleton and Cell Movement. En: *The cell: a molecular approach*. ASM Press, Washington.
- Cooper P. et al. (2003). *Allergic Symptoms, Atopy, and Geohelminth Infections in a Rural Area of Ecuador*. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*; 168:313-317
- Criscione CD, Anderson JD, Raby K, et al. (2007) Microsatellite markers for the human nematode parasite *Ascaris lumbricoides*: Development and assessment of utility. *J Parasitol.*; 93:704
- Das, A. (2014). Hepatic and Biliary Ascariasis. *J Glob Infect Dis.* 6(2): 65–72.
- Das, K., Chowdhury, P., Ganguly, S. (2015). Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1) based sequence typing reveals phylogenetically distinct *Ascaris* population. *Comput. Struct. Biotechnol J.* 13: 478–483.

- Dovichi, N., Zhang, J. (2000). How Capillary Electrophoresis Sequenced the Human Genome. *GDCH 39(24):4463-4468*
- Du Breuil, R.M., Patel, J.M., Mendelow, B. (1997) Quantitation of β -Actin-specific mRNA Transcripts Using Xeno-competitive PCR. *GDCH 39(24):4463-4468*
- Excoffier, L. (2015). Arlequin ver 3.5 22. Institute of Ecology and Evolution, University of Berne. Swiss Institute of Bioinformatics.
- Frantz, L., Schraiber, J., Madsen, O., Megens, H-J., Cagan, A., Bosse, M., et al. (2015). *Evidence of long-term gene flow and selection during domestication from analyses of Eurasian wild and domestic pig genomes. Nature Genetics, Advanced Online Publication. doi:10.1038/ng.3394*
- Garnier-Géré, P., Chiki, L. (2013). Population Subdivision, Hardy–Weinberg Equilibrium and the Wahlund Effect. *Encyclopedia of Life Sciences. WILEY*
- Gasbarre, L. (2014). Anthelmintic resistance in cattle nematodes in the US. *Veterinary Parasitology 204, 3-11*
- Geyer, L., Palumi, S. (2005). Conspecific sperm precedence in two species of tropical sea urchins. *Evolution 59(1):97-105*
- Gonçalves, M. L., Araújo, A., Ferreira, L.F. (2003). Human intestinal parasites in the past: new findings and a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz 2003, 98(1):103-118*
- Graham, K. (2006). Capillary electrophoresis: a versatile family of analytical techniques. *Biotechnology and Applied Biochemistry 27:9–17*
- Hauser, P. C. (2016). "Chapter 2. Determination of Alkali Ions in Biological and Environmental Samples". In Astrid, Sigel; Helmut, Sigel; Roland K.O., Sigel. *The Alkali Metal Ions: Their Role in Life. Metal Ions in Life Sciences. 16. Springer. pp. 11–25.*
- Harrison, R., (2014). Hybridization, Introgression, and the Nature of Species Boundaries. *Journal of Heredity. 105: 795–809*
- Hedrick, P. (2005). *Genetics of populations. 3ra Ed. Jones and Bartlett, Boston: pp.737*
- Hinojosa, L. (2005). *Busqueda de quistes y huevos de parasitos intestinales en aguas de pozo de San Gregorio Zacapechpan, Mpo. de Cholula, Puebla. Colección de Tesis Digitales: Universidad de Las Américas Puebla. Disponible en Línea en: <*
http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lqf/hinojosa_s_le/
- Hobson, D., Smerick, J., Smith, J. (2001). STR analysis by Capillary Electrophoresis: Development of Interpretation Guidelines for the PROFILER PLUS™ and the COFILER™ systems for use in Forensic Science. DNAU I, FBI Laboratory, Washington, D.C.
- Huang, C.Q., Gasser, R., Cantacessi, C., Nisbet, A., Zhong, W., Sternberg, P., Loukas, A., Mulvenna, J., Lin, R.Q., Chen, N., Zhu, X.G. (2008). Genomic-

Bioinformatic Analysis of Transcripts Enriched in the Third-Stage Larva of the Parasitic Nematode *Ascaris suum*. PLOS Neglected Tropical Diseases 2(6):e246

James, H.R., Kelly, L.A., Pochan, S.L., Commins, S.P., Workman, L.J., Nganga, L.W., Cooper, Philip and Platts-Mills, T.A.E. (2012) 'Parasite-related IgE Antibodies, Including IgE to Galactose-alpha-1,3-galactose, in Sera from Virginia and Ecuador'. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Vol 129, Issue 2, AB82.

Jesudoss-Chelladurai, C., Murphy, K., Snobl, T., Bader, C., West, C., Thompson, K., Brewer, M.T. (2016). Molecular epidemiology of *Ascaris* infecting pigs in Iowa, *J Infect Dis* 215 (1), 131-138.

Jhonson, M. (2017). *Loading Controls for Western Blots*. Synatom Research, Princeton. En: Labome. Disponible en Línea en: <https://www.labome.com/method/Loading-Controls-for-Western-Blots.html>

Jhonstone, C. (2000). *Ascaris suum life cycle*. En: Parasites and Parasitic diseases of Domestic Animals-The Nematodes. University of Pennsylvania. Disponible en Línea en: http://cal.vet.upenn.edu/projects/merial/Ascarids/Asc_15a.html

Krüken, J., Fraundorfer, K., Mugisha, J.-C., Ramünke, S., Sifft, K., et. al (2017). Reduced efficacy of albendazole against *Ascaris lumbricoides* in Rwandan schoolchildren. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 7 (3), 262-271

Lafontaine, D. L. J.; Tollervey, D. (2001). *The function and synthesis of ribosomes*. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2 (7): 514–520

Lebedev, A., Paul, N., Yee, J., Timoshchuck, V., Shum, V., Miyagi, K., Kellum, J., Hogrefe, R., Zon, G. (2008). Hot Start PCR with heat-activatable primers: a novel approach for improved PCR performance. *Nucleic Acids Res.* 36(20): e131.

Leles, D., Reinhard, K., Fugassa, H., Iñiguez, A., Araujo, A. (2010). A parasitological paradox: Why is ascarid infection so rare in the prehistoric Americas. *Archaeol. Sci.*, 37, 1510-1520.

Leles, D., Gardner, S., Reinhard, K., Iñiguez, A., Araujo, A. (2012). Are *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* a single species?. *Parasites and Vectors*, 5 (42)

Liu GH, Wu CY, Song HQ, Wei SJ, Xu MJ, Lin RQ, Zhao GH, Huang SY, Zhu XQ. (2012) Comparative analyses of the complete mitochondrial genomes of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* from humans and pigs. *Gene* 492: 110–116.

Lorente, J. (2004). Un detective llamado ADN, tras las huellas de criminales, desaparecidos y personajes históricos. Ed. Temas de Hoy S.A, Madrid

Luoba, A., Geissler, P., Estamble, B. (2005). Geophagy among pregnant and lactating women in Bondo District, western Kenya. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004;98:734–741.

Martinez Jarreta, B. (1999) “ADN en medicina forense: La Genética al servicio de la ley en el análisis de indicios criminales y en la investigación biológica de la paternidad”; Mason Ed. S.A., Barcelona

- Molento, M.B., Antunes, J., Bentes, R. N., Coles, G.C. (2008). Anthelmintic resistant nematodes in Brazilian horses. *The Veterinary Record* 162,384-385
- Molnar, R., Witte, H., Dinkelacker, I., Villate, L., Sommer, R. (2012). Tandem-Repeat Patterns and Mutation Rates in Microsatellites of the Nematode Model Organism *Pristionchus pacificus*. *Genes Genomes and Genetics* 2(9): 1027–1034.
- Murray, C., Vos, T., Lozano, R., Naghavi, M., Flaxman, A., et. al (2013). Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*, 380 (9859), 2197-2223
- Myers, P., R. Espinosa, C. S. Parr, T. Jones, G. S. Hammond, and T. A. Dewey (2008). Genus *Ascaris* (intestinal roundworms). ADW - University of Michigan Museum of Zoology. Disponible en Línea en: http://animaldiversity.org/accounts/Ascaris_lumbricoides/classification/
- Nesjum, P., Frydenberg, J., Roepstorff, A., Parker, E. (2005). Population structure in *Ascaris suum* (Nematoda) among domestic swine in Denmark as measured by whole genome DNA fingerprinting. *Hereditas* 142:7-14
- Nesjum, P., Hawash, M.B.F., Betson, M., Russel Stodhart, J., Gasser, R., Andersen, L. (2017). *Ascaris* phylogeny based on multiple whole mtDNA genomes. *Infection, Genetics and Evolution* 48: 4–9
- Planz, J. (2004). Forensic Statistics from the ground up. UNT Health Science Center at Fort Worth. 15th International Symposium on Human Identification.
- Rodríguez-García, R. (2002) Prevalence and risk factors associate with intestinal parasitoses in pregnant women and their relation to the infant's birth weight. *Ginecol. Obstet. Mex.*, 70,338-43.
- Sambrook, J., Russel, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed. edición). Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schumm, M. (1997). Why Use a Size Marker and Allelic Ladders in STR Analysis?. *GenePrint: Profiles in DNA*. Disponible en Línea en: < <https://www.promega.com/-/media/files/resources/profiles-in-dna/102/why-use-a-size-marker-and-allelic-ladders-in-str-analysis.pdf?la=en>
- Scott, M. (2008). *Ascaris lumbricoides*: Una revisión de su epidemiología y su relación con otras infecciones. *Annales Nestlé* 66:7-22. DOI: 10.1159/000151269
- Sidore, C., et al. (2015). Genome sequencing elucidates Sardinian genetic architecture and augments association analyses for lipid and blood inflammatory markers. *Nature Genetics*. 47: 1272–1281.
- Sirvent, M.B., Gómez, C. (2012). Marcadores moleculares basados en PCR: Marcadores SSR o STR (Simple Sequence Repeats or Short Tandem Repeats). Universidad Politécnica de Valencia. Disponible en Línea en: < <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/16743/SSR.pdf.pdf?sequence=1>

- Spooner, D., van Treuren, R., de Vicente, M.C. (2005) Molecular markers for Genebank management. CGN, IPGRI, USDA. 126 p.
- Sparks, A.M., Betson, M., Oviedo, G., Sandoval, C., Cooper, P.J. Stothard, J. (2015). Characterization of *Ascaris* from Ecuador and Zanzibar. *J Helminthol* 89(4): 512–515.
- Sprent, J.F.A. (1952). Anatomical distinction between human and pig strains of *Ascaris*. *Nature* 170 (4328)627-8
- Thermo Fischer, (2017). Platinum ® Taq DNA Polimerase. Disponible en Línea en:<
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/10966018>
- Thermo Fischer Scientific, (2007). 260/280 and 260/230 Ratios. T042-TECHNICAL BULLETIN. NanoDrop Spectrophotometers
- Van Asch, B., Alves, C., Gusmao, L., Pereira, V., Pereira, F., Amorim, A. (2009). A new autosomal STR nineplex for canine identification and parentage testing. *Electrophoresis* 30, 417-423
- Vilas, R. Criscione, C., Blouin, M. (2005). A comparison between mitochondrial DNA and the ribosomal internal transcribed regions in prospecting for cryptic species of platyhelminth parasites. *Parasitology* 131: 839-846
- WHO.(2013). Soil-transmitted helminthiases: number of children treated in 2011. *Wkly. Epidemiol. Rec.*, 88,145-151
- WHO, (2017). Helminthiasis transmitidas por el Suelo. Disponible en Línea en:<
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs366/es/>
- Whittaker, J., Carlson, S.D., Jones, D.E., Brewer, M. (2016). Molecular mechanisms for anthelmintic resistance in strongyle nematode parasites of veterinary importance. *J. Vet. Pharmacol. Ther*, 40 (2),105-115
- Wilfinger,W., Mackey, K., Chomczynski, P.(1997). Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity. *BioTechniques* 22:474-481
- Yanqui-Rivera, F. (2017). Estandarización de PCR Multiplex para la caracterización de *Ascaris* spp. de parásitos adultos aislados de cerdos. (Tesis de Pregrado). Universidad San Francisco de Quito

TABLAS

Tabla 1. Condiciones de reacción para la Amplificación del exón III de β -actina a partir de ADN de *Ascaris* spp.

REACTIVOS	C ₁	C ₂	V ₁ (V ₂ =10 μ L) [μ L]	MASTERMIX (6 R _x N)
<i>Buffer</i>	5X	1X	2.0	12.0
<i>dNTPs</i>	2mM	0.2mM	1.0	6.0
<i>TaqPol</i>	5U/ μ l	1U	0.1	1.2
<i>Primer F</i>	10 μ M	0.5 μ M	0.5	3.0
<i>Primer R</i>	10 μ M	0.5 μ M	0.5	3.0
<i>MgCl₂</i>	25mM	2mM	0.8	4.8
<i>H₂O</i>	-	-	4.1	24.0
<i>ADN</i>	25-35 [ng/ μ L]	-	1.0	-
TOTAL	-	-	10.0 μ L	54.0 μ L

Tabla 2. Programa de Amplificación para la amplificación del exón III de β -actina a partir de ADN de *Ascaris* spp.

Etapa	Temperatura [°C]	Tiempo	Ciclos[X]
<i>Denaturación Inicial</i>	94	2 min	1
<i>Denaturación</i>	92	50 s	35
<i>Annealing</i>	45	50 s	
<i>Extensión</i>	72	50 s	
<i>Extensión Final</i>	72	2 min	1

Tabla 3. Condiciones de reacción para la Amplificación de la región ASCO1-COX1 a partir de ADN de *Ascaris* spp.

REACTIVOS	C ₁	C ₂	V ₁ (V ₂ =30 μ L) [μ L]
<i>Buffer</i>	5X	0.5X	3.0
<i>dNTPs</i>	2mM	0.2mM	3.0
<i>TaqPol</i>	5U/ μ l	0.2U	0.3
<i>Primer F</i>	50 μ M	0.4 μ M	0.24
<i>Primer R</i>	50 μ M	0.4 μ M	0.24
<i>MgCl₂</i>	25mM	2.5mM	3.0
<i>H₂O</i>	-	-	16.92
<i>ADN</i>	30-40 [ng/ μ L]	-	3.0
TOTAL	-	-	30.0 μ L

Tabla 4. Programa de Amplificación para la amplificación del exón III de β -actina a partir de ADN de *Ascaris* spp.

Etapa	Temperatura [°C]	Tiempo	Ciclos[X]
<i>Denaturación Inicial</i>	92	3 min	1
<i>Denaturación</i>	92	10 s	30
<i>Annealing</i>	50	30 s	
<i>Extensión</i>	60	1 min	
<i>Extensión Final</i>	60	10 min 10 s	1

Tabla 5. Condiciones de Preparación de los Mastermix de Primers Fluoromarcados M1 y M2 para regiones Microsatélite

MULTIPLEX 1		FORWARD				REVERSE			
FLUOROCROMO	LOCUS	C1 [μM]	V1 [μL]	V2 [μL]	C2 [μM]	C1 [μM]	V1 [μL]	V2 [μL]	C2 [μM]
6-FAM	ALAC09	100	4,06	60	6,767	80	13,53	60	6,765
6-FAM	ALGA31	100	2,475	60	4,125	100	2,48	60	4,133
VIC	ALGA32	100	1,4	60	2,333	10	14	60	2,333
VIC	ALTN02	50	1,59	60	1,325	10	7,95	60	1,325
NED	ALTN01	100	1,01	60	1,683	30	3,37	60	1,685
PET	ALTN04	25	1,24	60	0,516	5	3,1	60	1,032
PET	ALAC08	100	1,825	60	3,042	50	3,65	60	3,042
MULTIPLEX 2		FORWARD				REVERSE			
FLUOROCROMO	LOCUS	C1 [μM]	V1 [μL]	V2 [μL]	C2 [μM]	C1 [μM]	V1 [μL]	V2 [μL]	C2 [μM]
6-FAM	ALAC32	100	1,84	60	3,067	100	1,84	60	3,067
6-FAM	ALGA20	100	2,2	60	3,667	20	11	60	3,667
VIC	ALGA47	50	1,52	60	1,267	10	7,6	60	1,267
VIC	ALAC07	50	1,448	60	1,207	50	1,448	60	1,207
NED	ALGA48	100	1,416	60	2,36	10	14,16	60	2,366
PET	ALAC01	50	1,376	60	1,147	10	6,88	60	1,147
PET	ALGA15	100	1,76	60	2,933	30	5,867	60	2,933

Tabla 6. Programa de Amplificación Simultáneo de las Reacciones de PCR M1 y M2 para ADN de *Ascaris* spp.

Etapa	Temperatura [°C]	Tiempo	Ciclos[X]
Hot-Start	95	15 min	1
<i>Denaturación</i>	94	45 s	30
<i>Annealing</i>	54.8	1 min	
<i>Extensión</i>	72	1 min 15 s	
<i>Extensión Final</i>	72	1h	1
<i>Cierre</i>	4.0	10 min	1

Tabla 7. Condiciones de Amplificación de Regiones Microsatélite Pre-Secuenciación

REACTIVOS	C₁	C₂	V₁(V₂=16.5μL) [μL]
<i>AB® Multiplex PCR Mastermix 2X</i>	2X	1X	7.5
<i>H₂O</i>	-	-	1.5
<i>Primer F</i>	10μM	0.45 μM	0.75
<i>Primer R</i>	10μM	0.45 μM	0.75
<i>ADN</i>	10 [ng/ μL]	-	1.5
TOTAL		-	16.5

Tabla 8. Programa en Termociclador para Regiones Microsatélite Pre-Secuenciación

Etapa	Temperatura [°C]	Tiempo	Ciclos[X]
Hot-Start	95	3 min	1
<i>Denaturación</i>	94	45 s	40
<i>Annealing</i>	54.8	1 min	
<i>Extensión</i>	72	1 min 15 s	
<i>Extensión Final</i>	72	1h	1
<i>Cierre</i>	4.0	10 min	1

Tabla 9. Condiciones de PCR de Secuencia

REACTIVOS	C₁	C₂	V₁(V₂=6.5μL) [μL]
<i>Agua MQ</i>	-	-	1.8
<i>BigDye Buffer</i>	5X	1X	1.0
<i>BigDye Terminator MIX</i>	-	-	0.5
<i>Primer F o R</i>	1μM	0.28 μM	1.8
<i>ADN</i>	Amplicón	-	1.5
TOTAL	-	-	6.5 μL

Tabla 10. Programa de Amplificación para reacciones de PCR de Secuencia

Etapa	Temperatura [°C]	Tiempo	Ciclos[X]
Hot-Start	96	3 min	1
<i>Denaturación</i>	96	10 s	25
<i>Annealing</i>	50.5	5s	
<i>Extensión</i>	60	4 min	
<i>Cierre</i>	4.0	10 min	1

Tabla 11. Comparación entre los rangos y número de alelos observados en este estudio y el estudio de Criscione et al. (2007) para cada locus utilizado en los perfiles de STR-PCR Multiplex para *Ascaris* spp.

		Rango alélico previo	Rango alélico (este estudio)	Tamaño de Amplicon Reportado (Este estudio y Criscione)	Numero de Alelos (Criscione)	Numero de Alelos (este estudio)	Diferencia
MULTIPLEX 1	ALAC09	182-232	179-201	182-261	14	13	-1
	ALGA31	292-344	288-318	420-424	16	14	-2
	ALGA32	99-299	150-211	195-352	23	19	-4
	ALTN02	221-286	232-292	244-365	10	13	3
	ALTN01	156-284	149-254	204-305	15	16	1
	ALTN04	148-232	141-205	107-270	13	17	4
	ALAC08	300-377	302-339	472-503	25	19	-6
MULTIPLEX 2	ALAC32	107-157	105-131	243-385	20	16	-4
	ALGA20	208-338	203-268	210-266	31	31	0
	ALGA47	147-227	149-197	183-212	20	24	4
	ALAC07	221-286	219-314	227-247	18	18	0
	ALGA48	194-233	190-298	204-248	12	22	10
	ALAC01	184-254	180-236	184-323	26	26	0
	ALGA15	286-345	284-331	302-364	15	19	4

Nota: Los colores gris (0), verde brillante (mucho mayor), verde opaco (mayor) y celeste (menor), hacen alusión a la diferencia de alelos entre los dos estudios.

Tabla 12. Coeficientes estadísticos forenses de acuerdo a un análisis mixto (Muestras de cerdos y humanos) para *Ascaris* spp.

Alelos	MULTIPLEX 1							MULTIPLEX 2						
	ALAC09	ALGA31	ALGA32	ALTN02	ALTN01	ALTN04	ALAC08	ALAC32	ALGA20	ALGA47	ALAC07	ALGA48	ALAC01	ALGA15
MP	0,115	0,115	0,123	0,247	0,067	0,096	0,060	0,042	0,038	0,033	0,079	0,049	0,039	0,101
PD	0,885	0,885	0,877	0,753	0,933	0,904	0,940	0,958	0,962	0,967	0,921	0,951	0,961	0,899
Ho	0,621	0,606	0,303	0,561	0,379	0,606	0,773	0,771	0,773	0,848	0,379	0,667	0,803	0,576
PIC	0,748	0,718	0,795	0,596	0,855	0,746	0,821	0,872	0,918	0,907	0,857	0,861	0,892	0,749
PE	0,317	0,30	0,065	0,246	0,102	0,298	0,549	0,547	0,549	0,692	0,102	0,379	0,605	0,263
TPI	1,32	1,27	0,717	1,14	0,80	1,27	2,20	2,19	2,20	3,30	0,80	1,50	2,54	1,18
MF	0,0379	0,0379	0,0379	0,0379	0,0379	0,0379	0,0379	0,0379	0,0379	0,0379	0,0379	0,0379	0,0379	0,0379

MP=Matching Probability

PD=Poder de Discriminación

**Ho=Heterocigocidad
observada**

PIC=Contenido de Información

Polimórfica

PE=Poder de

Exclusión

TPI=Typical Paternity Index

MF=Frecuencia

Mínima

Tabla 13. Distinción entre alelos compartidos entre *Ascaris* spp. de humanos y cerdos, Multiplex 1

MULTIPLEX 1												
ALAC09	ALGA31		ALGA32		ALTN02		ALTN01		ALTN04		ALAC08	
	8,1	14,1	8	19,3		4,1	5,3	21	2,3	16,2	7	20
	9,1	16,1	8,1	20		5	7,2	29,2	4	17,1	9	21
	11	17	9,2	20,2		5,1	8,2	31,3	5	18,2	10	22,1
	12	19	10,1	20,3		7,2	8,3		6		11	23
	13	19,1	11,2	21,3		8	11,1		6,1		12	26
	13,1	20	13	23,2		8,2	13,1		7,1		12,1	
	14	21,1	14			8,3	14,1		8		13	
	14,1	22,1	14,2			9,1	15		8,1		14	
	15	24,1	15,2			9,3	16		9		15	
	16	25	16,2			10,2	17		11,1		15,1	
	16,1	25,1	17			10,3	17,1		12,1		16	
	17	28	18			18,1	18		14,3		17	
	18,1	29	18,2			19,2	19		15,1		18	
	19,1	30,1	19,2				20		16,1		19	

- En celeste se muestran los alelos compartidos, mientras que en naranja aquellos identificados exclusivamente en muestras humanas

Tabla 14. Distinción entre alelos compartidos entre *Ascaris* spp. de humanos y cerdos, Multiplex 2

MULTIPLEX 2														
ALAC32		ALGA20			ALGA47		ALAC07		ALGA48		ALAC01		ALGA15	
3	28,1	14,1	30	42	15,1	30	2,1	14,1	23,1	36	5	22,1	15	24,1
18,1	30	16	30,1	44	19	31	4	17,1	24	36,1	7	23	18,1	24,3
21,1	31	17	31	44,1	21,1	33	4,1	27	25,1	37,1	7,1	24	18,2	25,1
22	32	17,1	32	47	22	34	5,1	29	26	38	9,1	25	18,3	26
22,1		18	33		22,1	35	6	51	28	38,1	12,1	25,1	19	26,1
23,1		19	33,1		23	36	7		28,1	39	13,1	26	19,1	26,3
24		20,1	34		23,1	37	8		29	40	14,1	27	19,2	
24,1		24	35		24	37,1	8,1		29,1	40,1	15,1	28	19,3	
25,1		25	36		24,1	38,1	9,1		30	41,1	16	29,1	20	
26		26	37		25	39	10		31		16,1	30,1	21,1	
26,1		26,1	38		26		10,1		31,1		17	31,1	21,3	
27		27	39		27		11,1		33		20	32	22,1	
27,1		28	40		28		13		34,1		21	32,1	22,3	
28		29	41		29		13,1		35		22		23,3	

- En celeste se muestran los alelos compartidos, mientras que en naranja aquellos identificados exclusivamente en muestras humanas

Tabla 15. Heterocigocidad Observada, Esperada, Probabilidad de Alelos Nulos y Riesgo de Alelos Nulos en *Ascaris* spp. de cerdos

		Ho	He	r	Riesgo alelos nulos (%)	p
MULTIPLEX 1	ALAC09	0,59649	0,76556	0,095759986	9,57599855	0
	ALGA31	0,57895	0,75873	0,102221489	10,22214894	0
	ALGA32	0,31579	0,80112	0,269460114	26,94601137	0
	ALTN02	0,64912	0,69306	0,025953008	2,595300816	0
	ALTN01	0,40351	0,85158	0,241993325	24,19933246	0,093
	ALTN04	0,61404	0,71728	0,060118327	6,011832666	0,01324
	ALAC08	0,77193	0,8286	0,030990922	3,099092202	0,00013
MULTIPLEX 2	ALAC32	0,73684	0,8716	0,072002565	7,200256465	0
	ALGA20	0,75439	0,91352	0,083160876	8,316087629	0
	ALGA47	0,84211	0,9084	0,034735904	3,473590442	0
	ALAC07	0,2807	0,87269	0,316117457	31,61174567	0
	ALGA48	0,68421	0,88325	0,105689632	10,56896323	0
	ALAC01	0,80702	0,88356	0,040635817	4,063581728	0
	ALGA15	0,54386	0,72302	0,103980221	10,39802208	0,00063

Tabla 16. Heterocigocidad Observada, Esperada, Probabilidad de Alelos Nulos y Riesgo de Alelos Nulos en *Ascaris* spp. de humanos

		Ho	He	r	Riesgo alelos nulos (%)	p
MULTIPLEX 1	ALAC09	0,77778	0,82353	0,025088702	2,508870158	>
	ALGA31	0,77778	0,5817	-0,123967883	-12,39678827	>
	ALGA32	0,22222	0,9085	0,359591302	35,95913021	0,00025
	ALTN02	LOCUS MONOMORFICO				>
	ALTN01	0,11111	0,84314	0,397164621	39,71646212	0
	ALTN04	0,55556	0,82353	0,146951243	14,69512429	0,0304
	ALAC08	0,77778	0,81699	0,021579645	2,157964546	>
MULTIPLEX 2	ALAC32	1	0,9085	-0,047943411	-4,794341106	1
	ALGA20	0,88889	0,95425	0,033445056	3,344505565	>
	ALGA47	0,88889	0,86275	-0,014033016	-1,40330157	>
	ALAC07	0,88889	0,7451	-0,082396424	-8,239642427	>
	ALGA48	0,55556	0,80392	0,137677946	13,76779458	>
	ALAC01	0,77778	0,95425	0,090300627	9,030062684	>
	ALGA15	0,77778	0,9281	0,077962761	7,796276127	>

FIGURAS

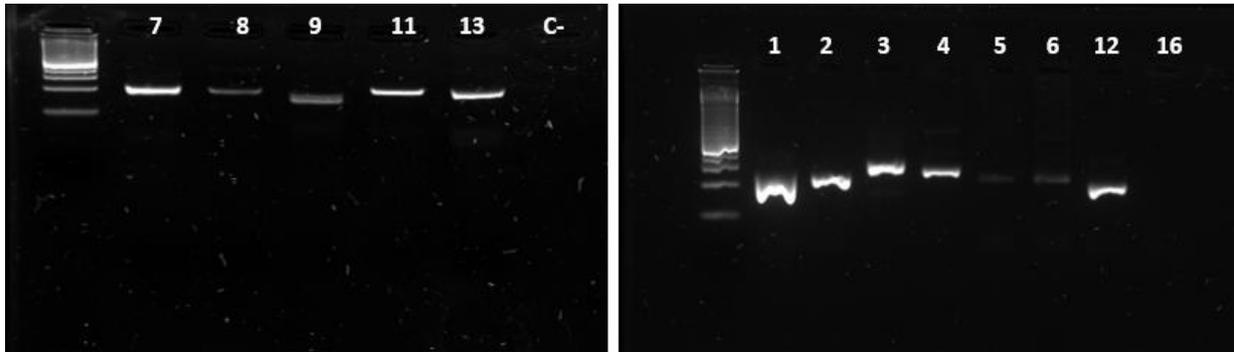


Figura 1. Electroforesis en Gel de Agarosa al 2% con productos de PCR purificados por AMPure para varios microsatélites. **1.** ALTN02-HASCL2.3 (Alelo 7.2, humanos). **2.** ALTN02-HASCL5.1 (Alelo 7.2, humano de localidad diferente). **3.** ALGA15-ASCL026 (heterocigoto). **4.** ALGA15-ASCL03. **5.** ALAC07-ASCL019. **6.** ALAC07-ASCL026. **7.** ALAC01-ASCL032 (Alelo 5). **8.** ALGA48-ASCL004 (Alelo 23.1). **9.** ALTN01-HASCL3.1 (Alelo 5.3). **11.** ALGA20-ASCL004 (Alelo 17). **12.** ALAC07-ASCL032 (Alelo 51). **13.** ALAC07-ASCL032 (Alelo 51-duplicado). **16.** CONTROL NEG. Con Primers ALAC07. Puede notarse un corrido irregular en el gel de la derecha, el cual está asociado a un tiempo prolongado de corrida a voltaje normal (100V-45 min), sin embargo, el gel de la izquierda (100V-30 min) presenta bandas nítidas y limpias.



Figura 2. Electroforesis en Gel de Agarosa al 1% con productos de PCR amplificados para el exón III de β -actina a partir de ADN de *Ascaris* spp. Como control interno se ha incluido a la muestra 294, constituida por ADN extraído de heces que dieron positivo por microscopía para *Ascaris*.

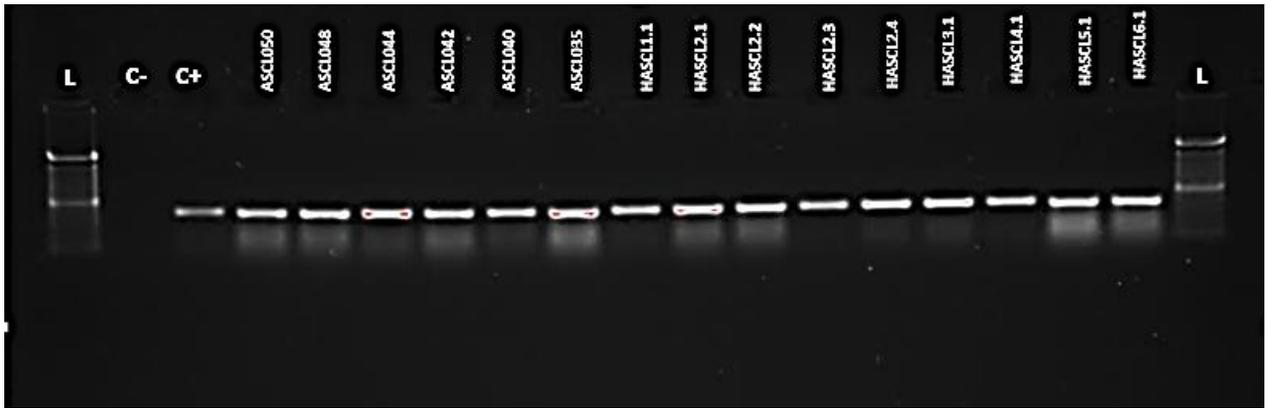


Figura 3. Electroforesis en Gel de Agarosa al 1% con productos de PCR amplificados para la región *cox1* (ASCo1) del ADN mitocondrial de *Ascaris* spp. de origen porcino y humano.

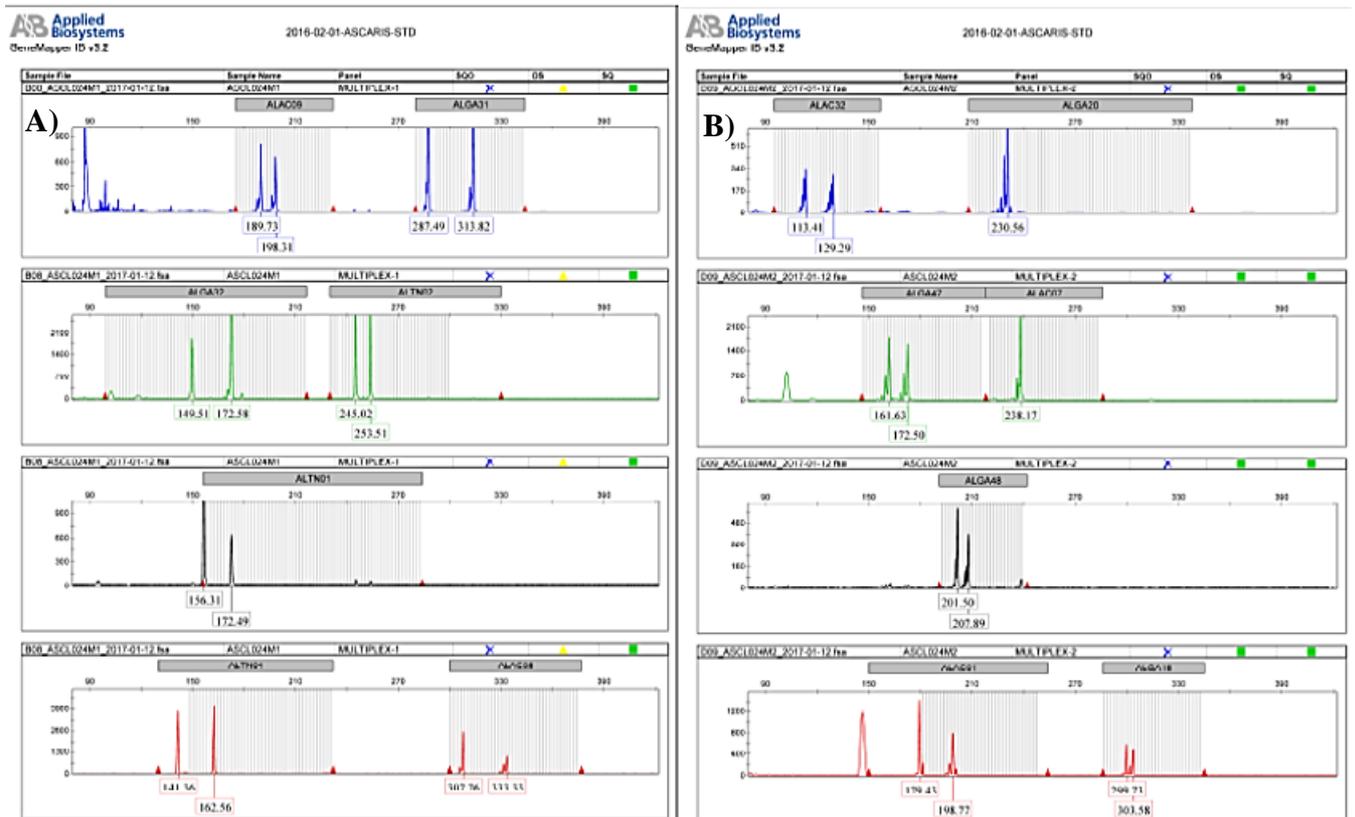


Figura 4. Perfiles de Regiones STR vía electroforesis capilar para la muestra ASCL024. A) Multiplex 1. B) Multiplex 2



Figura 5. Comparación entre las secuencias HASCL2.3 Y HASCL5.1 para el locus ALTN02 efectuada en el software Geneious. Se aprecia dicha comparación de forma parcial entre las posiciones 265 y 336

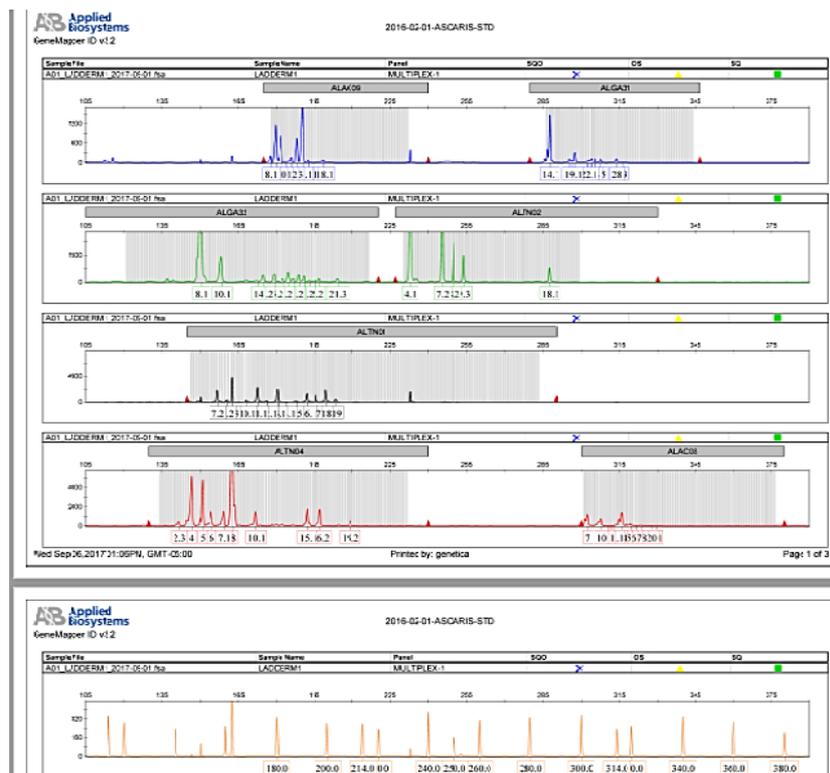


Figura 6. Ladder Alélica + LIZ600 de la Multiplex 1

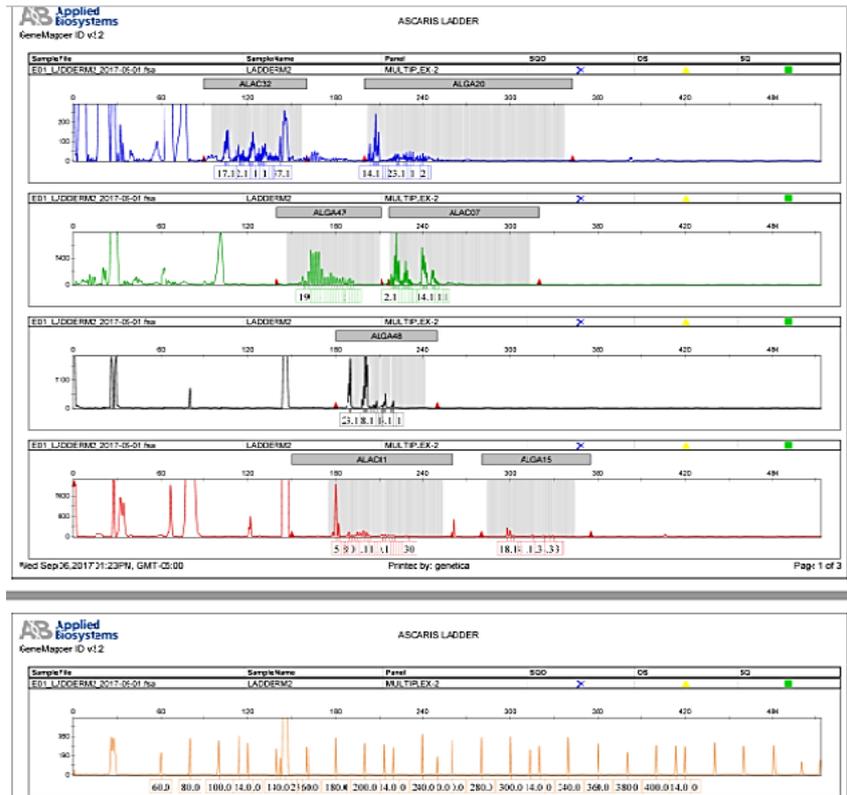


Figura 7. Ladder Alélica + LIZ600 de la Multiplex 2

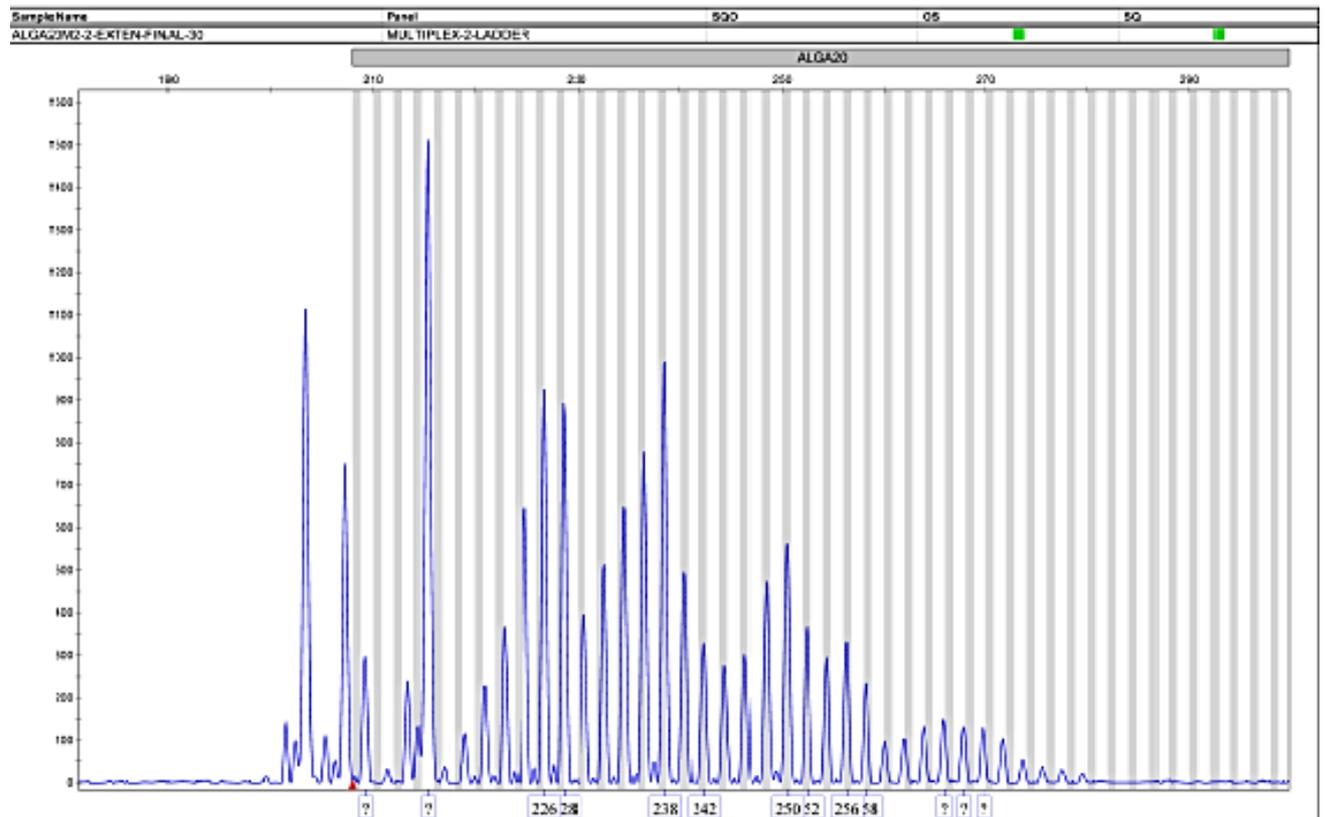


Figura 8. Ladder Alélica del Locus ALGA20 previa a Reamplificación

ANEXOS

ANEXO 1. Notación y Secuencia de Primers de Microsatélite empleados para la preselección de alelos de interés

- ALTN02 Forward: (5'- CAAAACGGCACTATGAAAA-3')
- ALTN02 Reverse: (5'-ATATCGATTGGCTCATCAAC-3')
- ALGA15 Forward: (5'- TTGGATGTTCTCATCTCATCTC-3')
- ALGA15 Reverse: (5'- ATGAGGAGCCATCACATTTT-3')
- ALAC07 Forward: (5'-AATCGTGTTCTTTGAAGTGG-3')
- ALAC07 Reverse: (5'-AACACGCTGAAATTGAAACT-3')
- ALAC01 Forward: (5'-TGCCGGAATTTTATCTTCAA-3')
- ALAC01 Reverse: (5'-TGATCGACTGTCTATGCAAACC-3')
- ALTN01 Forward: (5'-CGTGACACTCAGACAAATCA-3')
- ALTN01 Reverse: (5'-TGTTAATTCGATGAAAATGC-3')

ANEXO 2. Protocolo de Extracción de ADN de Parásitos Adultos de *Ascaris* spp.

Método Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico

Adaptado por Diana Mollocana y Francisco Yanqui-Rivera a partir del Protocolo QIAamp® DNA Mini Kit – QIAamp DNA Blood Mini Kit y de las Notas de Germán Burgos, Investigador del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Las Américas

DÍA 1

1. Pesar entre 25 y 95,5 mg de muestra en una balanza. Como pesamuestras emplear un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 mL con su código de muestra escrito en la tapa con un marcador permanente fino.
2. Añadir 180 µL de Buffer de Lisis ATL (kit) y macerar firmemente con un pistilo plástico previamente autoclavado para romper el tejido. La maceración debe realizarse a un ritmo constante y sobre una cama o gradilla fría, para evitar que el ADN se fragmente debido al calor que genera la fricción.
3. Adicionar 5 µL de Proteinasa K.
4. Incubar toda la noche a 56.6 °C sometiendo la muestra a vórtex cada cierto tiempo (a libre elección del operador), especialmente durante la primera hora de tratamiento.

DÍA 2

5. Agregar un volumen en proporción 1:1 de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (25:24:1) pH 8.0 y mezclar por inversión.
6. Centrifugar a 1000 rpm por 10 minutos.
7. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 mL.
8. Repetir una vez más los pasos 5,6 y 7
9. Adicionar un volumen en proporción 1:1 de Cloroformo puro y mezclar por inversión.
10. Centrifugar a 8000 rpm durante 10 minutos.
11. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
12. Agregar un volumen aproximadamente igual al 10% del sobrenadante recuperado, de solución salina NaCl 3M. Mezclar por Inversión (La solución debe prepararse previamente con sal en grano).
13. Adicionar un volumen en proporción 1:1 de Isopropanol Frío. Mezclar por inversión y dejar reposar las muestras de 5 a 10 minutos.
14. Centrifugar a 13000 rpm por 30 minutos a 20°C.
15. Descartar el sobrenadante, precautelando que el pellet generado permanezca en el tubo.
16. Resuspender el pellet con 500 µL de Etanol Frío al 70%.
17. Centrifugar a 13000 rpm durante 7 minutos. Descartar el sobrenadante.
18. Resuspender una vez más el pellet generado con 500 µL de Etanol frío al 70% y repetir el paso 17.

19. Permitir que el pellet se seque al ambiente por evaporación del etanol remanente en una estufa a 37°C toda la noche.

DÍA 3

20. Resuspender con 50 µL de agua libre de nucleasas (H₂O PCR) para una posterior cuantificación.

ANEXO 2. Párrafo Descriptivo del Procotolo de Purificación de Amplificados AMPURE ®

El procedimiento comenzó con el equilibrio de la solución AMPure, tras lo cual se colocaron 10 µL de la misma en 10 µL de amplificado. Se sometió a vórtex y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se colocaron los tubos en la placa magnética, dejando reposar 5 minutos, para promover la formación de un anillo de color pardo en la mitad del tubo y al tornarse completamente transparente el líquido circundante, fue posible aspirarlo para eliminarlo. Luego, se adicionaron 200 µL de Etanol al 70% que debió ser fresco en cuanto a preparación, con una tolerancia de 7 días de antigüedad. Esto se incubó por 30 segundos aproximadamente, tras lo cual se eliminó por inversión. Este paso se realizó dos veces y sin retirar los tubos de la placa. Después, se secaron los tubos por 15 minutos en una estufa a 37°C y se resuspendió con 20 µL de Agua MiliQ, sin olvidar someter a un vórtex final y a una centrifugación a 6000 rpm por 3 minutos.

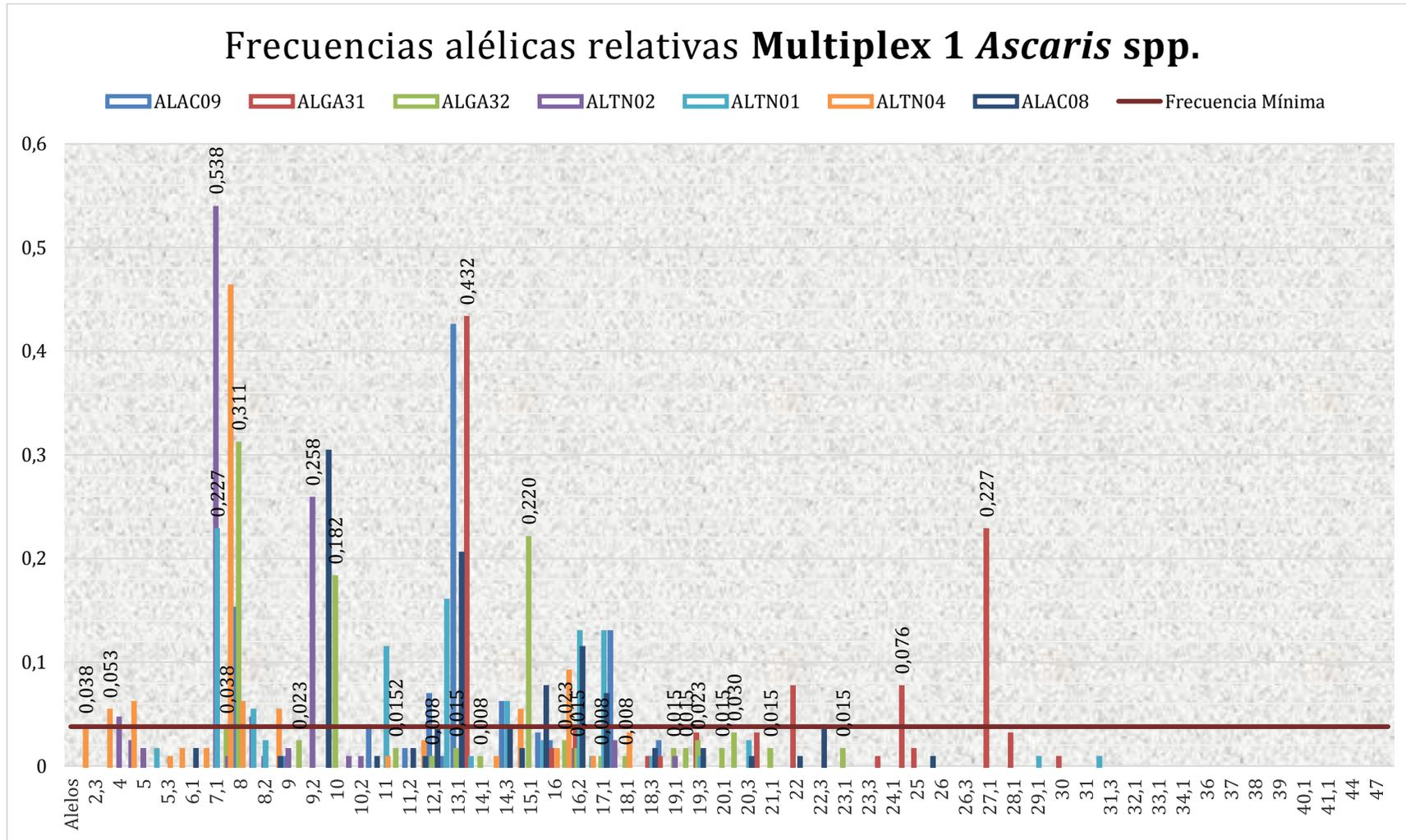
ANEXO 3. Párrafo Descriptivo del Procotolo de Purificación de Amplificados Post Secuenciación Clean-Seq ®

Se equilibró y homogeneizó la solución, colocando 2 µL de CleanSeq junto con 16 µL de Etanol al 85% preparado fresco, por cada 6.5 µL de amplificado. Se sometió a vórtex, tras lo cual se colocaron los tubos en la placa magnética. Esto se dejó en reposo por 3 minutos con el

fin de propiciar la formación del anillo de perlas y ADN. Una vez hecho esto, se procedió a aspirar 20 μ L del volumen de líquido clarificado. Seguidamente, se adicionaron nuevamente 100 μ L de etanol al 85%, que se incubaron por 30 segundos para luego eliminarlo por inversión con ayuda de papel absorbente. Se secó el producto nuevamente en una estufa a 37°C por 15 minutos. Luego, se resuspendió con 20 μ L de agua MiliQ. La solución de resuspensión se llevó a vórtex y a centrifugación a 6000 rpm por 5 minutos.

Este material fue pasado inmediatamente, sin solvente o aditivo alguno, a las placas de 96 pocillos para ser analizados.

ANEXO 4. Frecuencias alélicas relativa obtenidas a partir de los genotipos asociados a la reacción de PCR Multiplex 1



ANEXO 5. Frecuencias alélicas relativa obtenidas a partir de los genotipos asociados a la reacción de PCR Multiplex 2

