

ANÁLISIS MOLECULAR Y FILOGENÉTICO DE LAS ESPECIES DE SARCOCYSTIS QUE AFECTAN A LAS ALPACAS DEL PERÚ

Molecular and phylogenetic analysis of *Sarcocystis* species affecting alpacas from Peru

Giuliana Medrano¹, Armando Hung² y Jose Espinoza³

RESUMEN

La sarcocistiosis es una enfermedad de significancia comercial y de gran importancia económica encontrándose una alta prevalencia (>90%) en alpacas, llamas y otros camélidos sudamericanos en la sierra del Perú. La caracterización genotípica y los estudios filogenéticos de la familia *Sarcocystidae* han sido realizados mediante el análisis del gen SSU rRNA (small subunit ribosomal RNA) también conocido como 18S rRNA en diferentes especies animales. En camélidos sudamericanos, sólo ha sido caracterizada genéticamente la especie *S. auqueniae*, que es el agente causal de la enfermedad productora de macroquistes, quedando aún sin resolver la identificación de la especie que ocasiona la formación de los microquistes observados en el músculo cardíaco de los camélidos sudamericanos. El propósito del presente trabajo de investigación es el estudio filogenético de las especies de *Sarcocystis* que infectan a las alpacas del Perú: *S. aucheniae* y *S. lamacanis*. Mediante el estudio filogenético basado en el gen de la subunidad pequeña del RNA ribosomal (SSU rRNA) se confirmó que la especie productora de macroquistes (*S. aucheniae*) pertenece a otra especie, diferente a la que produce microquistes (designada como *S. lamacanis*).

Palabras Clave: *Sarcocystis*, alpacas, SSU rRNA, PCR.

ABSTRACT

Sarcocystiosis is an economically important disease with high commercial impact. The prevalence of this disease is high (>90%) in alpacas, llamas and other South American camelids in the Peruvian Andes. The genotypic characterisation and the phylogenetic studies of the member of the *Sarcocystidae* family have been addressed by the analysis of the SSU rRNA gene (small subunit ribosomal RNA) or 18S rRNA in different animal species. In South American camelids, the genetic characterisation was done in *S. auqueniae*, which is the responsible of causing the disease producing macrocysts. The molecular identification of the species producing microcysts in the cardiac muscle is still without elucidating. The purpose of this work is the molecular and phylogenetic analysis of the species of *Sarcocystis* that infect the alpacas in Peru: *S. aucheniae* and *S. lamacanis*. The phylogenetic study based in the small subunit of the ribosomal RNA (SSU rRNA) showed that the species producing macrocysts (*S. aucheniae*) belongs to specie different than the species producing microcysts (designed as *S. lamacanis*).

Palabras claves: *Sarcocystis*, alpacas, SSU rRNA, PCR.

¹ Arkansas Biosciences Institute, Arkansas State University, P.O. Box 639, State University, Jonesboro, Arkansas, USA 72467.

² Universidad Peruana Cayetano Heredia, Veterinaria y Zootecnia, Laboratorio de Biología Molecular. Av. Honorio Delgado 430, Urb. Ingeniería, S.M.P. Lima - Perú.

³ Universidad Peruana Cayetano Heredia; Facultad de Ciencias, Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Farmacología. Av. Honorio Delgado 430, Urb. Ingeniería, S.M.P. Lima - Perú.

INTRODUCCIÓN

En el Perú se encuentra la mayor población mundial de alpacas llegando a 3'036,200 cabezas (año 2000) y esta cifra correspondería al 89% de la población de alpacas a nivel mundial (Flores *et al.*, 1993; Ministerio de Agricultura, 1999; Bustinza, 2001a). Las alpacas constituyen los hospederos intermediarios en donde el parásito desarrolla los macroquistes y microquistes en la musculatura estriada y lisa (Guerrero *et al.*, 1967; Leguía *et al.*, 1989), lo cual conduce al decomiso de la carne. Esto conlleva a considerables pérdidas económicas, al limitar su comercialización por parte del productor. Se ha estimado una pérdida anual de 300.000 dólares americanos correspondientes al decomiso de las carcasas infectadas (Ministerio de Agricultura, 1973) pudiendo ser mayor. En el altiplano las alpacas representan uno de los principales recursos comerciales (fibra) así como también es utilizada en la alimentación de las comunidades. Debido a su alta prevalencia, se ha hecho necesario realizar estudios moleculares para un entendimiento más profundo de las especies de *Sarcocystis* que afectan las alpacas del Perú. La caracterización genotípica y los estudios filogenéticos de la familia *Sarcocystidae* han sido realizados mediante el análisis del gen SSU rRNA (small subunit ribosomal RNA) también conocido como 18S rRNA en diferentes especies animales.

En los camélidos, al menos una especie de *Sarcocystis* produce quistes microscópicos (*S. lamacanis*) y otra (*S. aucheniae*) produce quistes macroscópicos. En infecciones naturales, es común encontrar hospederos intermediarios infectados con ambas especies simultáneamente. Los microquistes son encontrados principalmente en el corazón y diafragma. Los macroquistes son blancos y del tamaño de un grano de arroz y generalmente se concentran en el esófago y cuello pero pueden estar en cualquier parte del músculo esquelético, aunque nunca en el corazón. En la actualidad sólo ha sido identificado molecularmente, la especie *S. aucheniae* como uno de los agentes causales de la enfermedad en alpacas productoras de macroquistes (Holmdahl *et al.*, 1999), quedando aún sin resolver la identificación de la especie que ocasiona la formación de los microquistes observados en el músculo cardíaco de los camélidos sudamericanos. Con los avances en el área de la biología molecular,

esto ha llevado al uso de otros métodos más informativos, consistentes en el secuenciamiento del DNA de fragmentos conservados (ej. subunidad pequeña del RNA ribosomal, SSU rRNA), útiles para la clasificación o reconstrucción de la filogenia dentro de la familia *Sarcocystidae* (Mugridge *et al.*, 2000). El SSU rRNA (small subunit ribosomal RNA) o 18S rRNA ha sido ampliamente usado para estudios filogenéticos en *Sarcocystidae* y otros miembros del phylum Apicomplexa (Tenter and Jonson, 1997; Carreno *et al.*, 1998, Votypak *et al.*, 1998; Carreno and Barta, 1999; Dole *et al.*, 1999; Holmdahl *et al.*, 1999; Jenkins *et al.*, 1999). Para el análisis filogenético se debe realizar el alineamiento de las secuencias. El rol del alineamiento de las secuencias es organizar las secuencias para que los residuos homólogos aparezcan en la misma columna del alineamiento. Es importante que la secuencia de homología no sea confundida con la secuencia de similitud. La homología implica ancestros comunes; la similitud puede ser una consecuencia de un ancestro común o del azar. Para los análisis de filogenia molecular se hipotetiza que los residuos que se encuentran en una columna de alineamiento provienen del mismo residuo en un gen ancestral común.

El propósito general del presente trabajo de investigación es el estudio filogenético de las especies de *Sarcocystis* que infectan a las alpacas del Perú mediante el análisis filogenético basado en el gen SSU rRNA las especies de *Sarcocystis* productoras de micro y macroquistes en alpacas infectadas naturalmente. Además el estudio filogenético de las especies de *Sarcocystis* aisladas de alpacas permitiría un mejor entendimiento del parásito mediante el conocimiento de su historia evolutiva y su relación con otros organismos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras Biológicas

Las muestras fueron obtenidas de alpacas y llamas mayores a 2 años de edad del Camal de Pilpichaca Huancavelica durante el período 2004 – 2005. Se colectaron cuellos de alpacas con presencia de macroquistes y corazones con presencia de microquistes (Figura 1)



Figura 1. Muestreo de macroquistes y microquistes de *Sarcocystis* en alpacas de la sierra del Perú. A-B Alpacas muestreadas en Huancavelica. **C** Muestreo de carne infectada con macroquistes. **D** Tinción H&E de un microquiste presente en el corazón de una alpaca infectada (corte transversal) 4,000X.

Procesamiento de las muestras

Macroquistes: Se tomaron 6-8 macroquistes del músculo esquelético de la zona cervical de alpacas y

llamas. Se procedió a cortar y homogenizar la muestra con la ayuda de una hoja de bisturí. Se adicionó 100 µL de sol PBS estéril, se mezcló bien y se colectó el líquido en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL de capacidad. **Microquistes:** Se tomaron secciones delgadas de músculo cardíaco, se colocaron en láminas portaobjeto, se aplicó mucha presión con otra lámina cubreobjeto y se observaron al microscopio a 10x y 40x de aumento. La zona en donde se observaron los microquistes fue encendida colocándose en tubos de microcentrifuga, para su homogenización.

Extracción del DNA y PCR de *Sarcocystis*

La extracción del DNA se realizó siguiendo el protocolo del kit comercial Wizard DNA Genomics con algunas modificaciones (Medrano y Hung, 2002; Hung y Medrano, 2003a, 2003b y 2003c; Hung *et al.* 2003).

El diseño de los cebadores utilizados se basó en la secuencia nucleotídica del gen SSU rRNA (ó 18S rRNA) de *S. aucheniae* publicado en el GenBank (número de accesión AF017123). El programa utilizado fue Vector NTI 9.0.0. Los parámetros utilizados para el diseño de los cebadores fueron: un tamaño óptimo de 20 +/- 2 bases, una temperatura de fusión óptima de 60 +/- 3°C, contenido de 55-60% de GC, concen-

tración de sales de 50 mMol. Se diseñaron 8 pares de cebadores, de los cuales 2 combinaciones resultaron adecuadas para el secuenciamiento parcial del gen SSU rRNA de *S. lamacanis* en muestras de corazón de camélidos sudamericanos los mismos que dan ampliaciones de 391 y 420 pb (Tabla 2).

Para la optimización del PCR de *Sarcocystis*, se probaron diferentes concentraciones de iones de magnesio, enzima DNA polimerasa, dNTPs y cebadores. Además se evaluaron diferentes temperaturas de hibridación durante el PCR. Los parámetros fueron cambiados y evaluados para optimizar las condiciones del PCR. **La cantidad y concentración final de los reactivos utilizados para el PCR se detallan en la Tabla 1.**

Tabla 1. Parámetros estandarizados del PCR

Reactivo	Cantidad	Concentración final
H ₂ O DEPC	34,4 µL	
MgCl ₂ (25mM)	3 µL	1,5 mM
Solución 10X	5 µL	1X
Primer 18SrRNA-F2 (40 pmol/µL)	1 µL	0,8 µM
Primer 18SrRNA-R (40 pmol/µL)	1 µL	0,8 µM
dNTPs mix (100 mM)	0,4 µL	0,2 mM
<i>Taq</i> DNA polimerasa (5 U/µL)	0,2 µL	1 U
DNA	5 µL	
Volumen final	50 L	

El programa de PCR estandarizado para la detección del género *Sarcocystis* fue el siguiente: 1 ciclo de 94°C / 2 min; 35 ciclos de 94°C / 30 seg, 57°C / 30 seg y 72°C / 1 min; 1 ciclo 72°C / 10 min. La electroforesis fue realizada en gel de agarosa al 2% teñida con bromuro de etidio, utilizándose una solución para cargar el DNA y una solución tampón TAE 1X para la corrida electroforética, sometiéndose el gel a 100 voltios. Los productos del PCR fueron observados bajo luz ultravioleta, fotografiados y registrados digitalmente en UVP Bio Doc-It system y analizadas utilizando el software Doc-It 2.3.0 UVP. Los productos de DNA analizados en gel de agarosa al 2% fueron purificados de acuerdo al protocolo de Qiaquick Gel Extraction Kit.

Secuenciamiento

El secuenciamiento de las muestras se realizó mediante un secuenciador automático ABI Prism 310 Genetic Analyzer en el Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt, Universidad Peruana Cayetano Heredia y las mismas muestras fueron enviadas a secuenciar a MACROGEN (Maryland Rockville, USA) para la comparación y confirmación de los resultados de los secuenciamientos. Las muestras procesadas para el secuenciamiento fueron las siguientes: DNA de macroquistes de alpacas y DNA de microquistes de alpacas. Cada muestra fue secuenciada por duplicado y en ambas direcciones con cebadores sentido y antisentido.

Alineamiento de secuencias y análisis filogenético

El alineamiento de las secuencias usadas fue realizado con el programa BLAST 2.0 (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI, Vector NTI 9.0.0 y BioEdit.7.0.1 Para el alineamiento se utilizaron secuencias parciales del gen SSU rRNA de 13 especies de *Sarcocystis* y otros parásitos relacionados pertenecientes a la familia Sarcocystidae (*Neospora* y *Toxoplasma*). Las especies utilizadas para los análisis fueron las siguientes (en orden alfabético): *S. arieticanis* (Sa) # Acc. L24382; *S. aucheniae*, (Sau) # Acc. AF017123; *S. buffalonis* (Sb) # Acc. AF017121; *S. cruzi* (Sc) # Acc. AF017120; *S. fusiformis* (Sf) # Acc. U03071; *S. gigantea* (Sg) # Acc. L24384; *S. hirsuta* (Sh) # Acc. AF017122; *S. lamacanis* (Sl) # Acc. AY840990/DQ100056; *S. moulei* (Smo) # Acc. L76473; *S. muris* (Smu) # Acc. M64244; *S. neurona* (Sn) # Acc. U07812; *S. tenella* (St) # Acc. L24383; *S. species* (Ssp) # Acc. U97524; *Neospora caninum* (Nc) # Acc. L24380 y *Toxoplasma gondii* (Tg) # Acc. L24381. Las características de dichas especies se muestran en la Tabla 3. Para la creación y análisis de

los árboles filogenéticos se utilizaron dos especies de referencia como grupo externo: *Eimeria tenella* (Et) # Acc. U67121 y *Babesia bovis* (Bb) # Acc. M87566. El proceso del alineamiento fue iterativo, comenzando con la yuxtaposición de regiones de extensa similitud estructural primaria y seguidamente de un refinamiento mediante la búsqueda de sustituciones de bases compensatorias desarrollado con el programa ClustalW. Los análisis filogenéticos fueron realizados con los programas Mega 2.1, Vector NTI 9.0.0 y Bioedit 7.0.1.

Resultados

Diseño y selección de cebadores

El PCR fue estandarizado para la detección del gen SSU rRNA de *Sarcocystis* por ser un gen conservado en diferentes especies. El diseño de cebadores fue basado en secuencias conservadas del gen SSU rRNA de *S. aucheniae*. Dos pares de cebadores fueron adecuados para el secuenciamiento parcial del gen (Tabla 2).

Tabla 2 Cebadores diseñados para el secuenciamiento de *S. lamacanis*

Cebadores	Secuencias (5' – 3')	Posición dentro del gen 18S rRNA de <i>S. aucheniae</i>	Tamaño del producto amplificado
18SrRNAab-F2	F: ATA CGG CGA AAC TGC GAA TGG	76 -96 pb	391 pb
18SrRNAa-R	R: GCC TGC TGC CTT CCT TAG AT	447 -466 pb	
18S-F	F: GGT GGT GCA TGG CCG	1,322 -1,336 pb	420 pb
18Sc-R	R: CGG AAC ACT CAA TCG GTA	1,724-1,741 pb	

F: "forward" ó sentido; R: "reverse" ó antisentido

Los cebadores 18SrRNAab-F2 y 18SrRNAa-R dieron un amplicón de 391 pb de los cuales 343 pb fueron publicados en el GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y el número de acceso que se le asignó fue AY840990. Los cebadores 18S-F y 18Sc-R dieron un amplicón de 420 pb de los cuales 307 pb fueron publicados en el GenBank del NCBI y el número de acceso que se le asignó fue DQ100056.

Alineamiento de secuencias y análisis filogenético

Las dos secuencias parciales del gen SSU rRNA de *S. lamacanis* (# Acc. AY840990 con 343 pb y # Acc. DQ100056 con 307 pb) amplificadas por PCR y secuenciadas fueron juntadas haciendo un total de 650 pb. Dicha secuencia fue alineada con su correspondiente secuencia en *S. aucheniae* con el uso del programa ClustalW y editada con

el software BioEdit vs 7.0.1. Los resultados de dicho alineamiento muestran una secuencia consenso con 71 nucleótidos de diferencia entre ambas (Figura 2), con lo que se demuestra que la especie formadora de microquiste denominada *S.*

lamacanis, pertenece a una especie diferente a la formadora de macroquistes (*S. aucheniae*). Asimismo, se observa sólo un 87% de similaridad cuando se comparan las secuencias nucleotídicas de ambas especies (Tabla 4).

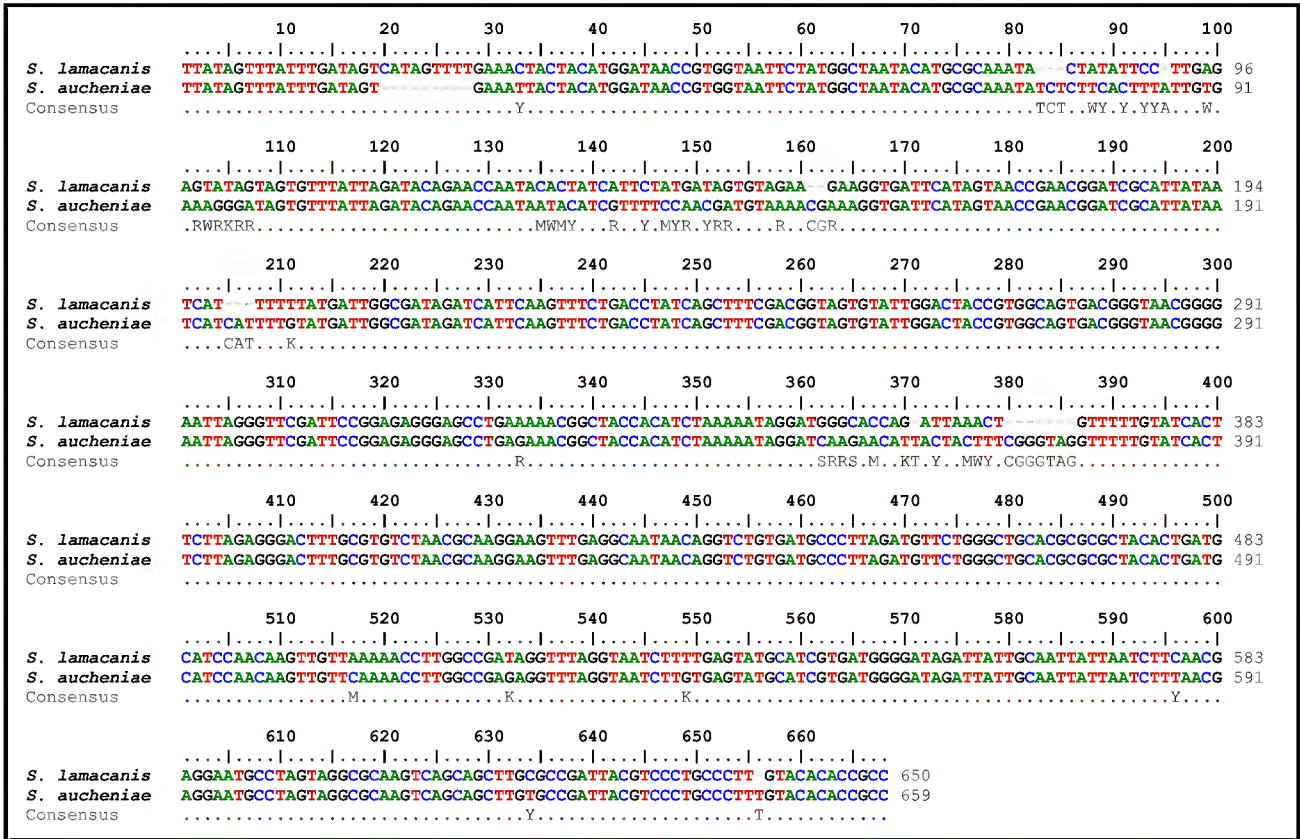


Figura 2. Alineamiento de secuencias del gen SSU rRNA de *S. lamacanis* (650 pb) obtenida en el presente trabajo y su correspondiente secuencia en *S. aucheniae* (659 pb) con número de accesión AF017123. La secuencia de consenso demuestra diferencias entre ambas especies.

Las dos secuencias obtenidas de *S. lamacanis* fueron juntadas y alineadas con secuencias homólogas de 12 especies de *Sarcocystis* y otras especies relacionadas como *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum* (Fi-

gura 3). Las características de dichas especies se muestran en la Tabla 3. Las regiones conservadas de *S. lamacanis* se encuentran en la misma zona conservada de la mayoría de las otras especies analizadas. Se observó que las regiones conservadas se encuentran entre 1 y 14 pb; entre 38 y 82 pb; entre 261 y 394 pb; entre 428 y 544 pb y entre 578 y 650 pb y las zonas de mayor variabilidad se encuentran entre 15 y 37 pb; entre 83 y 260 pb; entre 395 y 427 pb y entre 545 y 577 pb.

Tabla 3 Especies usadas en el análisis filogenético. Características fenotípicas de las especies de *Sarcocystis* y otras especies relacionadas.

Especie	N° Accesoión GenBank para 18S rRNA	Hospedero Definitivo	Hospedero Intermediario	Tamaño del <i>Sarcocystis</i>	Grado de patogenicidad para el hosp. intermedio
<i>S. arieticanis</i>	L24382	Perro	Oveja	Micro	Intermedio
<i>S. aucheniae</i>	AF017123	Perro	Alpaca, llama	Macro	Bajo
<i>S. buffalonis</i>	AF017121	Gato	Bufalo de agua	Macro	?
<i>S. cruzi</i>	AF017120	Perro, lobo, coyote	Bovino	Micro	Alto
<i>S. fusiformis</i>	U03071	Gato	Bufalo de agua	Macro	No patogénico
<i>S. gigantea</i>	L24384	Gato	Oveja	Macro	No patogénico
<i>S. hirsuta</i>	AF017122	Gato	Bovino	Macro	Bajo
<i>S. lamacanis</i>	AY840990/DQ100056	Perro	Alpaca, llama	Micro	Alto
<i>S. moulei</i>	L76473	Gato	Cabra	Macro	No patogénico
<i>S. muris</i>	M64244	Gato	Ratón	Macro	No patogénico
<i>S. neurona</i>	U07812	Oposum	Equino	Macro	Alto
<i>S. tenella</i>	L24383	Perro, lobo, coyote	Oveja	Micro	Alto
<i>S. species</i>	U97524	Culebra	Ratón	Macro	?
<i>N. caninum</i>	L24380	No conocido	Mamíferos	Micro	Alto
<i>T. gondii</i>	L24381	Gato	Vertebrados de sangre caliente	Micro	Alto

La aplicación de diferentes métodos de construcción de árboles provee la oportunidad de observar cómo se comportan los datos bajo diferentes supuestos y procesos. Se usaron cuatro métodos de construcción de árboles: UPGMA, Maximum Parsimony, Neighbour-Joining y Minimum Evolution que son los métodos más avanzados usados para la reconstrucción filogenética (Fenger *et al.*, 1994; Escalante y Ayala, 1995; Relman *et al.*, 1996; Jeffries *et al.*, 1997). El programa utilizado fue Mega versión 3.1. La confiabilidad de los grupos filogenéticos (nodos) de los árboles obtenidos fue analizado usando el método de “bootstrap” (referido a la probabilidad de ocurrencia de cada grupo) con 1,000 repeticiones para los cuatro métodos de construcción de árboles. En los resultados obtenidos en las Figuras 4 se observa que 3 de

los 4 métodos usados dieron resultados muy similares (Neighbour-Joining, Minimum Evolution y Maximum Parsimony) mientras que el método UPGMA dio un resultado diferente. En los cuatro métodos, el grupo externo se agrupa como lo esperado, alejados de las demás especies analizadas. Debido a que usualmente se recomienda usar sólo un método para el análisis filogenético, se decidió usar el método de Neighbor-Joining para los análisis posteriores por ser uno de los métodos más usados. Además, los resultados del árbol Neighbor-Joining son muy similares a los otros dos métodos analizados (Minimum Evolution y Maximum Parsimony) los cuales forman los mismos grupos en su mayoría indicando que es un método robusto para los análisis de filogenia de la familia Sarcocystidae.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
<i>S. arieticanis</i>	TTATAGTTTATTGATAGTCATACGAGATGAGAATCTACTACATGGATAACCGTGGTAATTCATGGCTAATACATGCCAAATATCCCTT										T 93
<i>S. aucheniae</i>		G		AT					TC		CAC 8
<i>S. buffalonis</i>			ATAATA						CTA.A	TATGTCAC	18
<i>S. cruzi</i>			A								1
<i>S. fusiformis</i>			ATAT.A						CTA.A		CAC 12
<i>S. gigantea</i>		G	AT.TT						CTG.A	AATCATA.	16
<i>S. hirsuta</i>			ATAATA						CTA.A	TATGTCAC	18
<i>S. moulei</i>		G	AT.TT						CTG.A	AACCATA.	16
<i>S. muris</i>		G		AT					C.C	GC	7
<i>S. neurona</i>		G		T					C.C	TC	6
<i>S. lamacanis</i>			T.TT	A					CT		ATA 9
<i>S. tenella</i>		C.G	A.G								4
<i>S. species</i>		G		T		T			C.C	CTT CT	TG 11
<i>N. caninum</i>		G		T					C	GC.TC	7
<i>T. gondii</i>		G		T					C	GC.TC	7
Consensus	R	SR.M.S	RNWDWR	RWY		Y			M	RYNYWYWAYSWYRY	31
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	
<i>S. arieticanis</i>	TCCGCAAGGAGAG	GATAGTGTATTAGATACAGAAACCAATACACCATCTGTGTTAACACACAGGTGGCTCGTGAAAAATCGGTCGATTCA									186
<i>S. aucheniae</i>	TTATT.TG.A	G		ATA	GT.T	CC	AAC	ATGT	AA	CG.AA	38
<i>S. buffalonis</i>	TTACG.TGGAT.ATA	TAG		TA	C	A	A	A.G	TGT	G	AA
<i>S. cruzi</i>								G	T	T	AA
<i>S. fusiformis</i>	GGG.T	TAG		TA	C	T.T	A	AAG	TGT	G	AA
<i>S. gigantea</i>	TATT.ATG.TT	TACAG		C	GTG	GC	ATCAC	TCT	GT	TGTC	AA
<i>S. hirsuta</i>	TAACG.TGGAT.ATAATATAG			TA	C	CCT.A	A	AAG	TGT	G	AG
<i>S. moulei</i>	TATTGATGGT	TACAG		C	GTG	GC	ATCAC	TTT	GT	TGTC	AA
<i>S. muris</i>	TC.TC.TGGA	G		C	A	C		CG		TC	CTCA
<i>S. neurona</i>	C.TC.TGGA	G		C	C			C	G	TC	CTCA
<i>S. lamacanis</i>	CTT G	TATAG		TA	CTATCA	CT	AT	A.A	TGT	G	GAA
<i>S. tenella</i>							G	GT	C	T	TG
<i>S. species</i>	TTTIGACG	AG		C	AG	C		G	TT	A	TT
<i>N. caninum</i>	T.CTCTGGA	GC		C	C		C	C		TC	CTCG
<i>T. gondii</i>	T.CCCTGGA	GC		C	C		C	C		TC	CTCA
Consensus	YNNNVBRDW	ATAATABRRY		Y	VDV	RYDBYDYNYNHYH	RVWRVBRDBHYS	MRWRVNDHV			91
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	
<i>S. arieticanis</i>	TACGTAAACCGAATCTGGATCGCATTATA	GTCATTTTC	AATGGCT	GGCGATAGATCATTCAGTTTCTGACCTGATCAGCTTTGACGGTAG							277
<i>S. aucheniae</i>	C	A	CA	TTGT	AT						49
<i>S. buffalonis</i>	C		TTA.A	CA	TTGC	G	AT	ATT			64
<i>S. cruzi</i>	C		G	A	T						10
<i>S. fusiformis</i>	C		TA.A	CA	TTGC	G	AT	ATT			46
<i>S. gigantea</i>	C	C	TTA.A	CA	TTGC	G	AT	ATT			72
<i>S. hirsuta</i>	C		TTA.A	CA	TTGC	G	AT	ATT			71
<i>S. moulei</i>	C	A	TTA.A	CA	TTGC	G	AT	ATT			72
<i>S. muris</i>	C		A	GGCC	TA	TC					C 39
<i>S. neurona</i>	C		A	GGCC	TT	TC					C 37
<i>S. lamacanis</i>	C		A	TTTT	AT						47
<i>S. tenella</i>	C	G		C	TTTT	AT					21
<i>S. species</i>	C		TG	A	GC	TTA	TT	G	TC		G
<i>N. caninum</i>	C	G	T	G	C	C		TC	T	CG	C 39
<i>T. gondii</i>	C	G		G	C	C		TC	T	CG	C 38
Consensus	Y		RYHWKRTR	VRYHYVHWKTRK	RYATTK	YR					S 125
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	
<i>S. arieticanis</i>	TGATTTGGACTACCGTGGCAGTGA	CGGGTAA	CGGGGAATTAGGGTTCGATTC	CGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACACATCTAAAAATAGGATCAG							377
<i>S. aucheniae</i>											A 50
<i>S. buffalonis</i>											A 65
<i>S. cruzi</i>											A 11
<i>S. fusiformis</i>											A 47
<i>S. gigantea</i>											A 72
<i>S. hirsuta</i>											A 72
<i>S. moulei</i>											A 72
<i>S. muris</i>											G 39
<i>S. neurona</i>											G 39
<i>S. lamacanis</i>											A 50
<i>S. tenella</i>											G 21
<i>S. species</i>											G 51
<i>N. caninum</i>											C 39
<i>T. gondii</i>											C 38
Consensus						R	R				R.SRR 131
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	
<i>S. arieticanis</i>	GAACACT.TT	ATTGT	GTTTCGTATC	CTTCTTAGAGGGACTTTGCGTGTCTAACCGAAGGAGTTTGAGGCAATACAGGCTGTGATGCC							469
<i>S. aucheniae</i>		T.AC	ACTTCGG	AG	T						64
<i>S. buffalonis</i>		AG	TTA	T							71
<i>S. cruzi</i>		A									13
<i>S. fusiformis</i>		T.A	TTA	T							53
<i>S. gigantea</i>		AA	TT	T		N					78
<i>S. hirsuta</i>		AG	TTA	T							78
<i>S. moulei</i>		AT	TTA	T							78
<i>S. muris</i>			C.C.C	CT							44
<i>S. neurona</i>			T	CT							42
<i>S. lamacanis</i>		C.C	GA	T.AAC	T						59
<i>S. tenella</i>		A			T						23
<i>S. species</i>		A			T						55
<i>N. caninum</i>					T.C						43
<i>T. gondii</i>					T.C						44
Consensus	V.M	BWDY	ACTTHDNSYAG	YY			NN				151

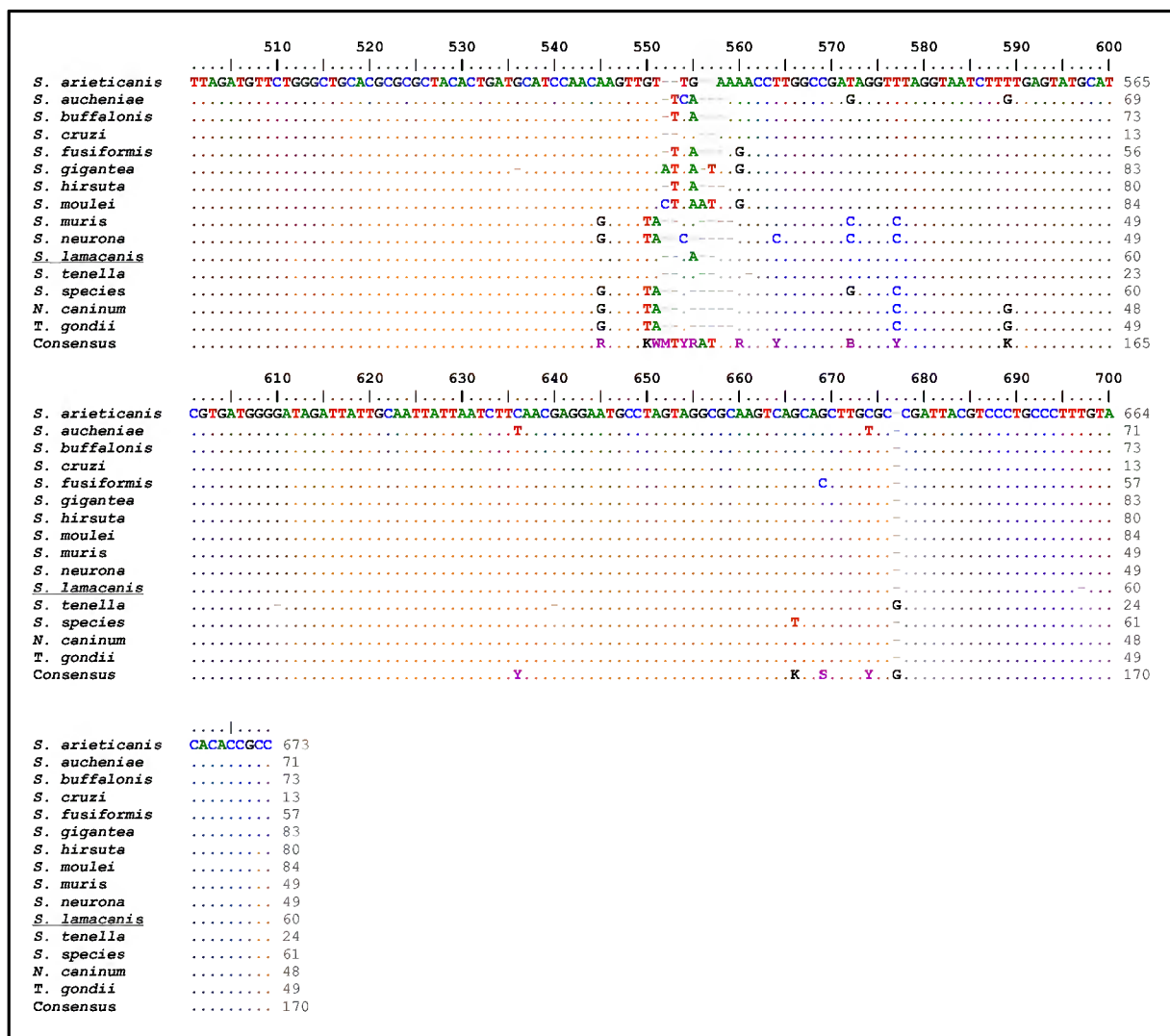


Figura 3. Alineamiento múltiple de *S. lamacanis* (subrayado) con 12 especies de *Sarcocystis* y otras 2 especies relacionadas (*Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum*). Los puntos (.) indican nucleótidos conservados; las rayas (-) indican espacios vacíos.

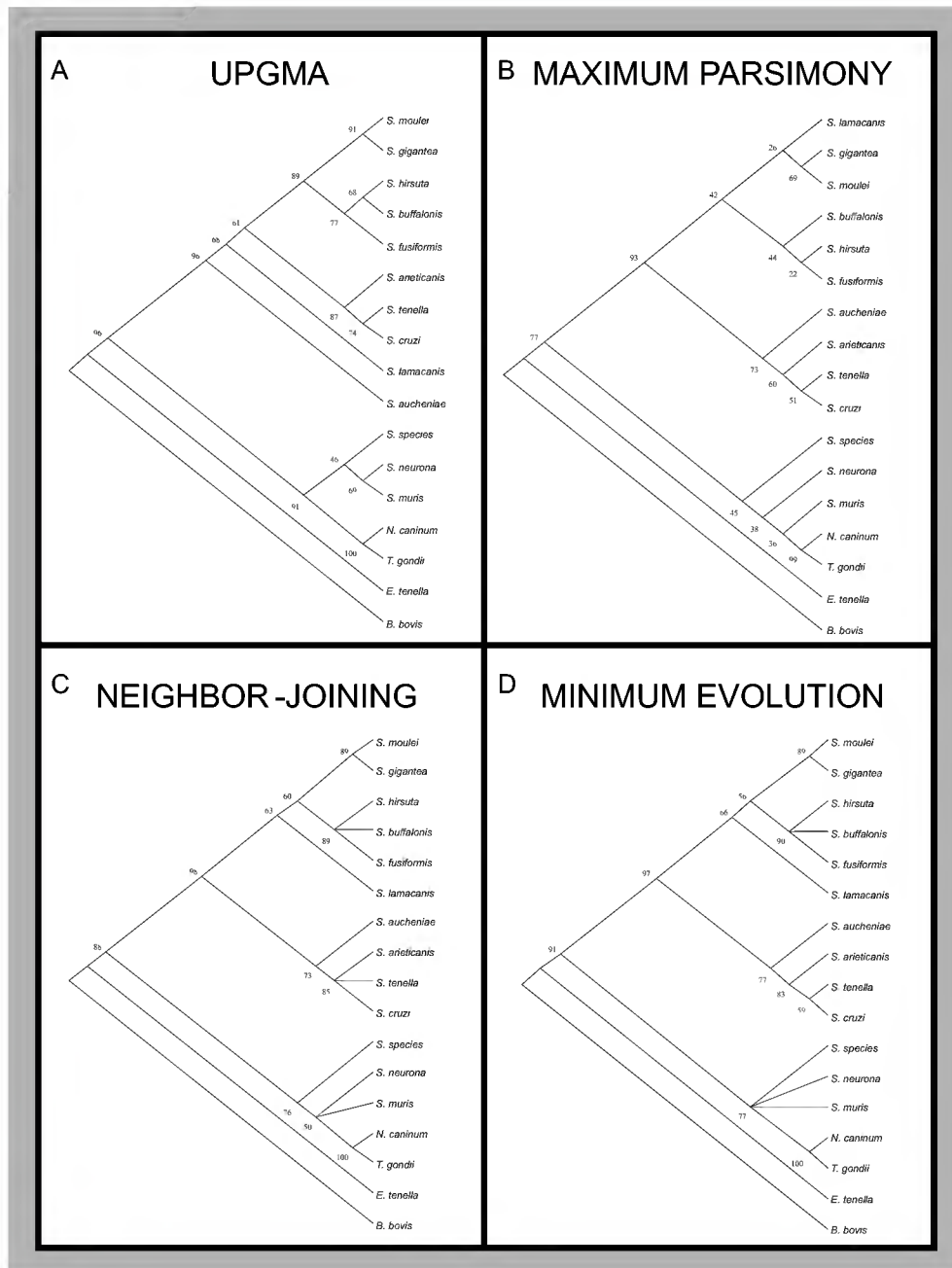


Figura 4. Resumen de los resultados obtenidos usando cuatro métodos de construcción de árboles filogenéticos (UPGMA, Maximum Parsimony, Neighbor-Joining y Minimum Evolution) de modelo rectangular. Para el análisis se usó 650 pb del gene SSU rRNA de *S. lamacanis* y se comparó con doce especies de *Sarcocystis*, dos especies relacionadas (*Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum*) y dos especies fueron incluidas como grupo externo (*Eimeria tenella* y *Babesia bovis*). Todos los análisis fueron apoyados con 1,000 repeticiones de "bootstrap".

El árbol filogenético obtenido en el presente estudio con el método de Neighbor-Joining (Figura 5) muestra agrupamientos taxonómicos similares a los obtenidos en otros trabajos (Jeffries *et al.*, 1997; Holmdahl *et al.*, 1999; Mugridge *et al.*, 2000). *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum* se localizan en un brazo con 100% de probabilidad de que siempre se agrupen juntos, mientras que *Eimeria tenella* y *Babesia bovis* forman un grupo externo para las coccidias formadoras de quistes analizadas, cuyos resultados son similares a otro estudio donde se escogió a *Eimeria tenella* como grupo externo para el análisis de la familia *Sarcocystidae* (Mugridge *et al.*, 2000); y ambas especies: *Eimeria tenella* y *Babesia bovis* (Jeffries *et al.*, 1997). En la Tabla 4 se muestra en porcentaje de similaridad de secuencias de nucleótidos entre las especies analizadas. La probabilidad de que *S. lamacanis* se encuentre en la misma rama del cladograma que las especies *S. moulei*, *S. gigantea*, *S. hirsuta*, *S. buffalonis*, *S. fusiformis*, *S. aucheniae*, *S. arieticanis*, *S. tenella* y *S. cruzi* es del 98% (Figura 5), lo cual es una fuerte evidencia de que están estrechamente relacionadas; es decir, que pertenece al género *Sarcocystis* y además todas estas especies tienen en común que su hospedero intermediario es un rumiante. Las especies *S. tenella* y *S. cruzi* son taxones hermanas siendo *S. arieticanis* el siguiente taxón más relacionado genéticamente. Estos tres taxones están a su vez relacionados con *S. aucheniae*. Todas estas

especies tienen en común que el hospedero definitivo es el perro.

Por otro lado *S. moulei* y *S. gigantea* son especies hermanas debido a que se encontró un 89% de probabilidad de que siempre se agrupen juntos en el análisis de "bootstrap", y son los más cercanos y genéticamente relacionados a *S. hirsuta*, *S. buffalonis* y *S. fusiformis* que tienen también un 89% de probabilidad. Todo este grupo tiene en común que el hospedero definitivo es el gato y que forman macroquistes en el estadio final de su desarrollo. *S. lamacanis* viene a ser un taxón hermano de este grupo, emitiendo una probabilidad de 63% en el análisis de "bootstrap" (Figura 5).

Cuando se analiza la tabla de similaridad se observa que *S. lamacanis* está también relacionado al grupo que incluye *S. arieticanis*, *S. tenella* y *S. cruzi*, con un 88, 89 y 90% de similaridad, respectivamente (Tabla 4) y con los cuales comparte características fenotípicas en común tales como: el perro como hospedero definitivo y son formadores de microquistes (Figura 5). No obstante, en la tabla de similaridad se observó un alto porcentaje de *S. lamacanis* con el grupo que tiene como hospedero definitivo al perro y que son formadores de macroquistes (*S. moulei*, *S. gigantea*, *S. hirsuta*, *S. buffalonis* y *S. fusiformis*) (Tabla 4).

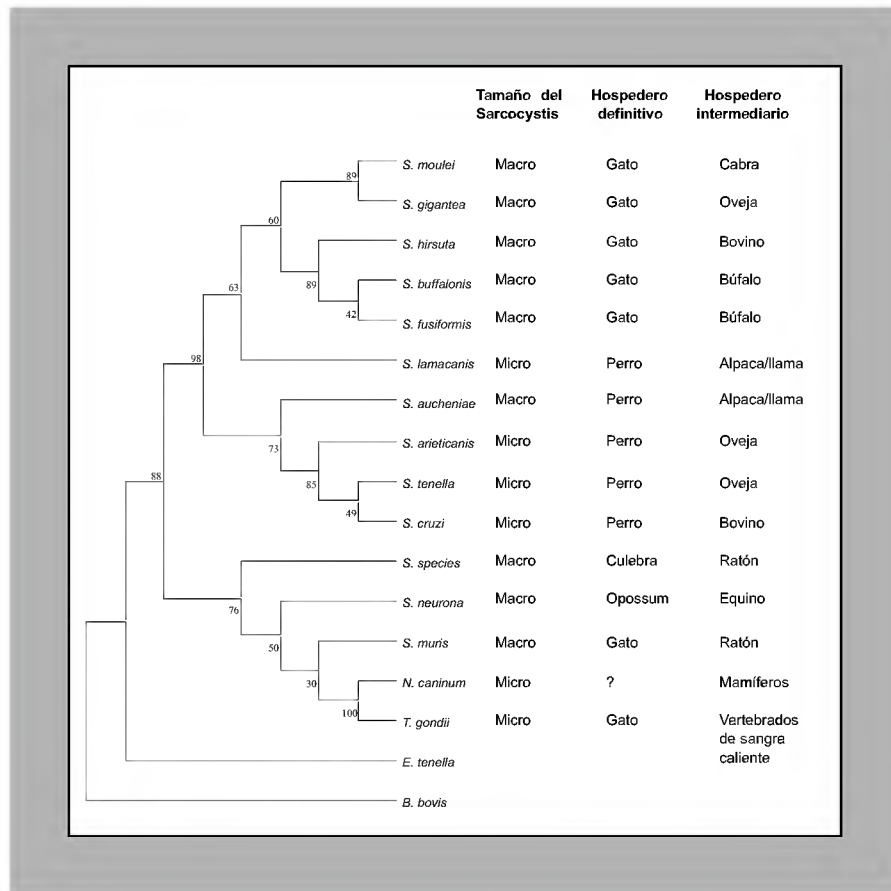


Figura 5. Relación filogenética obtenida con el método de Neighbor-Joining y características fenotípicas de las especies analizadas. Los números indican el porcentaje de “bootstrap” que apoya los resultados

Tabla 4. Relación filogenética obtenida con el método de Neighbor-Joining. Tabla de similaridad entre todas las especies analizadas.

	<i>Smo</i>	<i>Sg</i>	<i>Sh</i>	<i>Sb</i>	<i>Sf</i>	<i>Sl</i>	<i>Sau</i>	<i>Sa</i>	<i>St</i>	<i>Sc</i>	<i>Ssp</i>	<i>Sn</i>	<i>Smu</i>	<i>Nc</i>	<i>Tg</i>	<i>Et</i>	<i>Bb</i>
<i>S. moulei (Smo)</i>	100	98	92	92	92	89	88	86	86	87	86	84	84	84	83	82	64
<i>S. gigantea (Sg)</i>		100	92	92	91	89	88	86	86	86	86	84	84	83	83	82	64
<i>S. hirsuta (Sh)</i>			100	99	95	90	90	86	87	88	87	86	86	85	85	83	65
<i>S. buffalonis (Sb)</i>				100	95	90	90	87	88	89	87	86	86	85	85	84	66
<i>S. fusiformis (Sf)</i>					100	92	91	88	88	89	88	87	8	86	86	85	68
<i>S. lamacanis (Sl)</i>						100	87	88	89	90	86	85	85	85	85	84	67
<i>S. aucheniae (Sau)</i>							100	86	83	88	86	85	85	83	83	89	67
<i>S. arieticanis (Sa)</i>								100	94	96	85	84	84	83	83	82	64
<i>S. tenella (St)</i>									100	97	86	85	86	84	84	83	72
<i>S. cruzi (Sc)</i>										100	87	86	86	85	85	84	66
<i>S. species (Ssp)</i>											100	93	92	92	84	87	68
<i>S. neuronona (Sn)</i>												100	98	96	96	89	70
<i>S. muris (Smu)</i>													100	96	99	89	70
<i>N. caninum (Nc)</i>														100	87	89	70
<i>T. gondii (Tg)</i>															100	89	70
<i>E. tenella (Et)</i>																100	87
<i>B. bovis (Bb)</i>																	100

DISCUSION

Secuenciamiento y análisis filogenético

Una de las aproximaciones para estudios de filogenia es el uso de secuencias de DNA (Olsen and Woese, 1993). La relativa facilidad con la que se obtienen secuencias de nucleótidos actualmente nos permite comparar un gran número de especies según la variación de los nucleótidos. Para ello es importante escoger el gen adecuado para obtener un mayor grado de información. En el presente estudio se usó el gen SSU rRNA una molécula útil para el análisis filogenético y por tener ciertas ventajas para el estudio: las regiones conservadas del rRNA ayudan a diseñar cebadores que pueden ser usados para amplificar el mismo gen en otra especie relacionada (Hung y Medrano, 2005). Su estructura de mosaico permite flexibilidad en diseños experimentales de filogenia para diversos organismos (Ellis and Morrison, 1995; Sogin and Gunderson 1987; Olsen, 1987; Olsen and Woese, 1993; Van de Peer *et al.*, 1993; Van de Peer *et al.*, 1996).

Los árboles filogenéticos de este estudio fueron creados a partir de la secuencia de DNA del gen SSU rRNA. Las ventajas del uso de éste gen es que se requiere poca cantidad de DNA inicial para el PCR, es estable y se puede secuenciar por ambos lados. En los últimos tiempos, la mayoría de estudios filogenéticos de coccidias fueron realizados a partir de DNA del gen SSU rRNA (Ellis *et al.*, 1994; Fenger *et al.*, 1994; Gajadhar *et al.*, 1991; Holmdahl *et al.*, 1994; Jeffries *et al.*, 1997). Los diferentes árboles filogenéticos obtenidos en el presente estudio (Neighbor-Joining, Minimum Evolution, UPGMA y Maximum Parsimony) produjeron estructuras básicas similares para la inferencia de relaciones entre los miembros del género *Sarcocystis*. La aplicación de varios métodos de construcción de árboles tiene la ventaja de observar el comportamiento de los datos bajo diferentes algoritmos; sin embargo, se recomienda que los análisis se basen en un sólo método de filogenia. Por ello, en el presente trabajo se decidió utilizar el método de Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987) por las siguientes razones: es rápido y adecuado para análisis de "bootstraps", por permitir relaciones entre secuencias muy diferentes, por permitir correcciones para las sustituciones múltiples, por ser ampliamente

usado y por tener resultados similares a los otros árboles en este estudio. Cuando se analiza el árbol filogenético resultante del método Neighbor-Joining se observa que aquellas especies que tienen a un rumiante como hospedero intermediario forman una misma rama muy fuerte que se valida con un 98% de probabilidad cuando se hace el análisis de "bootstrap" con 1,000 repeticiones. Resultados similares son mostrados por Holmdahl *et al.* (1999). Dentro de este grupo se encuentra *S. lamacanis*, *S. aucheniae* y otras 8 especies (*S. moulei*, *S. gigantea*, *S. hirsuta*, *S. buffalonis*, *S. fusiformis*, *S. arieticanis*, *S. tenella* y *S. cruzi*) (Figura 5). Con este análisis se confirma que la especie que produce microquistes en alpacas (denominada *S. lamacanis*) pertenece a una especie diferente a la productora de macroquistes (*S. aucheniae*) en alpacas. Aquellas especies que tienen como hospedero intermediario a un no-rumiante forman un grupo parafilético hermano. Existen bastantes diferencias genotípicas que indican que aquellas especies que infectan a los rumiantes y no-rumiantes han tenido una historia evolucionaria muy diferente (Holmdahl *et al.*, 1999).

Dentro de este grupo que tiene como hospedero intermediario a un rumiante, se observan dos ramas bien diferenciadas en que una rama tiene como hospedero definitivo al gato y son formadores de macroquistes e incluyen: *S. moulei*, *S. gigantea*, *S. hirsuta*, *S. buffalonis* y *S. fusiformis*, con un "bootstrap" de 60% y otra rama que tiene como hospedero definitivo al perro y son formadores de microquistes e incluyen: *S. aucheniae*, *S. arieticanis*, *S. tenella* y *S. cruzi* (excepto por *S. aucheniae* que tiene como hospedero definitivo al perro pero es formador de macroquistes) arrojando un "bootstrap" de 73% (Figura 5). En el presente análisis se observaron características fenotípicas comunes para una misma rama del árbol filogenético. Apparentemente los agrupamientos no sólo tienen en común al hospedero definitivo (perro, gato, etc.) sino que la relación es más compleja, involucrando otras características como el hospedero intermediario y el tamaño del quiste.

Cuando se analiza en particular a *S. lamacanis* en el árbol filogenético se observa que esta especie se encuentra dentro de la misma rama que: *S. moulei*, *S. gigantea*, *S. hirsuta*, *S. buffalonis*, y *S. fusiformis*, que es el grupo que tiene como hospedero definitivo al

gato y que forman macroquistes, pero esta relación arroja un "bootstrap" de 63%. Cuando se analiza la tabla de similaridad se observó un alto porcentaje de *S. lamacanis* con este grupo que tiene como hospedero definitivo al perro y que son formadores de macroquistes (Tabla 4). Sin embargo, en la tabla de similaridad se observa que *S. lamacanis* está también relacionado al grupo que incluye *S. arieticanis*, *S. tenella* y *S. cruzi* a *S. arieticanis*, *S. tenella* y *S. cruzi*, que es el grupo que tiene como hospedero definitivo al perro y que forman microquistes con los cuales tiene 88, 89 y 90% de similaridad, respectivamente (Tabla 4) y con los cuales comparte dichas características fenotípicas en común. Cuando se analiza a *S. aucheniae* en el árbol filogenético se observa que su ubicación en el árbol filogenético arroja un "bootstrap" de 73% formando una rama paralela a *S. arieticanis*, *S. tenella* y *S. cruzi*. Las características fenotípicas comunes entre *S. aucheniae* y este grupo son que comparten el mismo hospedero definitivo (perro) e intermediario (rumiante) pero a diferencia de éstos el *S. aucheniae* es formador de macroquistes, mientras que los otros son formadores de microquistes. Consecuentemente, su ubicación como hermana de estas otras especies mencionadas que tienen a los rumiantes como hospedero intermediario, es razonable. Similar resultado obtuvo Holmdahl *et al.* (1999).

Por otro lado, los resultados muestran que la especie *Toxoplasma gondii* se ubica como una especie hermana de *Neospora caninum* cuyo análisis de "bootstrap" arroja un 100%. Similares resultados se obtuvieron en otros trabajos donde establecen una relación muy cercana entre ambas especies (Carreno *et al.*, 1998; Ellis *et al.*, 1994; Escalante and Ayala, 1995; Holmdahl *et al.*, 1994; Jeffries *et al.*, 1997). En el presente estudio se decidió usar 2 especies miembros del phylum Apicomplexa (*Eimeria tenella* y *Babesia bovis*) como grupo externo para el análisis filogenético (Figuras 4,5 y Tabla 4), los cuales han sido usados en trabajos previos para el análisis de especies de Apicomplexas (Jeffries *et al.*, 1997; Mugridge *et al.*, 1999a; Mugridge *et al.*, 1999b; Mugridge *et al.*, 2000). La congruencia entre los cuatro árboles con respecto al grupo externo (*Eimeria tenella* y *Babesia bovis*) fue alta (Figura 4).

CONCLUSIÓN

Se confirma que la especie que produce microquistes en alpacas designada como *S. lamacanis* pertenece a una especie diferente a la productora de macroquistes denominada *S. aucheniae*.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia y en la Estación Experimental de Alpacas en Lurín de la Universidad Peruana Cayetano Heredia a cargo del Dr. Armando Hung. **El presente trabajo de investigación fue realizado gracias al otorgamiento de las siguientes subvenciones o financiamientos: FAO Ref: TCP/RLA/2914 (Facultad de Veterinaria y Zootecnia -UPCH, 2003); CONCYTEC - PROCYT Ref: N°444-2004-CONCYTEC-OAJ (Facultad de Veterinaria y Zootecnia - UPCH, 2004) y CONCYTEC - Beca de Postgrado Ref: N°280-2005-CONCYTEC-OAJ (Facultad de Ciencias y Filosofía-UPCH, 2005).**

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Carreno RA, Schnitzler BE, Jeffries AC, Tenter AM, *et al.* 1998. Phylogenetic analysis of coccidian based on 18S rDNA sequence comparison indicates that *Isospora* is most closely related to *Toxoplasma* and *Neospora* *J Eukaryot Microbiol* **45**:184-188.
- Carreno RA, and Barta JR. 1999. An eimeriid origin of isosporoid coccidian with Stieda bodies as shown by phylogenetic analysis of small subunit ribo-somal RNA gene sequences. *J Parasitol* **85**:77-83.
- Dole EI, D, Koudela B, Jirku M, Hypsa V, Obornik M, Votypak J, *et al.* 1999. Phylogenetic analysis of *Sarcocystis* spp. of mammals and reptiles supports the coevolution of *Sarcocystis* spp. with their final hosts. *Int J Parasitol* **29**:795-798.
- Ellis JH, Morrison D, and Johnson A. 1994. Molecular phylogeny of sporozoan parasites. *Today's Life Science* **6**:30-34.

- Ellis J, and Morrison D.** 1995. Effects of sequence alignment on the phylogeny of *Sarcocystis* deduced from 18S rDNA sequences. *Parasitol Res* **81**:696-699.
- Escalante AA, and Ayala FJ.** 1995. Evolutionary origin of *Plasmodium* and other Apicomplexa based on rRNA genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **92**:5793-5797.
- Fenger CK, Granstrom DE, Langemeier JL, Gajadhar A, Cothran G, Tramontin RR, et al.** 1994. Phylogenetic relationship of *Sarcocystis neurona* to other members of the family Sarcocystidae based on small subunit ribosomal RNA gene sequence. *J Parasitol* **80**:966-975.
- Flores E, Gutiérrez G, Trejo W, Téllez J y Zárate A.** 1993. Manual de producción de alpacas y tecnología de sus productos. Proyecto TTA 1° Ed. p. 142.
- Gajadhar AA, Marquardt WC, Hall R, Gunderson J, Ariztia-Carmona EV, and Sogin ML.** 1991. Ribosomal RNA sequences of *Sarcocystis muris*, *Thileria annulata* and *Cryptosporidium parvum* reveal evolutionary relationships among apicomplexans, dinoflagellates, and ciliates. *Molecular and Biochemical Parasitology* **45**:147-154.
- Guerrero C, Hernández J y Alva J.** 1967. *Sarcocystis* en alpacas. *Rev Fac Med Vet Lima* **69**:76.
- Holmdahl OJM, Mattsson JG, Ugglá A, and Johansson KE.** 1994. The phylogeny of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* based on ribosomal RNA sequences. *FEMS Microbiology Letters* **119**:187-192.
- Holmdahl OJM, Morrison DA, Ellis JT, and Huang LT.** 1999. Evolution of ruminant *Sarcocystis* (Sporozoa) parasites based on small ribosomal rDNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* **11**:27-37.
- Hung A and Medrano G.** 2003a. Universal PCR for detection of *Haemophilus paragallinarum*, *Ornithobacterium rhinotracheale* and *Pasteurella multocida* in chickens. XIII Congress of the World Veterinary Poultry Association. Program and Abstracts. AVMA/AAAP. Denver, Colorado, USA. 19-23 Julio 2003. Pag.118.
- Hung A y Medrano G.** 2003b. Nueva técnica molecular para el diagnóstico simultáneo de coriza, ORT y cólera aviar. *Mundo Avícola y Porcino*. **46**:30-32.
- Hung A, Medrano G y Cerón M.** 2003c. PCR universal para el diagnóstico simultáneo de brucelosis, salmonelosis y leptospirosis. *Revista Mundo Veterinario ALAVET* **1**:45-48.
- Hung A y Medrano G.** 2005. Estudio molecular filogenético basado en el análisis del gen SSU rRNA de *Sarcocystis* en alpacas en la sierra del Perú. *Revista Médica Herediana* **16**: 29. Libro de resúmenes.
- Jeffries A, Schnitzler B, Tenter AM, Heydorn AO, and Johnson AM.** 1997. Identification of synapomorphic characters in the genus *Sarcocystis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **44**:338-392.
- Jenkins MC, Ellis JT, Liddell S, Ryce C, Munday BL, Morrison DA, et al.** 1999. The relationship of *Hammondia hammondi* and *Sarcocystis mucosa* to other heteroxenous cyst-forming coccidian as inferred by phylogenetic analysis of the 18S SSU ribosomal DNA sequence. *Parasitology* **119**:135-142.
- Leguía G, Guerrero C, Sam R. y Chavez A.** 1989. Infección experimental de perros y gatos con micro y macroquistes de *Sarcocystis* de alpacas (Lama pacos). *MV Rev Cienc Vet* **5**:10-13.
- Medrano G y Hung A.** 2002. Detección de *Salmonella* en muestras de harina de pescado mediante la técnica de la reacción en cadena por la polimerasa (PCR). XVI Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias. Huanuco, Perú. Pag.75.
- Ministerio de Agricultura.** 1973. Estudios de la evaluación de problemas de carnes en el Perú. Tomo V. Lima, Perú.
- Ministerio de Agricultura.** 1999. Producción pecuaria e industrial avícola. Oficina de Información Agraria. p. 748.
- Mugridge NB, Morrison DA, Johnson AM., Luton K, Dubey JP, Votypka J, et al.** 1999a. Phylogenetic relationships of the genus *Frenkelia*: a review of its history and new knowledge gained from comparison of large subunit ribosomal ribonucleic acid gene sequences. *Int J Parasitol* **29**:957-972.

- Mugridge NB, Morrison DA, Heckerth AR, Johnson AM, and Tenter AM.** 1999b. Phylogenetic analysis based on full-length large subunit ribosomal RNA gene sequence comparison reveals that *Neospora caninum* is more closely related to *Hammondia heydorni* than to *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* **29**:1545-1556.
- Mugridge NB, Morrison DA., Jakel T, Heckerth AR, Tenter AM, and Johnson AM.** 2000. Effects of sequence alignment and structural domains of ribosomal DNA on phylogeny reconstruction for the protozoan family Sarcocystidae. *Mol. Biol. Evol.* **17**:1842-1853.
- Olsen GJ.** 1987. Earliest phylogenetic branchings: comparing rRNA-based evolutionary trees inferred with various techniques. *Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.* **52**:825-837.
- Olsen GJ and Woese CR.** 1993. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB J.* **7**:113-123.
- Relman DA, Schmidt TM, Gajadhar A, Sogin M, Cross J, Yoder K, et al.** 1996. Molecular phylogenetic analysis of Cyclospora, the human intestinal pathogen, suggests that it is closely related to Eimeria species *Journal of Infectious Diseases* **173**:440-445.
- Saitou N and Nei M.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**:406-425.
- Sogin ML. and Gunderson JH.** 1987. Structural diversity of eukaryotic small subunit ribosomal RNAs. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **503**:125-139.
- Tenter AM and Johnson AM.** 1997. Phylogeny of the tissue cyst-forming coccidian. *Adv Parasitol* **39**:69-139.
- Van de Peer Y, Neefs JM, De Rijk P, and De Wachter R.** 1993. Reconstructing evolution from eukaryotic small ribosomal subunit RNA sequences: Calibration of the molecular clock *J Mol Evol* **37**:221-232.
- Van de Peer Y, Van der Auwera G, and De Wachter R.** 1996. The evolution of Stramenopiles and Alveolotes as derived by "substitution rate calibration" of small ribosomal subunit RNA *J Mol Evol* **42**:201-210.
- Votypak J, Hyspa V, Jirku M, Flegr J, Vavra J, and Lukes J.** 1998. Molecular phylogenetic relatedness of *Frenkelia* spp. (Protozoa Apicomplexa) to *Sarcocystis falcatula* Stiles 1893: is the genus *Sarcocystis* paraphyletic? *J Eukaryot Microbiol* **45**:137-141.

Fecha de recepción: 14/12/2009

Fecha de aceptación: 24/03/10