



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

Identificación morfológica y molecular de larvas de tercer estadio avanzado (AdvL₃) de *Gnathostoma* (Spirurida: Gnathostomatidae) de peces de la cuenca del Río Ostuta, Oaxaca

**INFORME DE SERVICIO SOCIAL
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

BIÓLOGO

PRESENTA

Diana Laura Desentis Pérez
2182035170

ASESORES

Interno:

M. en C. Miguel Á. Mosqueda Cabrera
Depto. El Hombre y su Ambiente
No. Ec. 22011

Externo:

M. en C. Luis García Prieto
Depto. de Zoología, Laboratorio de
Helmintología, UNAM

Ciudad de México, Marzo de 2023

“Aquel que contempla con sus ojos la belleza, no es ya tributario de la muerte, sino de la naturaleza, cuya belleza ha comprendido. Y si sus ojos sirven realmente para ver, llegará a ser, inexcusablemente, naturalista.”

Konrad Lorenz

“Die natur geht ihren Gang, and was uns als Ausnahme erscheint, ist in der Regel.”

“La naturaleza sigue su propio camino, y lo que nos parece la excepción es la regla.”

R. G. Chitwood

*A mi familia,
por ser las raíces que sostuvieron
la búsqueda incesante de mis ramas.*

*A Miguel,
por redimir el cauce de un río
que corría alebrestado.*

*A E. Rodrigo, mi mar,
por mostrarme que la inmensidad abraza
por amarme y permitirme amarle.*

Agradecimientos

Existe una larga lista de personas que apoyaron en el proceso de terminar el escrito que aquí presento, extendiendo mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que me brindaron sin dudar palabras, ideas y por supuesto su conocimiento.

Quisiera comenzar agradeciendo profundamente a Manuel Matus Martínez y a su familia por acogerme en su hermosa tierra, de donde proviene el material que he trabajado en la presente investigación, por brindarme no solo conocimientos académicos sino de la vida. Por supuesto a mi fiel compañera en campo, Tania Araceli Padilla Bejarano, por acompañarme y darme ánimo en los momentos lejos de nuestro hogar, por prestarme su talento y ser autora de los dibujos a mano que aquí presento.

A mis queridos compañeros de la licenciatura, en especial a mis amadas Daniela e Itzayana por brindarme la amistad más sincera, el consejo más fiel y el abrazo más dulce. A mis amigos de la UAM por acogerme en una ciudad extraña y acompañarme en el camino. A E. Rodrigo, por siempre recordarme la emoción y el amor que le tengo a la biología, por su apoyo infinito y el amor más sincero.

A mi familia, a Manuel y Verónica mis padres, a mis hermanos Laura, Manuel, Alejandra y Luis que siempre los traigo conmigo, a mis tías Socorro y Angélica, a mi abuela Trinidad.

A los integrantes del Instituto de Biología UNAM que me ayudaron en el proceso de investigación, en especial a Andrea Rebollo y Víctor M. Sosa Jiménez por su ayuda en el trabajo molecular, a Laura Vázquez y Nelly López de LaNaBIO, por su ayuda en la secuenciación molecular. A Uriel Montes de Oca y Andrés Velázquez Brito por su apoyo y paciencia en el análisis filogenético.

A mis asesores, al M. en C. Luis García Prieto por su tan atinada crítica y extremada paciencia al corregir mis errores; al M. en C. Miguel Ángel Mosqueda Cabrera por su constante apoyo y crítica severa que hizo que todo el trabajo tuviera sentido, por supuesto por toda la confianza y su amistad incondicional.

Para finalizar a la Universidad Autónoma Metropolitana, en especial a mi amada unidad Xochimilco, por ser mi casa abierta al tiempo y a los profesores que la habitan que sin dudar lo corrigieron mi camino.

RESUMEN: Una especie de *Gnathostoma* fue aislada de hospederos naturales en dos fases de su ciclo de vida (AdvL₃ y juvenil), en la cuenca del Río Ostuta, Oaxaca. La identificación taxonómica se realizó mediante dos marcadores moleculares con alto grado de divergencia evolutiva (ITS-2 y COI), en conjunto con una descripción morfométrica minuciosa. El análisis de distancias genéticas y la inferencia de la filogenia entre especies del género, en conjunto con las características morfológicas de las AdvL₃ determinaron a la especie como muy emparentada, pero taxonómicamente diferente a *G. turgidum* y distinta a las demás especies presentes en México y el mundo. Se reconoce que el marcador molecular COI es el más efectivo para identificar especies muy cercanas evolutivamente con poco tiempo de divergencia, debido a su rápida tasa sustitución de nucleótidos; asimismo, se recomienda aumentar el uso de este marcador molecular para identificar especies de nemátodos parásitos, sobre todo aquellos con potencial zoonótico como lo son las especies del género *Gnathostoma*.

Palabras clave: Marcadores moleculares, especies crípticas, gnatostomiasis, taxonomía integrativa.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	MARCO TEÓRICO	2
2.1.	El género <i>Gnathostoma</i> , Owen 1836	2
2.2.	Ciclo de vida	2
2.2.1.	Gnatostomiasis humana	3
2.3.	Caracterización morfológica	3
2.3.1.	Caracterización morfológica del género <i>Gnathostoma</i>	4
2.4.	Caracterización molecular	5
2.4.1.	Marcador molecular ITS-2	5
2.4.2.	Marcador molecular COI	5
III.	OBJETIVOS	7
3.1.	Objetivo general	7
3.2.	Objetivos específicos	7
IV.	MATERIAL Y MÉTODOS	8
4.1.	Área de estudio	8
4.2.	Captura de hospederos	9
4.3.	Obtención de individuos de <i>Gnathostoma</i>	9
4.3.1.	Obtención de larvas	9
4.3.2.	Obtención de adultos	9
4.3.3.	Fijación y conservación	10
4.4.	Identificación molecular	10
4.4.1.	Extracción del ADN	10
4.4.2.	Amplificación del ADN	10
4.4.3.	Purificación y secuenciación	11
4.4.4.	Limpieza y alineamiento de secuencias	11
4.4.5.	Análisis de distancias genéticas	12
4.4.6.	Análisis filogenético	12
4.5.	Caracterización morfológica	13
4.5.1.	Caracterización de las AdvL ₃ de <i>Gnathostoma</i>	13
4.5.2.	Caracterización de formas juveniles	13
4.6.	Microscopía Electrónica de Barrido	13
4.7.	Parámetros de la infección	14

V.	RESULTADOS	15
5.1.	Identificación taxonómica.....	15
5.1.1.	Identificación molecular.....	15
5.1.1.1	Análisis de distancias genéticas	16
5.1.1.2	Análisis de filogenético	17
5.1.2.	Identificación morfológica.....	21
5.1.2.1.	Descripción morfológica de <i>Gnathostoma</i>	21
	• <i>Gnathostoma</i> sp. I (AdvL ₃)	21
	• <i>Gnathostoma</i> sp. I (Juvenil)	25
5.2.	Parámetros de la infección.....	30
VI.	DISCUSIÓN	31
VII.	CONCLUSIONES	36
VIII.	LITERATURA CITADA	37

I. INTRODUCCIÓN

Estudiar la enorme diversidad de formas de vida que existen en el mundo es imposible, pero al fijar la vista en el estudio de organismos fascinantes como lo son los parásitos, descubrimos complejas estrategias de supervivencia asociadas a sus ciclos de vida; esto hace que su estudio requiera el empleo de diversas técnicas cada vez más sofisticadas y precisas. Entre el enorme complejo de especies parásitas, se encuentran los nematodos del género *Gnathostoma* (Spirurida: Gnathostomatidae) representados por aproximadamente 20 especies, de las cuales tres se distribuyen en México: *G. binucleatum*, *G. lamothei* y *G. turgidum* (Bertoni-Ruiz *et al.*, 2011).

Los ciclos de vida complejos como el que presentan las especies de *Gnathostoma* determinan que su estudio sea fragmentado y no se tenga claridad en muchos aspectos del mismo. Esto es importante ya que la gnatostomiasis humana es una enfermedad parasitaria con alta incidencia principalmente en Asia y en Latinoamérica (Herman y Chiodini, 2009). En México, se ha demostrado que la especie causante de esta parasitosis es *G. binucleatum* (Almeyda-Artigas *et al.*, 2000); sin embargo, es necesario conocer con mayor detalle los ciclos de vida de las otras especies distribuidas en el territorio, debido a que la posibilidad de ser agentes de esta enfermedad sigue siendo vigente. En este sentido, la identificación taxonómica de las especies presentes en nuevas localidades se vuelve crucial para su entendimiento.

Los métodos tradicionales de identificación poseen debilidades asociadas a la dificultad de reconocimiento de caracteres morfológicos específicos de la especie, sobre todo en diferentes etapas de los ciclos de vida (Odrenjicka *et al.*, 2014), como sucede en el caso de las especies del género *Gnathostoma*. Actualmente el uso de herramientas moleculares ha sido de gran ayuda para el esclarecimiento de la correcta asignación taxonómica de diversas especies de nemátodos parásitos (Ferri *et al.*, 2009). Dentro de los marcadores moleculares de gran valor taxonómico para nemátodos, el segundo espaciador interno transcrito (ITS-2) del ADNr se ha utilizado exitosamente para la identificación molecular de diversas especies (Powers *et al.*, 1997) y su funcionalidad en especies del género *Gnathostoma* ha sido bien documentada (Almeyda-Artigas *et al.*, 2000; Hernández-Gómez *et al.*, 2010; Cole *et al.*, 2014). Por otra parte, la subunidad I del citocromo c oxidasa (COI) del ADNm ha sido utilizada ampliamente para la identificación de diferentes especies de nemátodos (Ferri *et al.*, 2009; Sidall *et al.*, 2012) y debido a su alta tasa de evolución ha sido propuesto como bioidentificador universal en el código de barras del ADN (Hebert *et al.*, 2003).

Por lo tanto, la presente investigación tuvo como objetivo identificar taxonómica y molecularmente a individuos del género *Gnathostoma* en dos estadios de desarrollo distintos, aislados de hospederos naturales presentes en la cuenca del Río Ostuta, Oaxaca mediante dos marcadores moleculares con alto grado de divergencia evolutiva (ITS-2 y COI) y comparar su valor como identificadores taxonómicos.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 El género *Gnathostoma*, Owen 1836

El género *Gnathostoma* pertenece al extenso orden de los Spirurida, nematodos con ciclos de vida complejos (Díaz, 2015). En 1836 Owen describió a *Gnathostoma spinigerum* encontrado en estadio adulto en el tubo digestivo de un tigre (*Panthera tigris*) del zoológico de Londres, siendo esta la primera especie registrada para el género. A partir de este hallazgo, se han descrito cerca de 20 especies de *Gnathostoma*, distribuidas principalmente en Asia y en América, parasitando diversas especies de mamíferos carnívoros (Bertoni-Ruiz *et al.*, 2011).

Entre las especies distribuidas en Europa (provenientes de Asia), se encuentran: *G. spinigerum* Owen, 1836, *G. hispidum* Fedchenko, 1872, *G. doloresi* Tubanguí, 1925, *G. nipponicum* Yamaguti, 1941, *G. vietnamicum* Le Van-Hoa, 1965 y *G. malaysiae* Miyasaki y Dunn, 1965 (Mosqueda-Cabrera *et al.*, 2009). Por otra parte, el género *Gnathostoma* en América se encuentra representado por siete especies; dos de ellas infectan a mamíferos de la familia Felidae: *G. binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991 y *G. americanum* Travassos, 1925; dos especies parásitas de la familia Procyonidae: *G. procyonis* Chandler, 1942 y *G. lamothei* Bertoni-Ruiz, García-Prieto, Osorio-Sarabia y León-Règagnon, 2005; dos especies parásitas de la familia Mustelidae: *G. miyazakii* Anderson, 1964 y *G. socialis* Leidy 1858, y finalmente una especie parásita de la familia Didelphidae; *G. turgidum* Stossich 1902; distribuyéndose estas siete especies desde Norteamérica hasta Argentina (Bertoni-Ruiz *et al.*, 2011).

De las especies americanas, para México se han reportado tres: *G. binucleatum*, de distribución principalmente Neotropical, *G. lamothei*, endémica del país y *G. turgidum* en toda América. El género ha sido reportado en 14 estados, de los cuales Oaxaca, Tabasco y Veracruz, son los que presentan el mayor número de localidades que muestran una infección positiva de alguna de las tres especies mencionadas (Pérez-Álvarez *et al.*, 2008; García-Márquez *et al.*, 2009).

2.1.1 Ciclo de vida

Las especies del género *Gnathostoma* tienen un ciclo de vida complejo, utilizando tres hospederos: dos intermediarios y un definitivo (Almeyda-Artigas *et al.*, 2000). Los gusanos adultos se encuentran normalmente en tumores en las paredes del estómago de diversos mamíferos carnívoros, aunque algunas especies parasitan los riñones o el esófago. La parte posterior del gusano sobresale a través de orificios del tumor para realizar la fecundación y la liberación de huevos al lumen intestinal. Los huevos de *Gnathostoma*, con protuberancias en los extremos (tapones), son expulsados con las heces del hospedero definitivo, estos pueden llegar mediante escorrentías a un cuerpo de agua, una vez en el agua los huevos se desarrollan a larva de primer estadio (L₁), que después de 8 a 10 días muda y eclosiona como larva de segundo estadio (L₂); esta larva con forma de vida libre retiene la cutícula de la L₁, mide aproximadamente 250-300 µm, tiene el extremo anterior redondeado y en este posee estructuras parecidas a dientes. Permanece muy

activa en el agua hasta que es ingerida por un copépodo (primer hospedero intermediario). En el intestino del copépodo la larva elimina la cutícula del primer estadio, penetra las paredes del intestino y se establece en el hemocele, donde se desarrolla rápidamente y tiene una segunda muda. La larva de tercer estadio temprano (EaL₃) mide aproximadamente 500 µm y posee en el extremo anterior un bulbo cefálico espinoso característico de los adultos; este estadio larvario normalmente no es infeccioso para los hospederos definitivos. Para que la infección ocurra es necesario el establecimiento de la larva en un segundo hospedero intermediario, normalmente peces, donde la larva se enquistaba en la musculatura y se desarrolla a larva de tercer estadio avanzado (AdvL₃), el cual representa el estadio larvario infeccioso para los hospederos definitivos; sin embargo, antes la larva puede pasar de un hospedero a otro durante la depredación, conocido como hospedero paraténico, representados por distintos grupos de vertebrados como ranas, serpientes, lagartijas, tortugas, aves y mamíferos; el humano constituye un hospedero accidental para este estadio larvario. Finalmente, cuando el hospedero definitivo ingiere a algún hospedero intermediario o paraténico infectado, la larva se desarrolla a juvenil y migra al hígado donde esperará las condiciones adecuadas antes de trasladarse al intestino para la reproducción, completando así su ciclo de vida (Anderson, 2000).

2.1.2 Gnatostomiasis humana

La gnatostomiasis es una parasitosis producida por la ingestión accidental de la larva de tercer estadio avanzado de nematodos del género *Gnathostoma* (Lamothe-Argumedo y Caballero, 2002). Es una enfermedad endémica de zonas tropicales y subtropicales de Asia y Latinoamérica, particularmente México (Herman y Chiodini, 2009). La adquisición de la enfermedad se atribuye principalmente al consumo de pescado crudo o mal cocido; en México el consumo de *cebiche* (pescado crudo marinado) es común en zonas de Veracruz y Oaxaca y esta se considera la principal forma de infección (Lamothe-Argumedo, 2003). De todas las especies pertenecientes al género *Gnathostoma*, hasta ahora se ha demostrado que únicamente las larvas de tercer estadio avanzado de: *G. spinigerum*, *G. hispidum*, *G. nipponicum*, *G. doloresi* y *G. binucleatum*, infectan al humano y son responsables de la gnatostomiasis (Bertoni-Ruiz *et al.*, 2011); en México se ha resaltado el papel de *G. binucleatum* como el único agente causal de dicha parasitosis.

2.2 Caracterización morfológica

Entender la complejidad de los organismos parásitos es una tarea complicada, en este camino la identificación taxonómica ha sido clave. La elección de un carácter morfológico que pueda ser distinguible entre grupos puede llegar a ser poco representativo, un solo carácter puede llevarnos a interpretaciones lejanas a la realidad; sin embargo, el uso de caracteres comunes en conjunto puede acercarnos. La identificación taxonómica mediante caracteres morfológicos en los estudios modernos de nematodos ha sido exitosa, siendo sus técnicas cada vez más afinadas y precisas; sin embargo, debido a los complejos ciclos de vida que presentan dichos organismos capaces de

cambiar drásticamente de apariencia a medida que se desarrollan, normalmente las claves de identificación refieren a los estadios adultos, dejando de lado los estadios larvarios intermedios; por lo tanto, un solo conjunto de caracteres no son capaces de reflejar su complejidad morfológica (Anderson *et al.*, 1974).

2.1.3 Caracterización morfológica del género *Gnathostoma*

Las especies del género *Gnathostoma*, como la mayoría de los nematodos, presentan variaciones morfológicas según su estadio de desarrollo (Anderson, 2000) la descripción tanto de adultos como larvas ha sido extensamente documentada para el género (Miyazaki, 1960; Mosqueda-Cabrera, 2003; Díaz-Camacho *et al.*, 2002). Los caracteres morfológicos principales a tomar en consideración para identificación de la larva de tercer estadio avanzado han sido aquellos referentes al bulbo cefálico. Miyazaki (1960) considera que para la identificación y distinción de las especies de *Gnathostoma* es importante la cuantificación de los ganchos en las hileras del bulbo cefálico, así como su forma (base y espina) y tamaño; además, se han utilizado otros caracteres referentes al cuerpo complementarios a los anteriores, como: el tamaño y ancho del cuerpo, tamaño y ancho del esófago y su proporción con la longitud corporal, cantidad de hileras transversales de espinas que cubren el cuerpo, ubicación de las papilas cervicales y el poro excretor.

Las larvas de tercer estadio avanzado de las tres especies de *Gnathostoma* descritas en México han sido bien caracterizadas; sus descripciones se basan en comparativas taxonómicas. Por ejemplo, la larva de *G. binucleatum* difiere de la especie asiática *G. spinigerum* únicamente por el número de ganchos por hilera presentes en el bulbo cefálico, con un promedio 4 ganchos menos, además de tener una coloración rojiza (Almeyda-Artigas *et al.*, 1991; Akahane *et al.*, 1994). En el caso de *G. turgidum*, Mosqueda-Cabrera *et al.* (2009) consideran varios aspectos claves para su distinción de otras especies presentes en América, como el tamaño de la larva, que es aproximadamente dos o tres veces más pequeña que *G. binucleatum* y *G. procyonis*; los ganchos de la cuarta hilera que presentan un tamaño menor en comparación a las tres hileras anteriores, lo cual no sucede en las otras dos especies, y finalmente la ubicación del poro excretor en la hilera 22 (en *G. binucleatum* se presenta en la hilera 28). Por último, *G. lamothei* se distingue de *G. binucleatum* por las dimensiones del bulbo cefálico, así como por el menor tamaño y número de ganchos en las hileras del mismo, la posición que ocupa el poro excretor (22 vs 30) y por la proporción que ocupa el esófago con relación al ancho del cuerpo (40 vs 70%); *G. lamothei* es distinguible de *G. turgidum* por el tamaño corporal (4,487 vs 1,670µm) y el tamaño de los ganchos de la cuarta hilera del bulbo cefálico en esta última (Gaspar-Navarro *et al.*, 2013). Estas descripciones confirman la validez taxonómica de los caracteres morfológicos antes mencionados.

2.3 Caracterización molecular

La asignación específica de nemátodos parásitos es de gran importancia debido a que permite la comprensión de los ciclos de vida asociados a la especie; en aquellos con potencial zoonótico,

permite detectar y generar estrategias para el monitoreo de las vías de transmisión parasitaria (Odrenjicka *et al.*, 2014). Los métodos tradicionales (morfológicos) anteriormente descritos poseen debilidades asociadas a la dificultad de reconocimiento de caracteres morfológicos diagnósticos de la especie, sobre todo en diferentes etapas de su ciclo de vida, Ante esta dificultad de reconocimiento y a la luz de nuevas técnicas moleculares, surgieron propuestas complementarias para la identificación de especies, en las que el énfasis principal es el análisis de fragmentos específicos de ADN de las especies estudiadas.

2.1.4 Marcador molecular ITS-2

Diversos marcadores moleculares han sido propuestos como identificadores taxonómicos de especies; en especial la región interna transcrita (ITS), ubicada entre la matriz repetitiva de los genes ribosomales 18S y 28S, ha sido utilizada entre los procariontes para la identificación taxonómica de especies debido a su alta tasa de evolución; en específico para nemátodos el segundo espaciador interno transcrito (ITS-2) ha sido utilizado en la identificación de una amplia gama de nemátodos parásitos y de vida libre (Hoste *et al.*, 1993; Powers *et al.*, 1997).

Dentro del género *Gnathostoma* la identificación molecular se ha realizado a través del estudio del marcador molecular ITS-2, siguiendo el método propuesto por Almeyda-Artigas *et al.*, (2000), demostrando la eficacia de este marcador molecular para diferenciar a las especies del género. Los trabajos que han realizado la identificación molecular de las tres especies de *Gnathostoma* documentadas en México son: para *G. binucleatum* (Almeyda-Artigas *et al.*, 2000; Kifune *et al.*, 2004; Martínez-Salazar y León-Règagnon, 2005; García-Márquez *et al.*, 2009; Díaz-Camacho *et al.*, 2019); para *G. lamothei* (Hernández-Gómez *et al.*, 2010; Cole *et al.*, 2014) y para *G. turgidum* (Cole *et al.*, 2014; Díaz-Camacho *et al.*, 2019).

2.1.5 Marcador molecular COI

Más recientemente, el código de barras de la vida (*DNA barcoding*) ha sido nombrado como un sistema de identificación microgenómica a partir del análisis de un pequeño fragmento del ADN, que explora la diversidad de las secuencias entre las especies comparadas (Hebert *et al.*, 2003) y que permite correlacionar cualquier etapa o estadio de desarrollo de la especie en cuestión como una sola identidad molecular (Ferri *et al.*, 2009). El primer fragmento del gen mitocondrial citocromo c oxidasa (COI o *CoxI*) ha sido utilizado en este método como un bioidentificador universal para animales. Debido a su alta tasa de evolución molecular, tres veces mayor a otros genes mitocondriales, la evolución de este gen es suficientemente rápida para permitir la identificación de especies cercanamente emparentadas, que otros genes con una menor tasa evolutiva no permitirían discriminar como distintos (Hebert *et al.*, 2003).

A pesar del éxito del sistema de código de barras de la vida para determinar entidades taxonómicas y su potencial para aumentar la tasa de descubrimiento de diversas especies parásitas y sus ciclos de vida (Besansky *et al.*, 2003), esta técnica, con algunas excepciones, no ha sido ampliamente

aceptada en el campo de la parasitología (Sidall *et al.*, 2012). Los métodos adecuados para el analizar el código de barras de la vida está aún bajo estudio (Ferri *et al.*, 2009) y la principal deficiencia es la escasez de datos disponibles en bancos genéticos para su comparación (Sidall *et al.*, 2012; Odrenjicka *et al.*, 2014).

El uso del COI como identificador taxonómico para el género *Gnathostoma*, ha sido limitado; Ando *et al.* (2006) compararon la eficacia entre los marcadores moleculares ITS-2 y el COI para las cuatro especies de gnatostomidos asiáticas (*G. spinigerum*, *G. doloresi*, *G. nipponicum*, *G. hispidum*) y una especie americana (*G. binucleatum*), determinando que ambos marcadores moleculares son de gran valor taxonómico. Sin embargo, a la fecha únicamente autores asiáticos han hecho uso de este marcador molecular tanto para identificar a especies del género (Ando *et al.*, 2006; Eamsobhana *et al.*, 2017), y para determinar variaciones intra-específicas en *G. spinigerum* (Ngarmamonpirat *et al.*, 2005); no así en América donde el uso del marcador molecular ITS-2 es el determinante taxonómico por excelencia, con excepción de Maldonado *et al.*, (2020) quienes utilizan el fragmento del gen COI de *G. turgidum*, pero únicamente como grupo externo en el análisis filogenético del género *Physaloptera*.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Establecer mediante los marcadores moleculares ITS-2 y COI la identidad taxonómica de individuos del género *Gnathostoma* aislados de hospederos naturales en la cuenca del Río Ostuta, Oaxaca.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar morfológica y molecularmente a las larvas de tercer estadio avanzado (AdvL₃) obtenidas a partir de hospederos naturales (peces).
- Caracterizar morfológica y molecularmente a un juvenil de *Gnathostoma* obtenido a partir de un hospedero natural, *D. marsupialis*.
- Estimar los parámetros de la infección de larvas de tercer estadio avanzado (AdvL₃) de *Gnathostoma* en peces de la cuenca del Río Ostuta.
- Comparar el valor de los dos marcadores moleculares (ITS-2 y COI) como identificadores de entidades taxonómicas para el género *Gnathostoma*.
- Dilucidar un modelo filogenético del género *Gnathostoma* en el que se incluya a los gnatostomidos presentes en la cuenca del Río Ostuta.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Área de estudio

La presente investigación se llevó a cabo en las inmediaciones de San Francisco Ixhuatán, Oaxaca, en cuerpos de agua pertenecientes a la cuenca del Río Ostuta, el cual forma parte de la porción oriente de la región hidrográfica Tehuantepec (RH22). El área de estudio se localiza en la parte sur-oriental del estado de Oaxaca, en la zona costera del Golfo de Tehuantepec, que limita con el estado de Chiapas. La laguna Las Garzas es un cuerpo de agua permanente, remanente de un antiguo cauce de río ubicado en la región hidrográfica Costa de Chiapas (RH23) en la cuenca del Mar Muerto, que colinda al oeste con la cuenca del Río Ostuta (CONAGUA, 2010, 2014) y es irrigada por la misma (Figura 1).

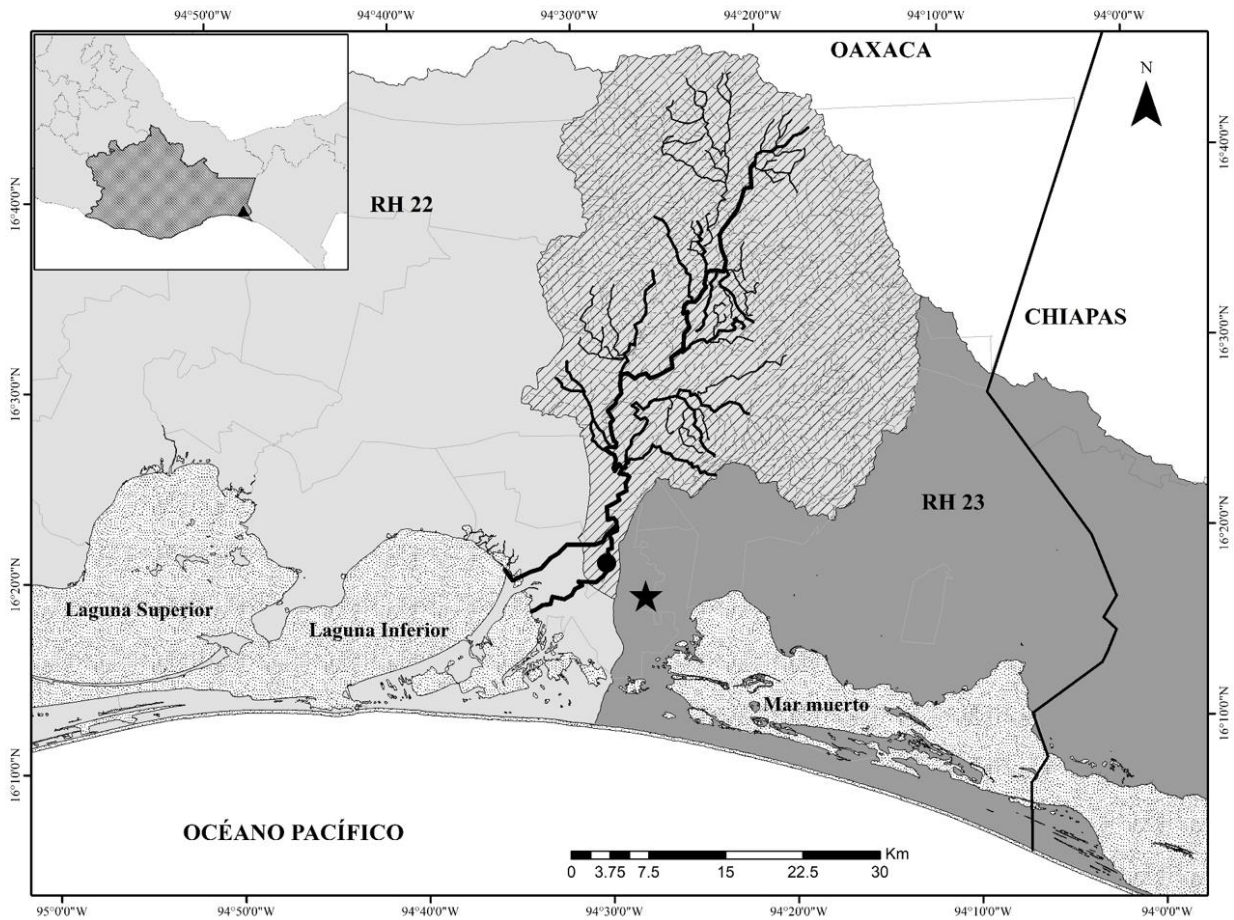


Figura 1. Cuenca del Río Ostuta, Oaxaca en la región hidrográfica Tehuantepec (RH22). • Parte baja del Río Ostuta. ★ Laguna “Las Garzas” ubicada en la región hidrográfica Costa de Chiapas (RH23).

4.2 Captura de hospederos

La captura de peces se realizó durante el mes de marzo de 2022 utilizando redes de pesca en dos cuerpos de agua asociados a la cuenca del Río Ostuta, la parte baja del río (16°19'20''N y 94°30'00''O) y en la laguna Las Garzas (16°17'46''N y 94°27'17''O) (Figura 1). Los peces fueron identificados de acuerdo con Miller *et al.*, (2009). Los tlacuaches fueron capturados con trampas Tomahawk plegables, colocadas estratégicamente a orillas de la parte baja del Río Ostuta, utilizando sardina y plátano como cebo; los tlacuaches fueron identificados según las características morfológicas del pelaje y los huesos craneales de acuerdo con Gardner (1970).

4.2.1 Obtención de larvas

La revisión de la musculatura de los peces se realizó a contra luz entre dos vidrios con ayuda de un microscopio estereoscópico y posteriormente, para tener certeza de la eficacia del método anterior, se realizó la digestión artificial de la musculatura con pepsina comercial (16gr de pepsina, 6gr de NaCl y 8ml de HCl en un litro de agua). La digestión fue sometida a un periodo de incubación de aproximadamente 6 horas con una temperatura constante de 32°C y con agitación permanente. Una vez digerida la musculatura, se retiraron las porciones más grandes de tejido con ayuda de un tamiz; el líquido restante fue decantado y lavado en numerosas ocasiones hasta obtener una solución visible para su observación. Se realizó la búsqueda meticulosa de larvas con ayuda de un microscopio estereoscópico, cajas de Petri y agujas de disección.

4.2.2 Obtención de adultos

Con el fin de determinar la presencia de gusanos adultos de *Gnathostoma* en los tlacuaches capturados, se realizó un análisis coproparasitológico de Faust en busca de huevos (Álvarez-Guerrero *et al.*, 2012); se colectaron heces de cada hospedero que fueron diluidas en una solución saturada de cloruro de sodio en viales Ependorff de 50ml; se tomaron muestras de la parte superior de cada solución que fueron colocadas en un portaobjetos para su observación al microscopio óptico. Los hospederos fueron anestesiados con una dosis 3 mg/kg de Xilasina y 0.5mg/kg de Ketamina vía intramuscular y posteriormente sacrificados con una sobredosis al corazón, siguiendo los protocolos que dicta la norma oficial mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014 (DOF, 2015).

Con ayuda de bisturí, pinzas y tijeras, se realizó la disección del hospedero; se separaron los órganos y fueron revisados meticulosamente el hígado, en busca de juveniles o de lesiones como túneles que indicaran la migración de estos, y el estómago en búsqueda de quistes o tumores característicos de la presencia de adultos (Díaz-Camacho *et al.*, 2010).

4.2.3 Fijación y conservación

Los especímenes de *Gnathostoma* obtenidos se limpiaron con ayuda de pinceles con cerda suave y se seccionaron con agujas quirúrgicas estériles. En el caso de las larvas, se cortaron en dos partes: el extremo anterior (el bulbo cefálico junto con una porción del cuerpo) y el extremo posterior; el juvenil se seccionó en tres partes: el extremo anterior (bulbo cefálico y área espinada), extremo medio, y extremo posterior (bursa). Se realizó un estudio morfométrico de la porción anterior (larvas y juvenil) y la porción posterior (únicamente el juvenil), secciones con características morfológicas diagnósticas importantes; por otra parte, la porción posterior (larvas) y la porción media (juvenil) se destinaron para su estudio molecular. El material para el estudio morfológico fue fijado en etanol al 70% caliente y almacenado en viales con etanol al 70% frío; mientras que el material destinado a procesamiento molecular fue fijado y almacenado en etanol absoluto.

4.3 Identificación molecular

4.3.1 Extracción de ADN

La extracción del ADN se realizó utilizando el kit DNeasy Blood & Tissue (QUIAGEN); las muestras conservadas en etanol absoluto fueron colocadas en tubos Eppendorf de 2ml, previamente etiquetados, con 180µl de buffer ATL y 20µl de proteinasa K, incubados a 56°C por 20 minutos hasta el correcto lisado del tejido. Posteriormente se agregaron 200µl de buffer AL y 200µl de etanol, mezclados y traspasados a columnas con tubos colectores de 2ml. Estos fueron centrifugados a 8000 rpm por un minuto eliminando el sobrenadante, se colocaron 500µl de buffer AW1 y se repitió el proceso, finalmente se colocaron 500µl de buffer AW2, centrifugado a 14000 rpm por tres minutos, se eliminó el sobrenadante y el tubo colector. La columna se traspasó a tubos Eppendorf nuevos de 2ml y se añadió 100µl de buffer AL, centrifugado a 8000 rpm por un minuto para eluir correctamente. Las muestras fueron almacenadas a -90°C.

4.3.2 Amplificación del ADN

Se amplificaron los genes 5.8S, 28S (parcialmente) del ADNr junto con su segundo espaciador interno transcrito (ITS-2) y el gen COI del ADNm, para lo cual se utilizaron *primers* específicos (Tabla 1).

Tabla 1. Primers utilizados para amplificar las regiones ITS-2 y COI del ADN.

Gen	Nombre primer (<i>fwd</i> - <i>rev</i>)	Secuencia (5'>3')	Referencia
ITS-2	BD1-BD2	5'-GTCCTAACAAAGGTTTCCGTA-3' 5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3'	Altschul <i>et al.</i> , 1997
COI	LCO1490-HCO2198	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'	Folmer <i>et al.</i> , 1994
28s	501-504	5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3' 5'-CAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3'	Smythe y Nadler, 2006

Se generó una mezcla maestra de 8.4µl de H₂O, 3µl 5x, 0.25µl de cada *primer* (*forward* y *reverse*) en una concentración de 10 mol, 0.125µl de enzima taq y 3µl de ADN (producto de la extracción) en tubos Eppendorf de 1ml, mezclados vigorosamente. La amplificación se realizó mediante PCR con ayuda de un termociclador, ajustando a perfiles térmicos específicos (Tabla 2). Se verificó la efectividad del procedimiento y el peso molecular de cada muestra mediante electroforesis. Los productos con resultados exitosos fueron almacenados a - 90°C.

Tabla 2. Perfiles térmicos para obtener los productos de la PCR según el gen amplificado.

Gen	Perfil térmico
ITS-2	1 ciclo de 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de 94°C por 1 min, 50°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto; para finalizar 72°C por 10 minutos.
COI	1 ciclo de 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de 94°C por 30s, 42°C por 45s y 72°C por 1 min; para finalizar 72°C por 7 minutos.
28S	1 ciclo de 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de 94°C por 1 min, 50°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto; para finalizar 72°C por 10 minutos.

4.3.3 Purificación y secuenciación del ADN

Los productos de la PCR fueron purificados mediante el kit de purificación QUIAquick PCR (50) (QIAGEN). Las secuencias fueron obtenidas mediante el secuenciador de ADN automatizado ABI Prism 310 en Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y la Salud del IBUNAM con clave INF-LSG-SEC-2022-413.

4.3.4 Limpieza y alineamiento de secuencias

Las secuencias obtenidas fueron limpiadas y editadas para el mejoramiento de su calidad mediante el programa Geneious Prime 2023.0. Una vez recuperadas, las secuencias de mejor calidad fueron ensambladas en sus extremos *forward* y *reverse*. Posteriormente fueron comparadas con el repositorio de secuencias del fragmento ITS-2 y COI del género *Gnathostoma* presentes en el GenBank (Tabla 3) mediante el programa BLAST. El alineamiento de las mismas se realizó mediante el programa MAFFT versión 7.

Tabla 3. Material de los fragmentos ITS-2 y COI de *Gnathostoma* spp. disponibles en el GenBank, utilizados para el análisis filogenético. NP = No publicado.

Gen	<i>Gnathostoma</i> spp.	ID Acceso GenBank	Referencia
ITS-2	<i>G. spinigerum</i>	Z97175	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> , 2000
		KF648553	Cole <i>et al.</i> , 2014
	<i>G. miyazaki</i>	FJ497055	García-Márquez <i>et al.</i> , 2008
	<i>G. nipponicum</i>	JN408314	Lee <i>et al.</i> , NP
	<i>G. hispidum</i>	JQ824057	
	<i>G. binucleatum</i>	Z97176	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> , 2000
		EU915244	Díaz-Camacho <i>et al.</i> , 2008
	<i>G. lamothei</i>	AY818004	Bertoni-Ruíz <i>et al.</i> , 2005
		EU334736	Díaz-Camacho <i>et al.</i> , 2008
		KF648543	Cole <i>et al.</i> , 2014
<i>G. turgidum</i>	Z97176	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> , 2000	
	FJ524381	Díaz-Camacho <i>et al.</i> , NP	
	KF648548	Cole <i>et al.</i> , 2014	
COI	<i>G. spinigerum</i>	AB037132	Kuramochi <i>et al.</i> , NP
	<i>G. nipponicum</i>	JQ824059	Jianshin <i>et al.</i> , 2012
	<i>G. hispidum</i>	JQ824056	Lee <i>et al.</i> , NP
	<i>G. doloresi</i>	JN408299	Li <i>et al.</i> , 2015
	<i>G. binucleatum</i>	AB180103	Ando <i>et al.</i> , 2006
		AB037131	Kuramochi <i>et al.</i> , NP
<i>G. turgidum</i>	KT894798	Sao <i>et al.</i> (en Maldonado <i>et al.</i> , 2020)	

4.3.5 Análisis de distancias genéticas

Se realizaron distintos análisis con ambos marcadores moleculares (ITS-2 y COI) de acuerdo con los objetivos de la presente investigación. Se generó una matriz de distancias genéticas para establecer la similitud entre las distintas especies del género *Gnathostoma* y el material obtenido en la presente investigación, con ayuda del programa MEGA X 11.0.13 utilizando el modelo Kimura 2 parámetros (K2P) de acuerdo con Hebert *et al.* (2003).

4.3.6 Análisis filogenético

El análisis filogenético se realizó con los dos marcadores moleculares (COI, ITS-2), los análisis se realizaron de manera independiente y posteriormente fueron concatenados con un ajuste manual en el programa Mesquite v. 3.6 (Maddison y Maddison, 2019). El programa Modeltest v. 3.0 (Posada y Crandall, 1998) se utilizó para inferir el modelo de evolución con el mejor ajuste. La inferencia filogenética se realizó utilizando Inferencia Bayesiana (IB) en el programa MrBayes v. 3.2.1 (Ronquist *et al.*, 2012). Los ajustes para este análisis se establecieron de la siguiente forma: dos análisis simultáneos con 8 Cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) durante 10^7

generaciones, con un muestreo cada 100 generaciones, descartando el 25% como *burn-in*. Finalizado el análisis, a partir del muestreo de árboles, se calcularon los valores de probabilidad posterior de cada nodo y se construyó un árbol de consenso con una regla de mayoría del 50%, donde se representaron de igual manera los valores de Bootstrap con 10,000 iteraciones. Los resultados se ilustraron en un árbol filogenético construido en el programa FigTree v. 1.4.2 (Rambaut, 2006).

4.4 Caracterización morfológica

4.4.1 Caracterización de AdvL₃ de *Gnathostoma*

Las larvas destinadas al estudio morfométrico se transparentaron con lactofenol de Amann, fueron montadas temporalmente en un portaobjetos excavado para su observación y medición por medio de un microscopio óptico. Se obtuvieron las siguientes características: longitud total y estándar, ancho del cuerpo, largo y ancho del bulbo cefálico, largo y ancho del esófago, longitud de los sacos cervicales, número de ganchos por hilera del bulbo cefálico (I, II, III y IV), número de hileras totales en el cuerpo, posición del poro excretor, las papilas cervicales (derecha e izquierda) y las papilas caudales con relación a las hileras del cuerpo. Todas las medidas se presentan en micras, se especifica el rango y entre paréntesis el promedio seguido de la desviación estándar y el número de observaciones. Un lote de larvas fue depositado en la Colección Nacional de Helmintos de la UNAM, con número de catálogo CNHE 11674.

4.4.2 Caracterización de formas juveniles

Los extremos anterior y posterior del juvenil fueron transparentados con lactofenol de Amann y montados temporalmente en un portaobjetos excavado para su observación y medición por medio de un microscopio óptico. Se cuantificó el número de puntas en las espinas del cuerpo en las siguientes regiones: inmediatamente posteriores al bulbo cefálico, a la altura de las papilas cervicales, a la altura de los sacos cervicales, a la altura de la intersección esófago-intestino, inmediatamente posteriores a la intersección esófago-intestino y en el extremo posterior de la región espinada. Se describió la bursa del juvenil y su patrón de escamación. Además, la proporción entre la longitud de las dos espículas.

4.5 Microscopía electrónica de barrido

Un grupo de larvas fue destinado a microscopía electrónica de barrido (MEB); las larvas fueron fijadas en tetraóxido de osmio en buffer de fosfato, deshidratadas a través de una serie graduada de etanol y secadas a punto crítico con CO₂; finalmente, cubiertas con oro y escaneadas mediante

MEB modelo Hitachi S2460N. Adicionalmente se tomaron fotografías con una cámara digital Nikon montada a un microscopio óptico.

4.4 Parámetros de la infección

Se estimaron los siguientes parámetros de infección: prevalencia, intensidad media y abundancia media, de acuerdo con Bush *et al.* (1997). La distribución de la frecuencia de las larvas permitió conocer la agregación de la población, estimada mediante el parámetro k de la binomial negativa por el método de máxima verosimilitud (Blis y Fisher, 1953).

V. RESULTADOS

Se obtuvieron 82 peces pertenecientes a 5 especies, resultado de la pesca artesanal. En la laguna Las Garzas: *Dormitator latifrons* (36); y en la parte baja del Río Ostuta; *Rhamdia guatemalensis* (10), *Gobiomorus dormitor* (2), *Ictalurus punctatus* (4), *Oreochromis niloticus* (21) y *O. mossambicus* (9). Únicamente *D. latifrons* resultó positivo a la infección con la AdvL₃ de *Gnathostoma*. Se encontraron 51 larvas extraídas de la musculatura por digestión artificial con pepsina, algunas estaban enquistadas y otras libres y ninguna fue obtenida por el método de compresión entre vidrios.

Por otro lado, se capturaron cinco tlacuaches pertenecientes a dos especies: *Philander oposum* (1 hembra y 3 machos) y *Didelphis marsupialis* (1 macho). El único individuo parasitado con una forma juvenil de *Gnathostoma* aislada del hígado fue *D. marsupialis*. Los cuatro individuos restantes fueron liberados en el sitio de colecta.

5.1 Identificación taxonómica

Las larvas de tercer estadio avanzado (AdvL₃) y el juvenil fueron identificados como *Gnathostoma* sp. I de acuerdo a la evidencia molecular, filogenética y taxonómica que se presenta a continuación.

5.1.1 Identificación molecular

Se secuenció exitosamente material de larvas de tercer estadio avanzado aislado de la musculatura de *D. latifrons*, así como del juvenil aislado del hígado de *D. marsupialis* para los dos fragmentos de gen previstos, ITS-2 y COI y para el gen 28S (Tabla 4).

Tabla 4. Secuencias limpias y ensambladas. Calidad de secuencia superior al 60%. Destinadas a su estudio filogenético.

<i>Gnathostoma</i> spp. (Estadio)	Secuencia
<i>Gnathostoma</i> sp I (AdvL ₃)	ITS-2
	COI
	28S
<i>Gnathostoma</i> sp. I (Juvenil)	ITS-2
	COI
	28S

De acuerdo al análisis de correspondencia del programa BLAST tanto el marcador molecular ITS-2 como el COI de *Gnathostoma* del presente estudio corresponde al material genético disponible en GenBank para *G. turgidum* con diferentes grados de similitud; para el ITS con una similitud del 99.44-100.00% y en menor grado para el COI de (93.00%).

5.1.1.1 Análisis de distancias genéticas

El análisis de distancias genéticas mediante el modelo K2P del ITS-2 determinó que las AdvL₃ obtenidas de *D. latifrons* y el juvenil obtenido de *D. marsupialis* son iguales entre sí (0.0000) y a su vez iguales a las secuencias de *G. turgidum* con valores menores a 0.02 (0.0043 para el adulto y 0.0046 para la AdvL₃) (Tabla 5). Por otro lado, mediante el análisis del COI se determinó que las AdvL₃ obtenidas de *D. latifrons* y el juvenil obtenido de *D. marsupialis* son iguales entre sí, pero poseen diferencias con la secuencia disponible en el GenBank para *G. turgidum*, con valores mayores a 0.02 (0.0657) (Tabla 6).

Tabla 5. Matriz de distancias genéticas del fragmento ITS-2. Modelo K2P. En negrita los valores menores a 0.02. **J** = juvenil, **AdvL₃** = Larva de tercer estadio avanzado.

Especie	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
(1) <i>G. spinigerum</i> ¹										
(2) <i>G. spinigerum</i> ²	0.0085									
(3) <i>G. binucleatum</i> ³	0.1375	0.1398								
(4) <i>G. binucleatum</i> ²	0.1347	0.1370	0.0024							
(5) <i>G. lamothei</i> ¹	0.4399	0.4881	0.4014	0.3973						
(6) <i>G. lamothei</i> ⁴	0.5227	0.4843	0.3992	0.3951	0.0059					
(7) <i>G. turgidum</i> ²	0.5912	0.5912	0.5186	0.5127	0.4686	0.4686				
(8) <i>G. turgidum</i> ¹	0.4565	0.6675	0.5897	0.5837	0.4686	0.5610	0.0000			
(9) <i>Gnathostoma</i> sp. I (J)*	0.9170	0.9917	0.9936	0.9804	1.1231	1.0363	0.0043	0.0000		
(10) <i>Gnathostoma</i> sp. I (AdvL ₃)*	0.3733	0.5716	0.4663	0.4602	0.3306	0.4337	0.0046	0.0000	0.0000	

¹ Cole *et al.*, 2014 (KF648553, KF648543, KF648548).

² Ameyda *et al.*, 2000 (Z97175, Z97072, Z97176).

³ Díaz-Camacho *et al.*, 2008 (EU915244).

⁴ Bertoni-Ruiz *et al.*, 2005 (AY818004).

* Presente estudio.

Tabla 6. Matriz de distancias genéticas del gen COI para especies de *Gnathostoma* de México. Modelo K2P. **J** = juvenil, **AdvL₃** = Larva de tercer estadio avanzado.

Especie	(1)	(2)	(3)
(1) <i>G. binucleatum</i> ¹			
(2) <i>G. turgidum</i> ²	0.1611		
(3) <i>Gnathostoma</i> sp. I (J y AdvL ₃)*	0.1740	0.0657	

¹ Ando *et al.*, 2006 (AB180103).

² Sao *et al.* (en Maldonado *et al.*, 2020) (KT894798).

* Presente estudio.

5.1.1.2 Análisis filogenético

Los árboles filogenéticos sustentan los resultados anteriores; mediante el marcador molecular ITS-2 tanto las AdvL3 como el Juvenil de *Gnathostoma* son agrupadas en el mismo clado que *G. turgidum* (Figura 2); mientras que con el marcador COI, estas son agrupadas en un clado distinto pero muy cercano a *G. turgidum* (Figura 3). El árbol filogenético concatenado sustenta la topología del marcador molecular COI, agrupando a los individuos de *Gnathostoma* de la presente investigación como diferentes a *G. turgidum* (Figura 4).

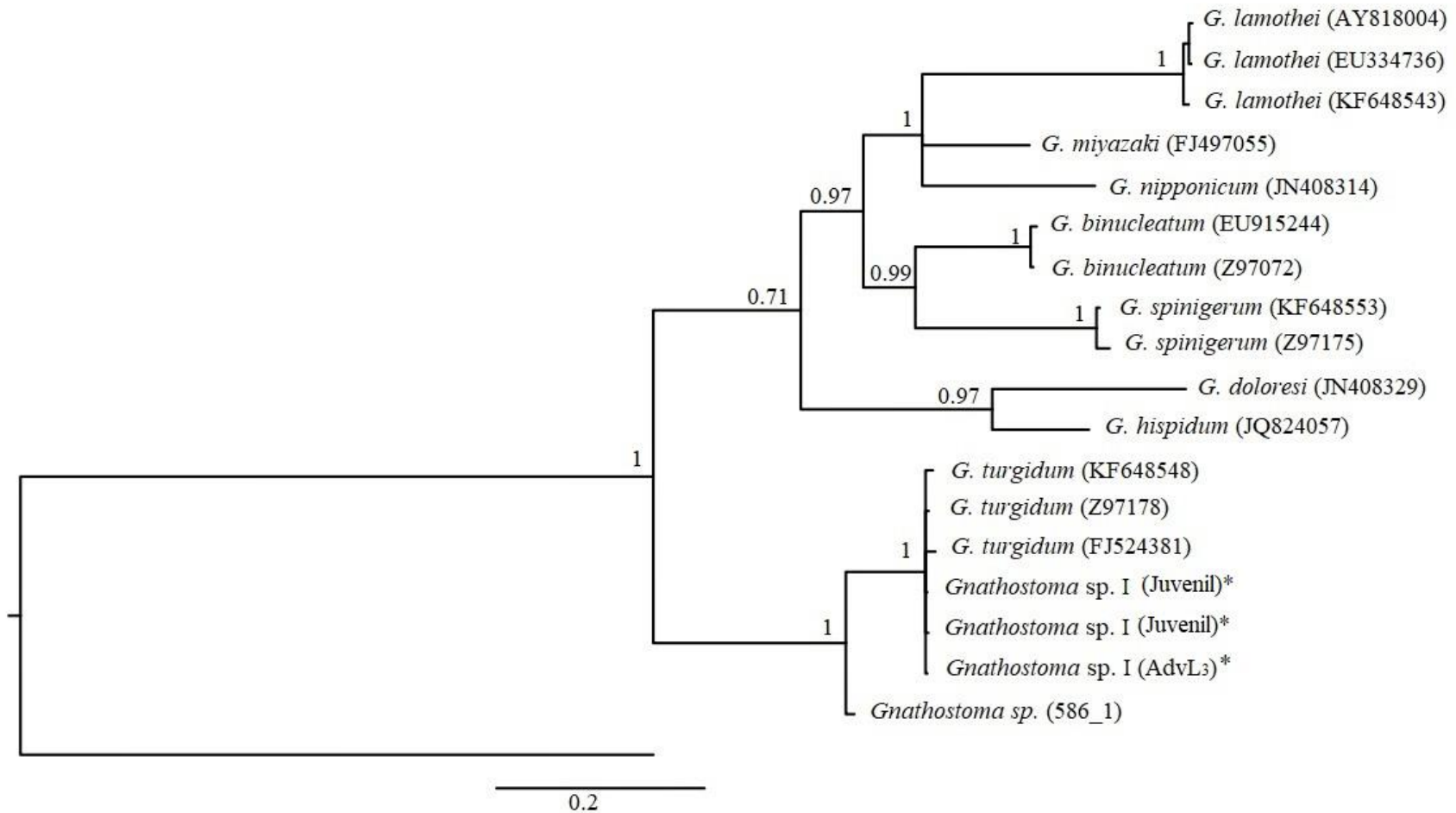


Figura 2. Relaciones filogenéticas entre diferentes especies del género *Gnathostoma* inferidas mediante el marcador molecular ITS-2. Los códigos de acceso al GenBank se encuentran entre paréntesis. * *Gnathostoma* sp I presente estudio. Los valores de probabilidad posterior bayesiana son indicados en los nodos.

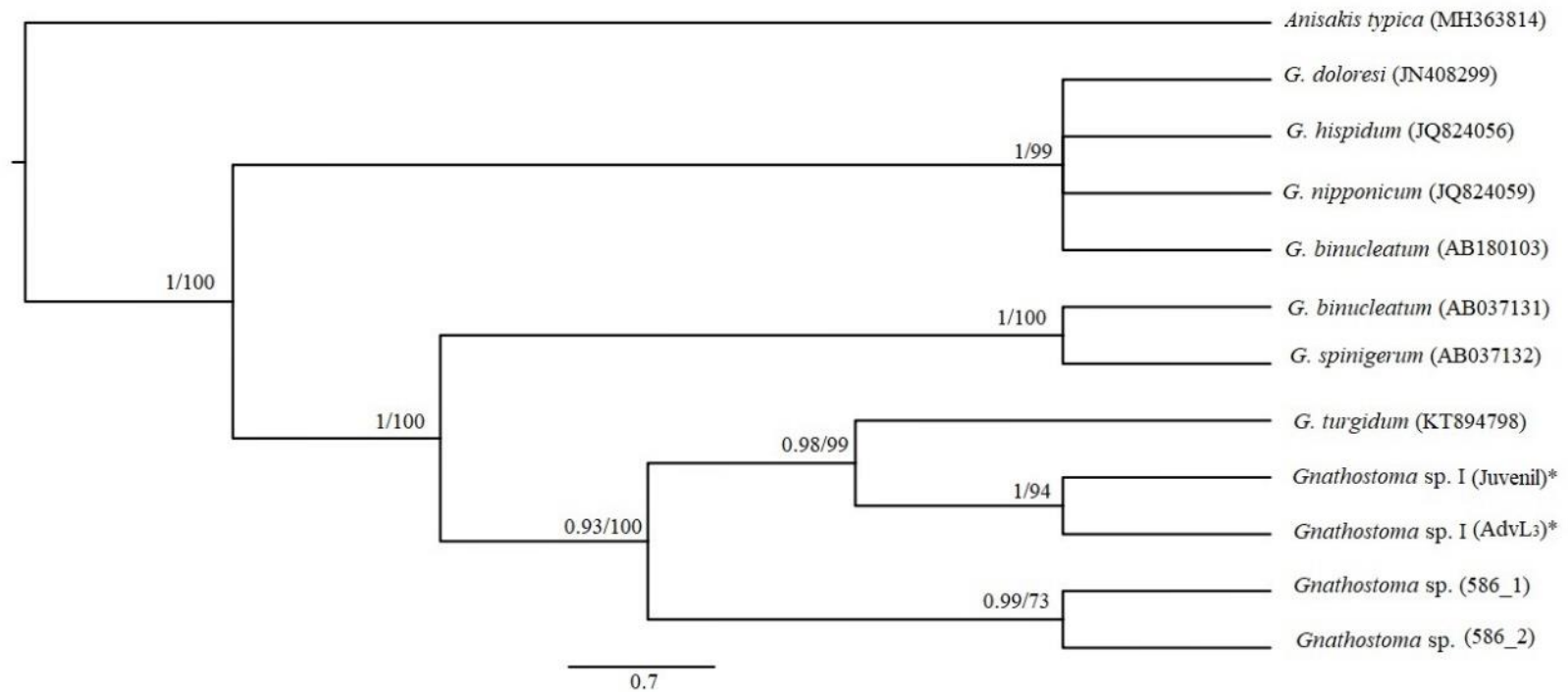


Figura 3. Relaciones filogenéticas entre diferentes especies del género *Gnathostoma* inferidas mediante el marcador molecular COI. Los códigos de acceso al GenBank se encuentran entre paréntesis. * *Gnathostoma* sp I presente estudio. Los valores de probabilidad posterior bayesiana son indicados en los nodos / valor de Bootstrap con 10,000 iteraciones.

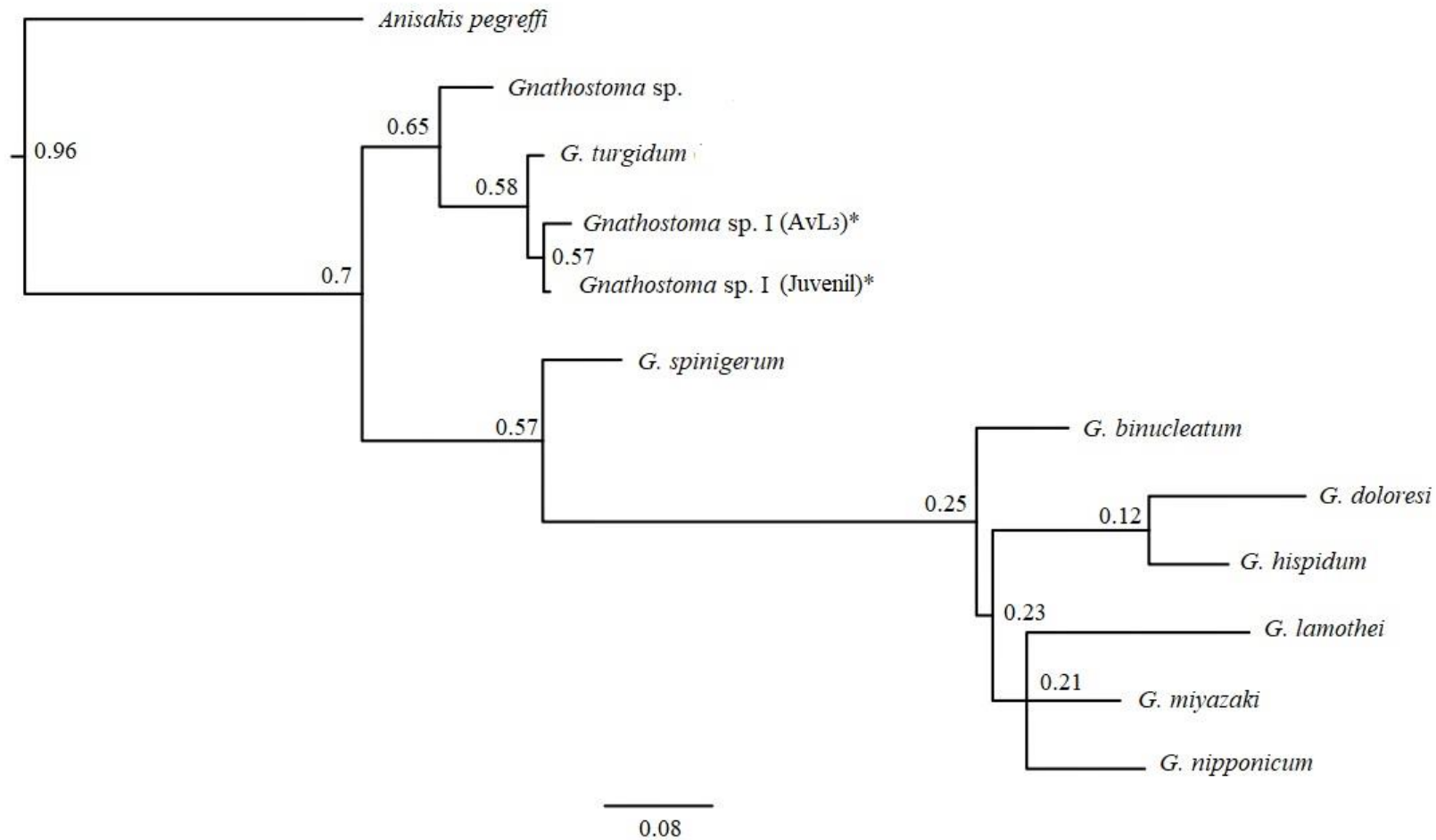


Figura 4. Relaciones filogenéticas entre diferentes especies del género *Gnathostoma* inferidas mediante ambos marcadores moleculares (ITS-2 y COI). Los valores de probabilidad posterior bayesiana son indicados en los nodos.

5.1.2 Identificación morfológica

5.1.2.1 Descripción morfológica de *Gnathostoma* spp. de la cuenca del Río Ostuta

Gnathostoma sp. I (AdvL₃)

La siguiente descripción está basada en la observación de 23 larvas. El cuerpo mide 1,149.10-1,414.39 ($1, 262.7 \pm 90.86, 11$) de largo y 94.71-129.77 ($105.82 \pm 12.59, 11$) de ancho; cubierto por 180-223 ($192.79 \pm 11.82, 13$) hileras de espinas transversales. Bulbo cefálico 30.77-85.85 ($44.69 \pm 14.57, 13$) de largo por 65.23-169.24 ($91.90 \pm 26.72, 13$) de ancho; presenta espinas dispuestas en 4 hileras transversales: 27-37 ($31.17 \pm 2.59, 23$), 28-44 ($34.39 \pm 3.78, 23$), 30-44 ($37.22 \pm 3.42, 23$) y 33-46 ($41.26 \pm 3.75, 23$) en el orden correspondiente (Figura 5, Figura 6b). Cuatro sacos cervicales abarcan el 43.23-75.29 ($58.99\% \pm 7.65, 10$) de la longitud de esófago. El esófago ocupa el 32-73.81 ($40.30\% \pm 2.60, 10$) del largo total y 51% de su ancho a la altura de la intersección esófago-intestino. El poro excretor ventral se ubica en la hilera 15-21 ($18.73 \pm 1.60, 15$) (Figura 6a). Dos papilas cervicales se encuentran en las laterales del cuerpo, la papila cervical derecha en la hilera 9-13 ($10.58 \pm 1.20, 19$) y la papila cervical izquierda en la hilera 9-16 ($11.11 \pm 1.60, 18$) (Figura 6a). Primordio genital ubicado a 65.61-69.67 ($68.39\% \pm 0.56, 4$) del extremo anterior del cuerpo. Dos papilas caudales ubicadas en las laterales del extremo posterior, la papila caudal derecha es anterior al primordio genital y la izquierda inmediatamente posterior a este.

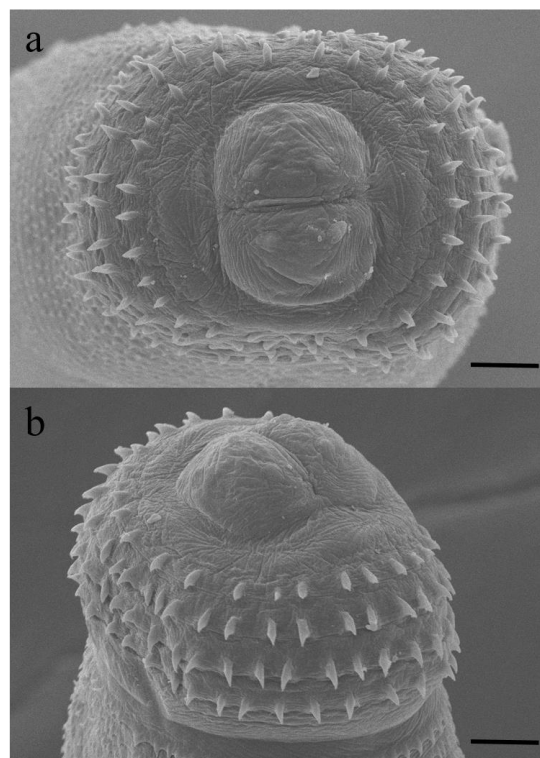


Figura 5. Bulbo cefálico de la AdvL₃ de *Gnathostoma* sp. I. **a** Vista apical; **b** vista lateral. Escala = 10 micras.

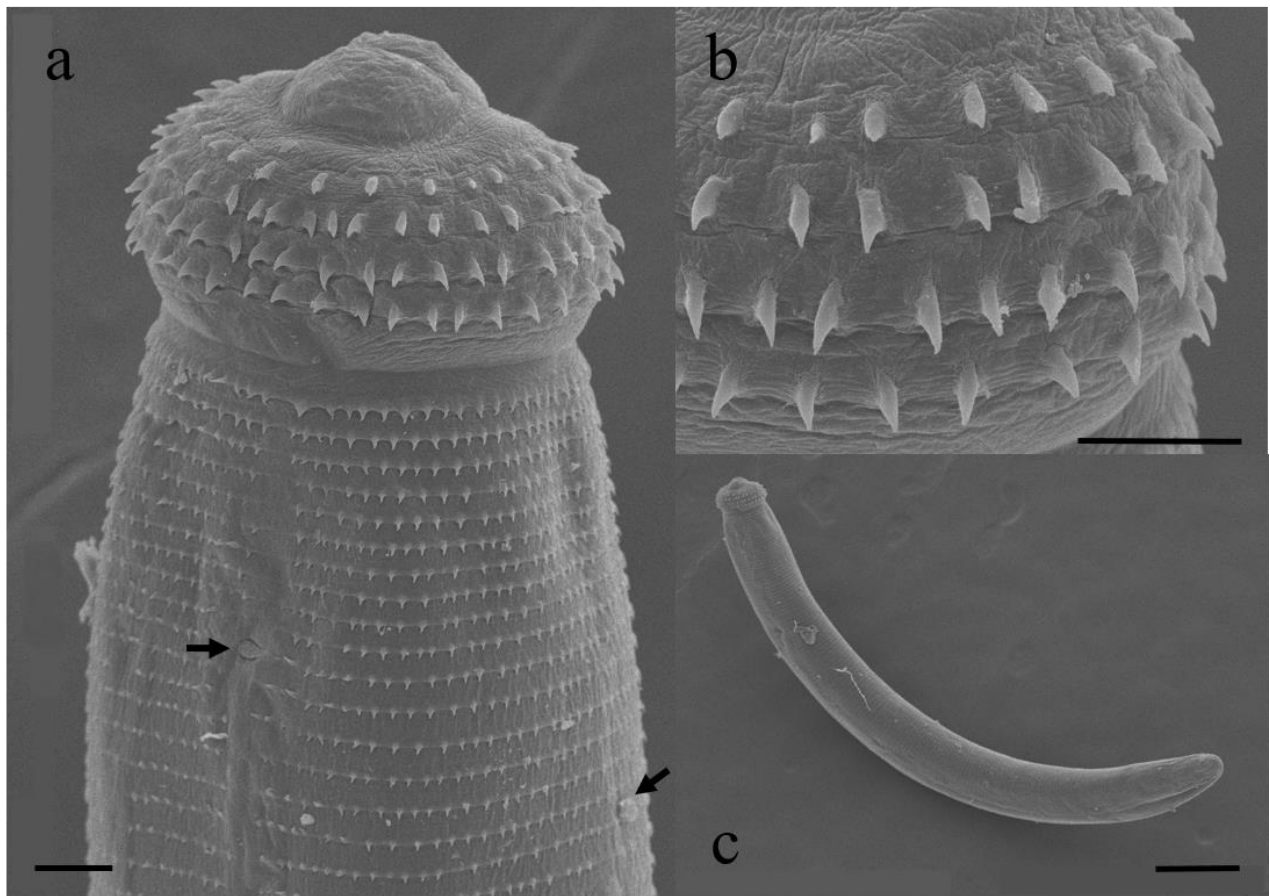


Figura 6. Larva de tercer estadio avanzado de *Gnathostoma* sp. I. **a** Papila cervical ventral y poro excretor lateral; **b** cuatro hileras de ganchos en el bulbo cefálico; **c** larva entera. Escala **a** y **b** = 10 micras, **c** = 100 micras.

Resumen taxonómico:

Localidad: Laguna Las Garzas, San Francisco Ixhuatán, Oaxaca.

Hospedero: *Dormitator latifrons* (Eleotridae).

Sitio de infección: Musculatura.

Parámetros de infección: P 30.6%, IP 4.8, AP 1.47.

Depósito de especímenes: CNH 11674.

Comentarios taxonómicos:

Las larvas de *Gnathostoma* sp. I aisladas de la musculatura de *D. latifrons* en la cuenca del Río Ostuta, Oaxaca son muy similares en la cantidad de ganchos en las cuatro hileras del bulbo cefálico con las AdvL₃ de *G. turgidum* aisladas de la musculatura de ranas *Rana zweifeli* (Mosqueda-Cabrera *et al.*, 2009). No obstante, se observan diferencias importantes entre ellas. Los especímenes de peces son más pequeños en el tamaño del cuerpo (1,149.1-1,413 vs. 1,530-2,007) sin que sus rangos se traslapen (Tabla 7). Los ganchos en las hileras del bulbo cefálico son diferentes en el tamaño y forma: los de peces son de forma redonda sin diferencias evidentes en el tamaño entre

las hileras, mientras que los de ranas son rectangulares con diferencias en el tamaño, siendo más pequeños en la cuarta hilera con respecto a las tres anteriores (Figura 7).

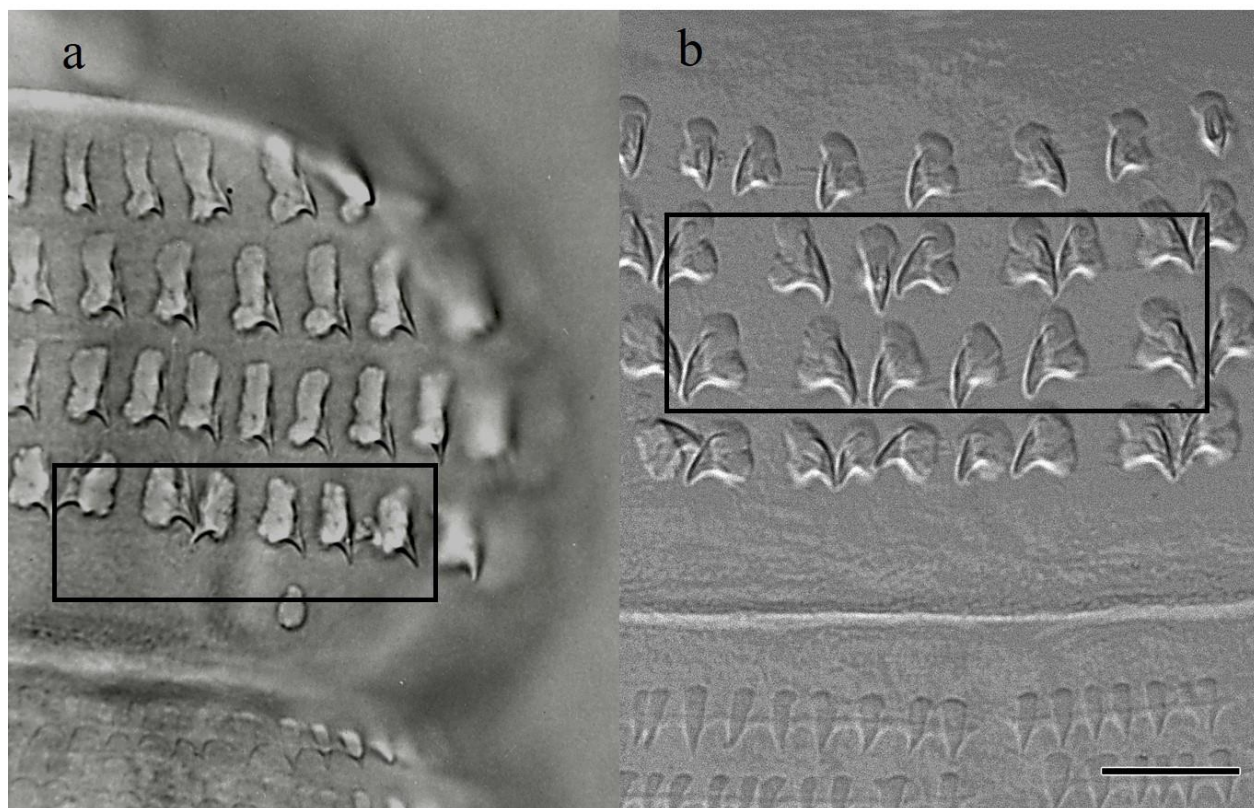


Figura 7. Comparación de tamaño de los ganchos del bulbo cefálico. **a** *G. turgidum* tomada de Mosqueda-Cabrera *et al.* (2009); **b** *Gnathostoma* sp. I presente investigación. Escala= 10 micras.

Las AdvL₃ de *Gnathostoma* sp. I del presente estudio se diferencian de *G. lamothei* (Gaspar-Navarro *et al.*, 2013) y *G. binucleatum* (Almeyda-Artigas, 1991) en el tamaño del cuerpo, ya que son más pequeñas, sin traslaparse en sus rangos (1,263 vs. 4,488 y 4,300). No obstante, la similitud en la cantidad de ganchos en las hileras del bulbo cefálico entre las especies, *Gnathostoma* sp. I difiere de las otras 2 por tener una menor cantidad de ganchos en promedio. De *G. lamothei* se distinguen además en la posición del poro excretor (hileras 20-29) al igual que de *G. binucleatum* (27-37) con un pequeño traslape con la primera especie. Adicionalmente, se diferencia de las dos especies en la proporción del ancho del esófago con relación al ancho del cuerpo a la altura de la intersección esófago-intestino (0.51 vs. 0.41 y 0.70) (Tabla 7).

Tabla 7. Comparación morfométrica de las larvas de tercer estadio avanzado aisladas de *D. latifrons* con las tres especies de *Gnathostoma* en México. **PCi** = Papila cervical izquierda, **PCd** = Papila cervical derecha, **PE** = Poro excretor, **Ea** = Ancho del esófago, **Ca** = Ancho del cuerpo, — Sin datos. Se presentan rangos y promedios entre paréntesis.

Especie Referencia	Largo / Ancho	PCi	PCd	PE	Proporción Ea vs Ca	Cantidad de ganchos en las hileras del bulbo cefálico				
						I	II	III	IV	IV-I
<i>G. lamothei</i>										
Gaspar-Navarro <i>et al.</i> , 2013	3,582.24-5,095.90 (4,487.94) / 236.60- 318.24 (288.74)	10-16 (11.53)	10-14 (11.73)	20-29 (23.07)	0.41	34-44 (39.33)	38-47 (43.27)	40-48 (44.20)	45-58 (47.33)	(7.13)
Cole <i>et al.</i> , 2014	—	—	—	—	—	36	38	36	36	0
<i>G. binucleatum</i>										
Ameyda-Artigas, 1991	2,600-5,900 (4,300.00) / —	—	—	—	—	35-44 (38.90)	38-47 (42.40)	40-49 (44.70)	43-52 (48.20)	(9.5)
García-Márquez <i>et al.</i> , 2009	3,120-3,140 (3,130.00) / —	14	—	30	—	36-29 (38.00)	40-41 (40.00)	44-46 (45.00)	44-47 (46.00)	(8.00)
<i>G. turgidum</i>										
Díaz-Camacho <i>et al.</i> , 2010	1,300-4000 (2,700.00) / —	—	—	—	—	(34.00)	(37.00)	(36.00)	(42.00)	(8.00)
Cole <i>et al.</i> , 2014	—	—	—	—	—	32-37 (35.00)	34-40 (37.40)	36-41 (38.20)	42-48 (44.20)	(9.20)
Mosqueda-Cabrera <i>et al.</i> , 2009	1,530.00-2,007.40 (1,670.20) / 134.6- 160.4 (140.80)	10-14 (11.70)	11-14 (12.00)	15-22 (19.7)	—	26-34 (30.80)	29-38 (34.00)	29-43 (36.70)	33-42 (39.60)	(8.80)
<i>Gnathostoma</i> sp. I										
Presente estudio	1,149.10-1,413.39 (1,262.7) / 94.71- 129.77 (105.82)	9-13 (10.58)	9-16 (11.11)	15-21 (18.73)	0.51	27-37 (31.17)	28-44 (34.39)	30-44 (37.22)	33-46 (41.26)	(10.04)

Gnathostoma sp I
(Juvenil)

El largo total del cuerpo no pudo ser obtenido debido a que una fracción se destinó al estudio molecular. Anchura máxima del cuerpo a la altura de la intersección esófago-intestino 1,479.60. Escamas corporales presentes en hileras transversales, únicamente en la región posterior del cuerpo, abarcando 12,991.94 de su superficie. Papilas cervicales derecha e izquierda en la décima hilera transversal. Esófago de 14,586.39 de largo por 836.10 de ancho, ocupando el 58.3% respecto al ancho del cuerpo. Un saco cervical de 2,379.69 de largo, 16.31% respecto al largo del esófago. Bulbo cefálico (393.60 por 861.00 de largo y ancho, respectivamente) con 10 hileras transversales de ganchos de una sola punta. Bursa con pequeñas espinas ventrales en sentido posteroanterior; presenta cuatro pares de papilas pedunculadas; dos pares preanales, un par adanal y dos pares post anales (Figura 8b); además, cuatro pares de papilas no pedunculadas; un par preanal, dos pares adanales y un par post anal (Figura 9b). Dos espículas presentes, una más grande que la otra, rectangulares, con el extremo anterior más ensanchado que en su extremo posterior; espícula derecha 3,267.43 de largo por 142.68 de ancho máximo; espícula izquierda 949.41 largo por 93.48 de ancho; proporción entre ambas estructuras 1:0.29 (Figura 9a); presencia de una cutícula gruesa que sobresale el extremo posterior (Figura 8a y 9a).



Figura 8. Extremo posterior del juvenil de *Gnathostoma* sp. I. **a** Excrecencia que sobresale del extremo posterior; **b** papilas. Escala= 200 micras.

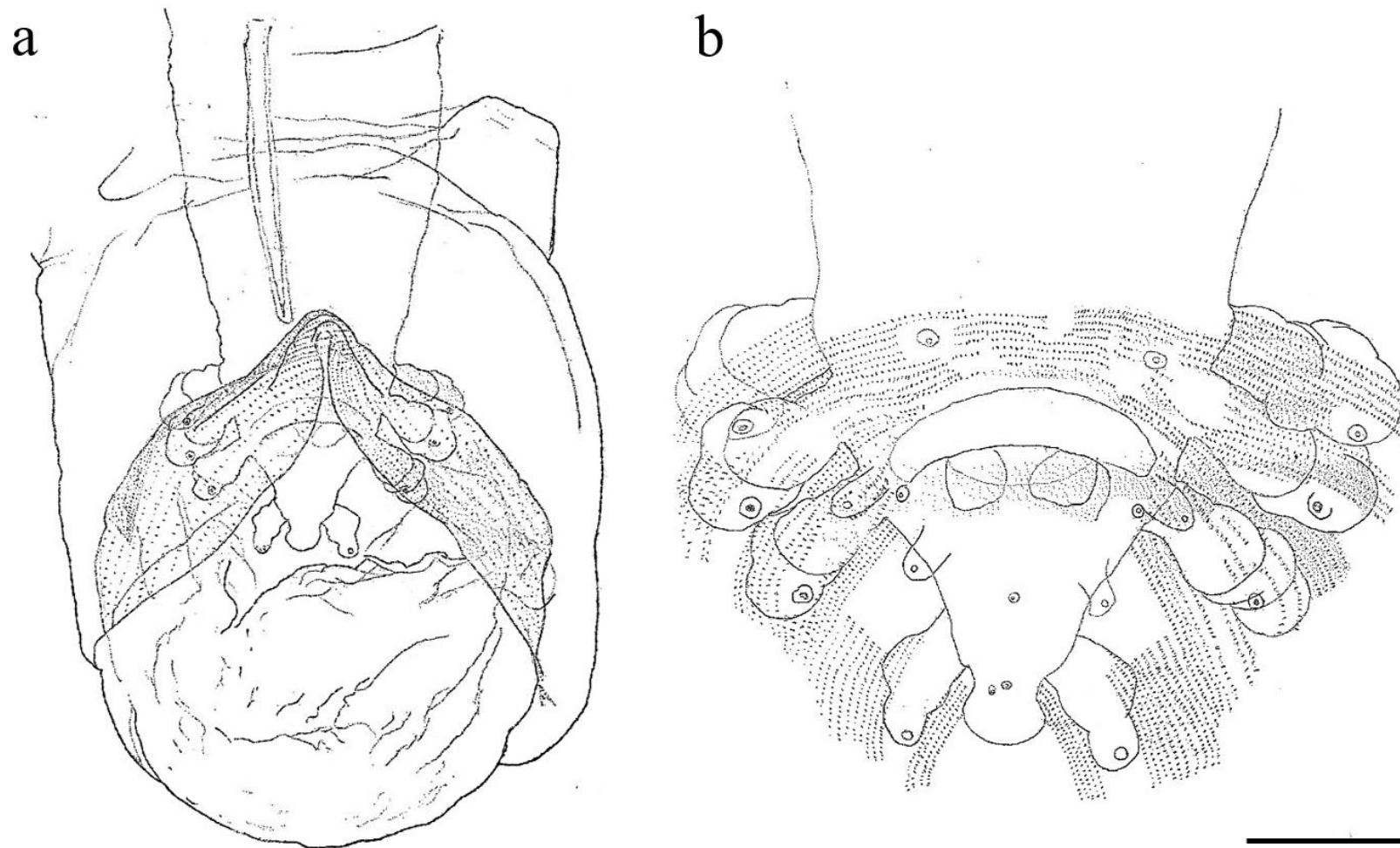


Figura 9. Juvenil de *Gnathostoma* sp. I. **a** Juvenil macho con presencia de cutícula que sobresale al extremo posterior, vista de las espículas; **b** acercamiento del extremo posterior, detalle de las papilas, patrón de espinas ventrales presente. Escala= 200 micras.

Las escamas del cuerpo con variaciones en el número de puntas según la región; **a**) inmediatamente posteriores al bulbo cefálico, de 5-9 puntas, más largas (49.06) que anchas (22.08); **b**) en la región que ocupan las papilas cervicales, de 5-9 puntas, con 61.32 de largo y 31.89 de ancho; **c**) a la altura del saco cervical, de 5-10 puntas, más largas (108.24) que anchas (76.80), en las laterales de la escama con una a tres puntas y en la parte central de 3-5 puntas; **d**) a la altura de la intersección esófago-intestino, escamas con 5-6 puntas más anchas que largas, 59.04 y 39.36, respectivamente, en las laterales de la escama generalmente con un par de puntas más cortas y de 3-4 puntas centrales; **e**) inmediatamente posteriores a la intersección esófago-intestino, las escamas cambian drásticamente de forma y tamaño, siendo más largas (59.04 μm) que anchas (34.44 μm) con un par de espinas laterales cortas y de 3-3 espinas centrales anchas; **e**) en la parte más posterior de la porción escamada del cuerpo, se observa un gradiente donde las puntas centrales de las escamas van ensanchándose y desapareciendo las laterales hasta terminar en escamas de una sola punta de 2.4 de largo (Figura 10).

Resumen taxonómico:

Localidad: Inmediaciones del Río Ostuta, San Francisco Ixhuatán, Oaxaca.

Hospedero: *Didelphis marsupialis* (Didelphidae).

Sitio de infección: Hígado.

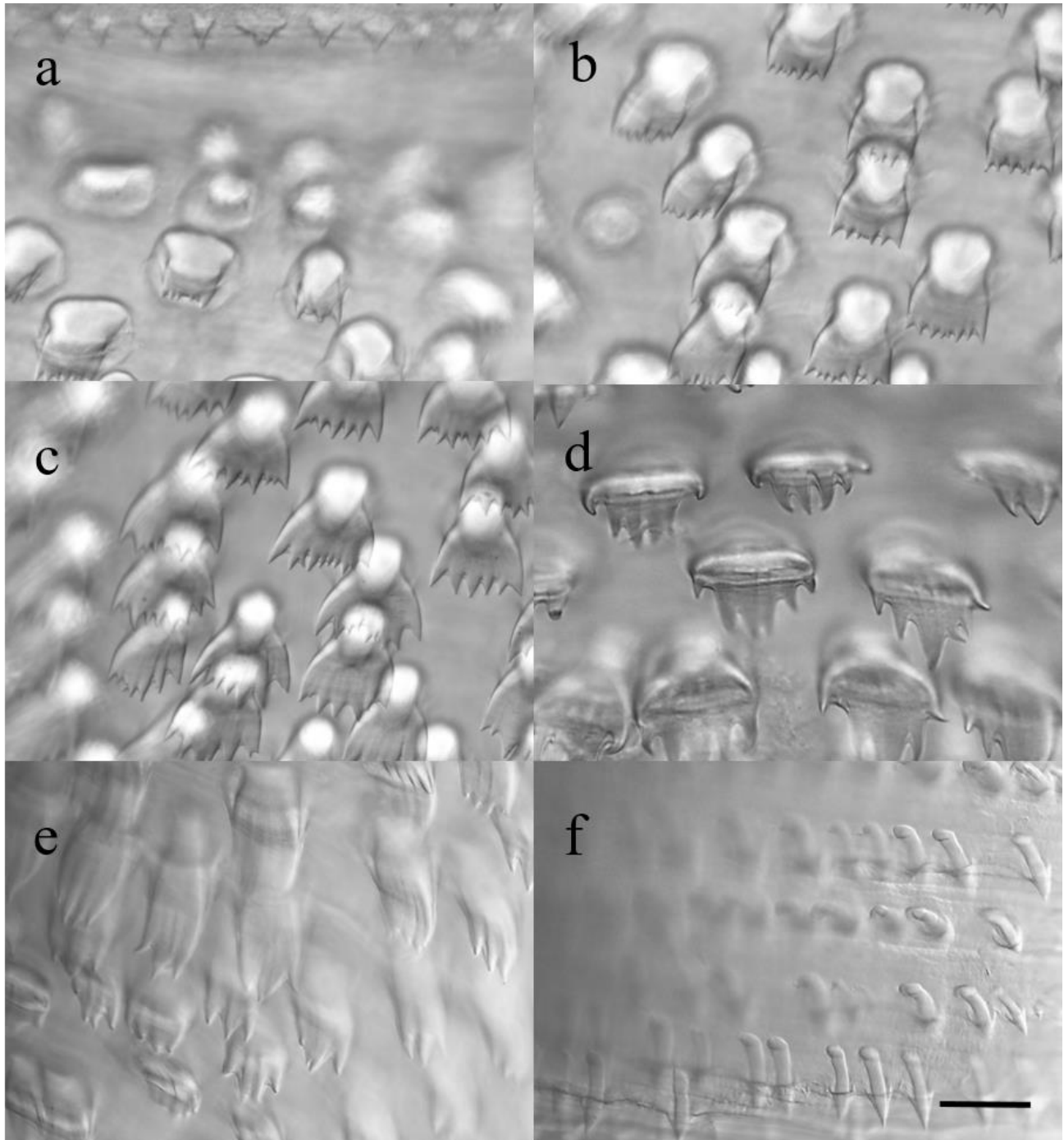


Figura 10. Juvenil de *Gnathostoma* sp. I. Espinas del cuerpo. **a** Inmediatamente posteriores al bulbo cefálico; **b** a la altura de la papila cervical; **c** a la altura del saco cervical; **d** a la altura de la intersección esófago-intestino; **e** inmediatamente posteriores a la intersección esófago-intestino; **f** en el extremo más posterior de la región escamada del cuerpo. Escala= 100 micras.

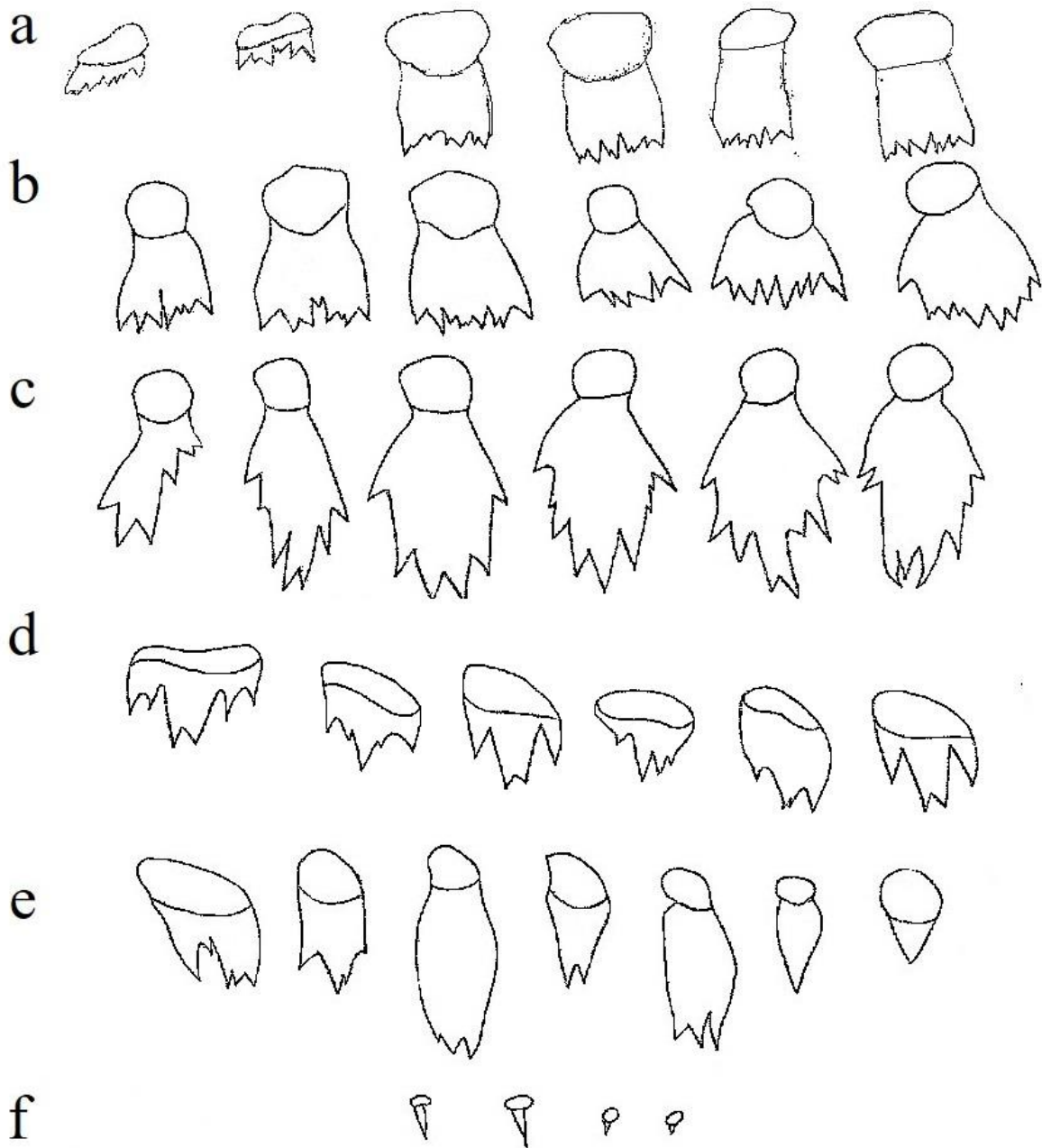


Figura 11. Detalle de las espinas del cuerpo del juvenil de *Gnathostoma* sp. I. **a** Inmediatamente posteriores al bulbo cefálico; **b** a la altura de la papila cervical; **c** a la altura del saco cervical; **d** a la altura de la intersección esófago-intestino; **e** inmediatamente posteriores a la intersección esófago-intestino; **f** en el extremo más posterior de la región escamada del cuerpo. Escala= 100 micras.

5.2 Parámetros de infección

Las larvas de tercer estadio avanzado de *Gnathostoma* sp. I presentaron una prevalencia del 30.6% (Tabla 8). La frecuencia en la distribución de 51 AdvL₃ de *Gnathostoma* sp. I en 11 peces *D. latifrons* fue: 0(25), 1(3), 2(2), 3(1), 6(2), 7(2), 15(1). La población presentó una distribución sobredispersa conforme al modelo de la distribución de la binomial negativa, $k = 0.16$, varianza = 9.79 ± 3.1 , media = 1.41, Coeficiente de dispersión = 6.94.

Tabla 8. Parámetros de infección de AdvL₃ de *Gnathostoma* aisladas de la musculatura de peces de la cuenca del Río Ostuta. **N** número de hospederos revisados, **I** individuos parasitados, **Pr** número de parásitos, **P** prevalencia, **IP** intensidad media, **AP** abundancia media. **IC** Intervalo de confianza al 95%.

Especie de hospedero (n)	I	Pr	P (IC) %	IP	AP
Especie de <i>Gnathostoma</i>					
<i>D. latifrons</i> (36)*					
<i>Gnathostoma</i> sp. I	11	51	30.6 (16.3-48.1)	4.8 (2.7-7.9)	1.47 (0.6-2.9)
<i>R. guatemalensis</i> (10)					
<i>S. marmoratus</i> (1)	0				
<i>Gobiomorus dormitor</i> (2)	0				
<i>Ictalurus furcatus</i> (4)	0				
<i>Oreochromis niloticus</i> (21)	0				
<i>O. mossambicus</i> (9)	0				

* Colectados en la laguna “Las Garzas”, San Francisco, Ixhuatán, Oaxaca.

VI. DISCUSIÓN

La enorme diversidad de especies parásitas permanece aún desconocida, entre ella la de los nematodos. La importancia del reconocimiento de especies parásitas recae, entre otras cosas, en su valor epidemiológico, ya que, para lograr generar estrategias de prevención y erradicación de enfermedades parasitarias, la delimitación correcta de las especies debe encaminarse a esto (Nadler y Pérez-Ponce de León., 2011). Solo algunas especies del género *Gnathostoma* han sido identificadas como agentes etiológicos de la gnatostomiasis humana; en México la única especie reconocida como causante del padecimiento es *G. binucleatum* (Almeyda-Artigas *et al.*, 2000); sin embargo, el potencial zoonótico de las demás especies sigue siendo vigente, por lo que se vuelve imperante su correcto estudio y delimitación.

Estudiar y delimitar especies es un trabajo arduo que requiere de la integración de diversos niveles y enfoques de estudio: taxonómico, molecular, sistemático y ecológico; aunque es prácticamente imposible observar un panorama completo, para poder acercarnos lo mayor posible a la realidad es importante integrar estos enfoques (Dayrat *et al.*, 2005).

En la presente investigación, el análisis molecular mostró que tanto el juvenil como las AdvL₃ de *Gnathostoma* de la cuenca del Río Ostuta son una única entidad taxonómica, es decir la misma especie, debido al casi nulo valor de divergencia entre ambos (Tabla 5 y 6). Hebert *et al.*, (2003) argumentan que un valor por debajo de 0.02 (2%) corresponde a organismos pertenecientes a la misma especie y por encima de este valor umbral podríamos hipotetizar distinción entre especies. Esta conjetura puede sustentarse al observar cómo se comportan los valores correspondientes a las mismas especies (en este caso *G. spinigerum*, *G. binucleatum* y *G. lamothei*), que pueden presentar ligeros valores de variación (intra-específica); sin embargo, no superan el umbral propuesto; mientras que de manera interespecífica este valor supera el umbral por lo menos por un orden de magnitud (Tabla 5).

De acuerdo con lo anterior, la especie de *Gnathostoma* aislada del hígado de *D. marsupialis* en la cuenca del Río Ostuta corresponde a la forma juvenil de las AdvL₃ aisladas de la musculatura de *D. latifrons* capturados en la laguna Las Garzas, cuerpo de agua que recibe aporte de agua (por escorrentía) de la cuenca del Río Ostuta (Figura 1); por lo que a partir de este punto se referirá a ambas formas (larvas y juvenil) como una única especie. Lo anterior permite inferir que la forma de infección del hospedero definitivo es a través de la ingesta de peces parasitados con AdvL₃ presentes en los cuerpos de agua de la cuenca del Río Ostuta. En específico, la infección se da en cuerpos de agua someros formados por el desborde de cuerpos de agua más grandes, durante la estación de lluvias, lo que permite el encuentro exitoso de los hospederos intermediarios (peces) y definitivos (tlacuaches), no así en los cuerpos de agua profundos. En este sentido, los cuerpos de agua profundos como Las Garzas actúan como reservorios de las AdvL₃ de *Gnathostoma*, hasta la siguiente temporada de lluvias, donde las condiciones permiten la infección de los tlacuaches.

Tradicionalmente la identificación de especies del género *Gnathostoma* se ha realizado mediante el estudio morfométrico de los adultos (Miyazaki, 1960). No así las formas larvarias, que han sido más problemáticas al momento de asignar características morfológicas determinantes para la identificación específica, debido a la alta similitud entre las larvas de las especies; no obstante, las

características más utilizadas son: el número de ganchos por hilera en el bulbo cefálico, la posición del poro excretor y el porcentaje que ocupa el esófago con respecto al ancho del cuerpo en la intersección esófago-intestino (Mosqueda-Cabrera et al., 2009; Gaspar-Navarro et al., 2013). Para resolver este problema, el marcador molecular ITS-2 ha funcionado como el principal delimitador taxonómico a nivel de especie para el género *Gnathostoma* (Almeyda-Artigas et al., 2000; Hernández-Gómez et al., 2010; Cole et al., 2014) y en general para los nemátodos (Powers et al., 1997). Sin embargo, el valor de otras moléculas, como el código de barras de la vida (basado en el COI), no debe subestimarse, sobre todo al analizar especies con un alto grado de parentesco. El análisis de distancias genéticas entre la especie de *Gnathostoma* presente en la cuenca del Río Ostuta y las especies de *Gnathostoma* presentes en México (*G. binucleatum*, *G. lamothei* y *G. turgidum*) arroja resultados distintos dependiendo el marcador utilizado.

La información obtenida con el marcador molecular ITS-2 identifica a la especie de *Gnathostoma* estudiada como *G. turgidum*. De acuerdo a Hebert et al., (2003) las distancias menores a 0.02 indican individuos taxonómicamente iguales (Tabla 5), donde tanto las larvas como el adulto fueron ubicados en el mismo clado que *G. turgidum* (Figura 2). Contrariamente, el marcador molecular COI refleja que las larvas y el juvenil de *Gnathostoma* son diferentes a *G. turgidum*, con un valor de distancia mayor a 0.02 (Tabla 6), agrupando a las larvas y el adulto en un clado distinto a *G. turgidum* (Figura 3); por lo tanto, constituirían especies taxonómicamente distintas de acuerdo con Hebert et al. (2003).

No obstante que los espaciadores internos transcritos, en especial el ITS-2, han sido ampliamente utilizados durante la identificación de nemátodos debido a que son los *loci* nucleares con mayor variación (Powers et al., 1997), se ha demostrado que el COI tiene una tasa sustitución de nucleótidos muy alta, que al ser un gen codificante de proteínas desencadena en la transcripción de aminoácidos específica (Denver et al. 2000), por lo que resulta determinante en la identificación. Blouin (2002) demostró que el gen COI tiene una mayor tasa de evolución que el ITS-2, por lo que es probable que acumule mayores cambios en un tiempo evolutivo menor. Por lo tanto, el uso de este marcador es determinante para de identificar especies muy cercanas entre ellas, con poco tiempo evolutivo de divergencia (Hebert et al., 2003), también denominadas especies crípticas.

Se consideran especies crípticas a dos o más especies morfológicamente idénticas, las cuales solo a través de la identificación molecular pueden ser discriminadas como taxones diferentes (Bickford et al., 2007). Existe una clarificación importante entre *especies hermanas* y *especies crípticas*, las primeras tienen la característica de ser evolutivamente muy cercanas entre sí; dos especies pueden ser crípticas y hermanas a la vez, si su similitud está dada por la cercanía filogenética y poco tiempo evolutivo de divergencia (Knowlton, 1996). Se ha demostrado que muchos grupos taxonómicos, entre los que destacan los grupos parásitos, presentan un gran número de especies crípticas (Nadler y Pérez-Ponce de León, 2011).

Determinar que dos especies o más son crípticas es un camino que requiere de diferentes análisis (Nadler y Pérez-Ponce de León, 2011). En primer lugar, es necesaria una evidencia de valor taxonómico que permita discriminar distintas a las especies en cuestión.

Las AdvL₃ de *Gnathostoma* halladas en la musculatura de *D. latifrons* muestran una alta similitud en la cantidad de ganchos en las hileras del bulbo cefálico con las AdvL₃ de *G. turgidum* aisladas de la musculatura de *R. zweifelli*, (31.17), (34.39), (37.22), (41.26) vs. (30.80), (34.00), (36.70), (39.60), de la primera a la cuarta hilera, respectivamente (Tabla 7). Sin embargo, son diferentes en el tamaño total del cuerpo, ya que presentan un menor tamaño promedio sin traslape en sus rangos: 1,149.1-1,413 vs. 1,530-2,007 (Tabla 7), así como en la forma y tamaño de los ganchos del bulbo cefálico; en las larvas estudiadas en la presente investigación los ganchos de la primera y la cuarta hilera son iguales entre sí y menores a los de la segunda y tercera hilera, del mismo tamaño, mientras que en las de *G. turgidum* una característica clara es que los ganchos de la cuarta hilera son más pequeños con respecto a las tres hileras anteriores (Figura 7).

Las formas adultas, en este caso el juvenil, se mantienen morfológicamente idénticos a *G. turgidum* exceptuando por la cutícula presente en la forma juvenil (Figura 8 y 9), que no ha sido descrita en juveniles de *G. turgidum* provenientes del hígado de *D. virginiana* (Díaz-Camacho *et al.*, 2010). Sin embargo, esta pudiera ser una característica asociada al crecimiento; ya que el individuo fue aislado del hígado, este se encontraba aún en desarrollo y no en plena madurez o migrando al estómago para reproducirse, como es característica de los adultos reproductores de *Gnathostoma* (Anderson, 2000). Otro rasgo es el patrón de escamación en el extremo anterior del cuerpo, específicamente en la región de la intersección esófago-intestino (Figura 10d y 11d), que se diferencia de *G. turgidum* (Bertoni-Ruiz *et al.*, 2011) por presentar en promedio espinas más anchas (59.04 vs 57) que largas (39.36 vs 88) con un menor número de puntas (5-6 vs 5-8); así como una menor proporción entre las dimensiones de las espículas (1:0.29 vs 1:0.45); pero nuevamente, son características que pudieran estar asociadas a su estadio de desarrollo. Por lo tanto, es necesaria la descripción de machos adultos que provengan del estómago de *D. marsupialis* para asegurar las diferencias entre los adultos.

Las características distinguibles de las AdvL₃, permitieron diferenciar morfológicamente a la población de *Gnathostoma* de la presente investigación, de las AdvL₃ de *G. turgidum*, pero no son suficientes para discriminarlas como una especie distinta y otras evidencias fueron necesarias. Los resultados obtenidos a través del análisis de distancias genéticas del COI (Tabla 6) nos dan evidencia contundente de diferenciación entre *G. turgidum* y la especie de *Gnathostoma* de la presente investigación.

Un análisis filogenético (Figura 3) sustenta la hipótesis de diferenciación taxonómica entre *G. turgidum* y la especie en estudio. Aunque pareciera que mediante el marcador ITS-2 esta hipótesis podría ser desechada (Figura 2), ya que la agrupa en el mismo clado que *G. turgidum*, la hipótesis de diferenciación entre las dos especies resulta sustentada filogenéticamente en el árbol concatenado (Figura 4), donde a pesar que la información de los dos marcadores moleculares está representada, el COI es el que determina la topología final. Además, el análisis filogenético nos permite determinar que la especie de *Gnathostoma* de la cuenca del Río Ostuta, es una especie, además de críptica hermana de *G. turgidum*, debido a su ancestría común.

En este sentido, el COI es el marcador molecular que mayor información nos proporciona al determinar la identidad taxonómica de la especie de *Gnathostoma* de la presente investigación.

Sosteniendo que las larvas y el juvenil de *Gnathostoma* distribuidas en la cuenca del Río Ostuta son taxonómicamente distintos a *G. turgidum* y a su vez diferentes a las demás especies reportadas para México y el mundo.

Adicionalmente, evidencia ecológica asociada a las especies de hospederos definitivos puede inferirse. Las especies parásitas están en contacto con un número limitado de hospederos posibles; la especificidad hospedatoria es una estrategia evolutiva que permite que el encuentro y la reproducción de las especies parásitas sea más probable; dicha especificidad a su vez se encuentra determinada por aspectos de la transmisión de la especie parásita, características del hábitat y las relaciones ecológicas y evolutivas del hospedero (Adamson y Caira, 1994). La especificidad hospedatoria no está determinada únicamente por la cantidad de hospederos que una especie parásita pueda infectar exitosamente, debido a que no todas las especies de hospederos son iguales; una especie parásita que infecta a diferentes especies de hospederos pertenecientes al mismo género presenta una mayor especificidad hospedatoria que aquella especie que infecta a hospederos con poca similitud filogenética (Poulin y Mouillot, 2003). Es común encontrar similitudes entre diferentes especies de parásitos presentes en hospederos emparentados debido a que estos presentan similitudes morfológicas, fisiológicas, inmunológicas, ecológicas y de distribución (Poulin *et al.*, 2006). Las diferentes especies de *Gnathostoma* muestran un alto grado de especificidad a nivel del hospedero definitivo; en América se han encontrado infectando a félidos: *G. binucleatum* (*Leopardus pardalis*) y *G. americanum* (*Leopardus tigrinus*), a mustélidos: *G. miyazakii* (*Lutra canadensis*) y *G. socialis* (*Mustela vison*), a prociónidos: *G. procyonis* (*Procyon lotor lotor*) y *G. lamothei* (*Procyon lotor hernandezii*) y una especie a didélfidos: *G. turgidum* (*Didelphis virginiana*) (Bertoni-Ruiz *et al.*, 2011).

Entre dichas especies, existe un complejo infectando diferentes especies de hospederos muy emparentados filogenéticamente. La especie de mapache *Procyon lotor*, cuenta con 25 subespecies, donde se incluyen *Procyon lotor hernandezii* Wagler, 1831 y *Procyon lotor lotor* Linnaeus, 1758 (Lotze y Anderson, 1979); estas subespecies son hospederas de *G. lamothei* Bertoni-Ruiz *et al.*, 2005 y *G. procyonis* Chandler, 1942, respectivamente. Las formas adultas de ambas especies parásitas son muy parecidas entre sí, con diferencias únicamente en el tamaño de las espículas, el número de puntas de las escamas transversales del cuerpo en la región posterior al bulbo cefálico y a la altura de la papila, así como la ausencia de escamas en la mitad posterior de cuerpo (presencia de *bosses*) en *G. lamothei* (Bertoni-Ruiz *et al.*, 2005). Por otra parte, el género *Didelphis* Linnaeus, 1758 comprende seis especies de marsupiales que se distribuyen en toda América (Gardner, 1973); dentro de estas, *D. marsupialis* Linnaeus, 1758 es una especie de distribución Neotropical y *D. virginiana* (Kerr, 1792) de distribución Neártica en el continente (Dias y Perini, 2018); ambas presentes en México y reportadas como hospederos definitivos de *G. turgidum* (Pérez-Álvarez *et al.*, 2005). La evidencia de que existe un complejo de diferentes especies de *Gnathostoma* en dos subespecies de prociónidos sustenta la idea de que cada especie de marsupial fuera hospedera definitiva de especies diferentes de *Gnathostoma*; en este caso *D. virginiana* para *G. turgidum* y *D. marsupialis* para *Gnathostoma* sp. I; ambas especies parásitas muy parecidas entre sí, debido a la similitud filogenética entre sus hospederos definitivos.

El trabajo taxonómico, es decir la delimitación y clasificación de especies, es importante en el conocimiento de la diversidad de la vida y la reconstrucción de las relaciones naturales entre los organismos. La identificación es la primera herramienta para conseguir estos objetivos; sin embargo, en muchos casos se vuelve confusa y difícil de alcanzar (Dayrat, 2005). Actualmente se considera que el trabajo taxonómico tradicional no es suficiente y debido a la creciente necesidad de una identificación precisa es que se han generado nuevas técnicas moleculares, como el uso de marcadores específicos o el código de barras de la vida (Hebert *et al.*, 2003), que pretenden aumentar la precisión en los métodos. Cuando se habla de delimitar y clasificar especies, una sola línea de evidencia quizá no sea suficiente, pero entre varias, que deben ser aditivas entre sí, precisan y mejoran el trabajo taxonómico (Jörger y Schrödl, 2013). La presente investigación recopila diferentes líneas de evidencia (morfométrica, molecular, filogenética y ecológica) para delimitar y clasificar a una especie de *Gnathostoma* presente en la cuenca del Río Ostuta distinta a las anteriormente reportadas para México; y hace énfasis en la importancia de optar por una taxonomía integrativa a la hora de estudiar y delimitar especies de nematodos parásitos, en especial aquellos con importancia en la salud humana, como lo son las distintas especies del género *Gnathostoma*.

Finalmente, es necesario reconocer el uso del marcador molecular ITS-2, debido a su éxito como identificador taxonómico de especies del género *Gnathostoma*; sin embargo, es necesario complementar la información molecular disponible en GenBank referente al COI para las distintas especies de *Gnathostoma*; sobre todo para precisar el análisis y delimitación de especies muy emparentadas entre sí.

VII. CONCLUSIONES

- Los marcadores moleculares ITS-2 y COI permitieron reconocer como una única entidad taxonómica a las AdvL₃ aisladas de la musculatura de *D. latifrons* y al juvenil aislado del hígado de *D. marsupialis*, ambos hospederos naturales, lo que permitió hipotetizar formas de infección.
- El segundo espaciador interno transcrito (ITS-2), permitió el análisis de similitud entre la especie de *Gnathostoma* de la presente investigación y los datos moleculares contenidos en GenBank para el género, debido al gran número de secuencias disponibles de este marcador. Sin embargo, pese a que su uso es bien conocido en la identificación de las distintas especies de *Gnathostoma* y otros nematodos, no resulta determinante a la hora de la identificación entre especies muy emparentadas filogenéticamente.
- Diferentes fuentes de evidencia taxonómica (molecular, morfológica, filogenética y ecológica), permitieron identificar a la población de gnatostomidos de la cuenca del Río Ostuta como un clado taxonómicamente distinto a *G. turgidum*, aunque muy cercanos genéticamente y diferentes a las demás especies de *Gnathostoma* presentes en México y el mundo.
- El análisis morfológico de las AdvL₃ permitió observar y cuantificar las diferencias entre *Gnathostoma* sp. I y *G. turgidum*, especies muy emparentadas y casi idénticas, con diferencias sutiles pero importantes que las distinguen entre sí: el tamaño menor del cuerpo y la forma y tamaño de los ganchos de la cuarta hilera del bulbo cefálico.
- La subunidad I del citocromo c oxidasa (COI) del ADNm es un marcador de alto valor taxonómico que permite la identificación entre especies crípticas y hermanas entre sí como lo son *Gnathostoma* sp. I y *G. turgidum*. Por lo que se recalca la importancia del uso de este marcador en la identificación de nematodos parásitos con potencial zoonótico, como lo son las especies del género *Gnathostoma*.

VIII. LITERATURA CITADA

- Adamson, M.L. y Caira, J.N. 1994. Evolutionary factors influencing the nature of parasite specificity. *Parasitology*, **109**(1): 85-95.
- Akahane, H., Lamothe-Argumedo, R., Martínez-Cruz, J.M., Osorio-Sarabia, D. y García-Prieto, L. 1994. A morphological observation of the advanced third-stage larvae of mexican *Gnathostoma*. *Japanese Journal of Parasitology*, **43**(1): 18-22.
- Anderson, R.C. 2000. *Nematodes of Vertebrates. Their Development and Transssmition*. Centre for Agricultural Bioscience International. 650 pp.
- Anderson, R.C., Chabaud, R.G. y Willmott, S. 1974. *CIH Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates*. Commonwealth Agricultural Bureaux, England, 86 pp.
- Ando, K., Tsunemori, M., Akahane, H., Tesana, S., Hasegawa, H. y Chinzei, Y. 2006. Comparative study on DNA sequences of ribosomal DNA and cytochrome c oxidase subunit 1 of mitochondrial DNA among five species of gnathostomes. *Journal of helminthology*, **80**(1): 7-13.
- Almeyda-Artigas, R.J. 1991. Hallazgo de *Gnathostoma binucleatum* n. sp. (Nematoda: Spirurida) en felinos silvestres y el papel de peces dulceacuícolas y oligohalinos como vectores de la gnatostomiasis humana en la cuenca baja del Río Papaloapan, Oaxaca-Veracruz, México. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología*, **18**: 137-155
- Almeyda-Artigas, R.J., Dolores-Bargues, M. y Mas-Coma, S. 2000. ITS-2 rDNA Sequencing of *Gnathostoma* species (Nematoda) and elucidation of the species causing human gnathostomiasis in the americas. *Journal of Parasitology*, **86**(3): 537-544.
- Álvarez-Guerrero, C., Muñoz-Guzmán, M.A. y Alba-Hurtado, F. 2012. Aspectos clínicos y de diagnóstico de la gnatostomosis experimental canina. *Vet. Méx.*, **43**(1): 17-28.
- Bertoni-Ruiz, F., García-Prieto, L., Osorio-Sarabia, D. y León-Règagnon, V. 2005. A new species of *Gnathostoma* (Nematoda: Gnathostomatidae) in *Procyon lotor hernandezii* from Mexico. *Journal of Parasitology*, **91**(5): 1143–1149.
- Bertoni-Ruiz, F., Lamothe-Argumedo, M.R., García-Prieto, L., Osorio-Sarabia, D. y León-Règagnon, V. 2011. Systematics of the genus *Gnathostoma* (Nematoda: Gnathostomatidae) in the Americas. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, **84**: 453-464.
- Besansky, N.J., Severson, D.W. y Ferdig, M.T. 2003. DNA barcoding of parasites and invertebrate disease vectors: what you don't know can hurt you. *Trends in parasitology*, **19**(12): 545-546.
- Bickford, D., Lohman, D.J., Sodhi, N.S., Ng, P.K., Meier, R., Winker, K., Ingram, K.K. Das, I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in ecology & evolution*, **22**(3): 148-155.
- Bliss, C.I. y Fisher, R.A. 1953. Fitting the Negative Binomial Distribution to Biological Data. *International Biometric Society*, **9**(2): 176-200.
- Blouin, M.S. 2002. Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer. *International journal for parasitology*, **32**(5): 527-531.

- Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M. y Shostak, A.W. 1997. Parasitology Meets Ecology on Its Own Terms: Margolis *et al.* Revisited. *The Journal of Parasitology*, **8**(4): 575-583.
- Cole, R.A., Choudhury, A., Nico, L.G. y Griffin, K.M. 2014. *Gnathostoma* spp. in live asian swamp eels (*Monopterus* spp.) from food markets and wild populations, United States. *Emerging Infectious Diseases*, **20**(4): 634-642.
- Dayrat, B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological journal of the Linnean society*, **85**(3): 407-417.
- Denver, D.R., Morris, K., Lynch, M., Vassilieva, L.L. y Thomas, W.K. 2000. High direct estimate of the mutation rate in the mitochondrial genome of *Caenorhabditis elegans*. *Science*, **289**(5488): 2342-2344.
- Dias, C.A. y Perini, F.A. 2018. Biogeography and early emergence of the genus *Didelphis* (Didelphimorphia, Mammalia). *Zoologica Scripta*, **47**(6): 645-654.
- Díaz, J.H. 2015. Gnathostomiasis: An Emerging Infection of Raw Fish Consumers in *Gnathostoma* Nematode-Endemic and Nonendemic Countries. *Journal of Travel Medicine*, **22**(5): 318-324
- Díaz-Camacho, S.P., Delgado-Vargas, F., Willms, K., de la Cruz, M.D.C., Rendón-Maldonado, J.G., Robert, L., Antuna, S. y Nawa, Y. 2010. Intrahepatic growth and maturation of *Gnathostoma turgidum* in the natural definitive opossum host, *Didelphis virginiana*. *Parasitology international*, **59**(3): 338-343.
- Díaz-Camacho, S.P., Parra-Unda, J.R., Ríos-Sicairos, J. y Delgado-Vargas, F. 2019. Molecular identification of the etiologic agent of human gnathostomosis in an endemic area of Mexico. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. DOI: 10.7883/yoken.JJID.2019.180
- Díaz-Camacho, S.P., Willms, K., Zazueta-Ramos, M., de la Cruz-Otero, M.C., Nawa, Y. y Akahane, H. 2002. Morphology of *Gnathostoma* spp. isolated from natural hosts in Sinaloa, Mexico. *Parasitology Research*, **88**: 639-665.
- DOF. 2015. NORMA Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014, Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres. *Diario Oficial de la Federación*.
- Eamsobhana, P., Wanachiwanawin, D., Roongruangchai, K., Pornpanich, K. y Yong, H.S. 2017. Short Communication Molecular identification of *Gnathostoma spinigerum* (Nematoda: Gnathostomatidae) as causative agent of human gnathostomiasis in Thailand. *Tropical Biomedicine*, **34**(2): 478-482.
- Ferri, E., Barbuto, M., Bain, O., Galimberti, A., Uni, S., Guerrero, R., Ferté, H., Bandi, C., Martin, C. y Casiraghi, M. 2009. Integrated taxonomy: traditional approach and DNA barcoding for the identification of filarioid worms and related parasites (Nematoda). *Frontiers in zoology*, **6**(1): 1-12.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **3**: 294-299.
- García-Márquez, L.J., Lamothe-Argumedo, L., Osorio-Sarabia, D., García-Prieto, L. y León-Règagnon, V. 2009. Morphological and molecular identification of *Gnathostoma binucleatum* (Nematoda: Gnathostomatidae) advanced third stage larvae (AdvL3) in the state of Colima, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, **80**: 867-870.

- Gardner, A.L. 1970. The Systematics of the Genus *Didelphis* (Marsupialia: Didelphidae) in North and Middle America. *LSU Historical Dissertations and Theses*. 1849.
- Gaspar-Navarro, J., Almeyda-Artigas, R.J., Sánchez-Miranda, E., Carranza-Calderón, L. y Mosqueda-Cabrera, M.A. 2013. Description of advanced third-stage larvae of *Gnathostoma lamothei* Bertoni-Ruiz *et al.* 2005 (Nematoda: Gnathostomatidae) from experimental hosts and contributions to its life cycle. *Parasitology Research*, **112**: 169-175.
- Hebert, P.D., Cywinska, A., Ball, S.L. y DeWaard, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **270**(1512): 313-321.
- Herman, J.S. y Chiodini, P.L. 2009. Gnathostomiasis, Another Emerging Imported Disease. *Clinical Microbiology Reviews*, **22**(3): 484-492.
- Hernández-Gómez, R.E., Martínez-Salazar, E.A., López-Jiménez, S. y León-Règagnon, V. 2010. Molecular identification of the advanced third-stage larvae (AdvL₃) of *Gnathostoma lamothei* in Tabasco, Mexico. *Parasitology International*, **59**: 97-99.
- Hoste, H., Gasser, R.B., Chilton, N.B., Mallet, S. y Beveridge, I. 1993. Lack of intraspecific variation in the second internal transcribed spacer (ITS-2) of *Trichostrongylus colubriformis* ribosomal DNA. *International Journal for Parasitology*, **23**(8): 1069-1071.
- Jörger, K.M. y Schrödl, M. 2013. How to describe a cryptic species? Practical challenges of molecular taxonomy. *Frontiers in zoology*, **10**(1): 1-27.
- Kifune, T., Lamothe-Argumedo, R., García-Prieto, L., Ocegüera-Figueroa, A. y León-Règagnon, V. 2004. *Gnathostoma binucleatum* (Spirurida: Gnathostomatidae) en peces dulceacuícolas de Tabasco, México. *Revista de Biología Tropical*, **52**(2): 371-376.
- Knowlton, N. (1986). Cryptic and sibling species among the decapod Crustacea. *Journal of crustacean biology*, **6**(3): 356-363.
- Lamothe-Argumedo, R. 2003. La gnatostomiasis en México: un problema de salud pública. *Anales del Instituto de Biología, Serie Zoología*, **74**(1): 99-103.
- Lamothe, A. y Caballero, E. 2002. La Gnatostomiasis en México. *Biodiversitas*, **45**: 13-15.
- Maddison, W.P. y Maddison, D.R. 2019. Mesquite: A modular system for evolutionary analysis, version 3.6. 2018.
- Maldonado, A., Simões, R.O., São Luiz, J., Costa-Neto, S.F. y Vilela, R.V. 2020. A new species of *Physaloptera* (Nematoda: Spirurida) from *Proechimys gardneri* (Rodentia: Echimyidae) from the Amazon rainforest and molecular phylogenetic analyses of the genus. *Journal of helminthology*, **94**(e68).
- Martínez-Salazar, E.A. y León-Règagnon, V. 2005. Confirmation of *Gnathostoma binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991, advanced third-stage larvae in Tres Palos Lagoon, Mexico, by morphological and molecular data. *Journal of Parasitology*, **91**(4): 962-965.
- Miller, R.R., Minckley, W.L., Soto, S., y Jacobotr, J. (2009). *Peces dulceacuícolas de México* (No. EE/597.092972 M5).

- Mosqueda-Cabrera, M.A. 2003. Caracterización y diferenciación sistemática de especies mexicanas del género *Gnathostoma* (Nematoda: Spirurida: Gnathostomatoidea) parásitas de mamíferos carnívoros de la parte baja de la cuenca del Río Papaloapan, Oaxaca-Veracruz. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, UNAM, 91 pp.
- Mosqueda-Cabrera, M.A., Sánchez-Miranda, E., Carranza-Calderón, L. y Ortiz-Nájera, H.E. 2009. Finding advanced third-stage larvae of *Gnathostoma turgidum* Stossich, 1902 in Mexico from natural and experimental host and contributions to the life cycle description. *Parasitology Research*, **104**: 1219-1225.
- Miyazaki, I. 1960. On the Genus *Gnathostoma* and Human Gnathostomiasis, with Special Reference to Japan. *Experimental Parasitology*, **9**: 338-370.
- Nadler, S.A. y Pérez-Ponce de León, G.P.P. 2011. Integrating molecular and morphological approaches for characterizing parasite cryptic species: implications for parasitology. *Parasitology*, **138**(13): 1688-1709.
- Ngarmamonpirat, C., Waikagul, J., Petmitr, S., Dekumyoy, P., Rojekittikhun, W. y Anantapruiti, M.T. 2005. Analysis of sequence variation in *Gnathostoma spinigerum* mitochondrial DNA by single-strand conformation polymorphism analysis and DNA sequence. *Parasitology International*, **54**(1): 65-68.
- Nawa, Y., de la Cruz-Otero, M.C., Zazueta-Ramos, M.L., Bojórquez-Contreras, A., Sicairos-Félix, J., Campista-León, S., Torres-Montoya, E.H., Sánchez-González, S., Guzmán-Loreto, R., Delgado-Vargas, F. y Díaz-Camacho, S.P. 2009. Is *Gnathostoma turgidum* an annual parasite of opossums? Drastic seasonal changes of infection in *Didelphis virginiana* in Mexico. *Journal of Parasitology*, **95**(4): 908-912.
- Lotze, J.H. y Anderson, S. 1979. *Procyon lotor*. *Mammalian species*, (119):1-8.
- Ondrejicka, D.A., Locke, S.A., Morey, K., Borisenko, A.V. y Hanner, R.H. 2014. Status and prospects of DNA barcoding in medically important parasites and vectors. *Trends in Parasitology*, **30**(12): 582-591.
- Pérez-Álvarez, Y., García-Prieto, L., Osorio-Sarabia, D., Lamothe-Argumedo, R. y León-Règagnon, V. 2008. Present distribution of the genus *Gnathostoma* (Nematoda: Gnathostomatidae) in Mexico. *Zootaxa*, **1930**: 39-55.
- Posada, D. y Crandall, K.A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, **14**: 817-81.
- Poulin, R. y Mouillot, D. 2003. Parasite specialization from a phylogenetic perspective: a new index of host specificity. *Parasitology*, **126**(5): 473-480.
- Poulin, R., Krasnov, B.R. y Morand, S. 2006. Patterns of host specificity in parasites exploiting small mammals. *Micromammals and macroparasites: from evolutionary ecology to management*, 233-256.
- Powers, T.O., Todd, T.C., Burnell, A M., Murray, P.C.B., Fleming, C.C., Szalanski, A.L., Adams, B.A. y Harris, T. 1997. The rDNA internal transcribed spacer region as a taxonomic marker for nematodes. *Journal of Nematology*, **29**(4): 441.
- Rambaut, A. 2006. Figtree. Tree Figure Drawing Tool. Version 1.4. 2. Institute of Evolutionary Biology.

- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., ... y Huelsenbeck, J.P. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology*, **61**(3): 539-542.
- Siddall, M.E., Kvist, S., Phillips, A. y Ocegüera-Figueroa, A. 2012. DNA barcoding of parasitic nematodes: is it kosher? *Journal of Parasitology*, **98**(3): 692-694.
- Smythe, A.B. y Nadler, S.A. 2006. Molecular phylogeny of Acrobeloides and Cephalobus (Nematoda: Cephalobidae) reveals paraphyletic taxa and recurrent evolution of simple labial morphology. *Nematology*, **8**(6): 819-836.