

123



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE LA VARIACION MORFOLOGICA Y MOLECULAR DE LAS LARVAS DEL TERCER ESTADIO AVANZADO DE GNATHOSTOMA SP. (NEMATODA: GNATHOSTOMIDAE) EN ALGUNOS PECES DE LA LAGUNA DE TRES PALOS, GUERRERO, MÉXICO.

299341

TESIS DE LICENCIATURA
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A
ELIZABETH AURELIA MARTINEZ SALAZAR

ASESOR: DRA. VIRGINIA LEON REGAGNON

MÉXICO, D.F.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:
Estudio de la variación morfológica y molecular de las larvas del tercer estadio
avanzado de Gnathostoma sp. (Nematoda: Gnathostomidae) en algunos peces de la
Laguna de Tres Palos, Guerrero, México.
realizado por Elizabeth Aurelia Martínez Salazar
con número de cuenta 9321243-6 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología
Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario
Propietario
Propietario
Suplente
Suplente

Dra. Virginia León Rêgagnon
Dr. Marcos Rafael Lamothe Argumedo
M. en C. Luis García Prieto
M. en C. Pilar Gabriela Ibañez Hernández

[Handwritten signatures]

M. en C. Laura Margarita Márquez Valdelamar
Consejo Departamental de Biología **FACULTAD DE CIENCIAS**

U.N.A.M.

Dra. Patricia Ramos Morales.



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

DEDICATORIAS

A mis padres por todo el amor, confianza, comprensión y apoyo incondicional, que siempre me han brindado. Son mi más grande motivación para seguir adelante ante cualquier adversidad. Mil gracias!!!: Norberto Martínez (tío beto) y Glafira Salazar (tia fira).

A mis hermanos Fernando, Jaime y Felipe, que desde mis primeros años, han sido el mayor ejemplo a seguir, siempre motivándome y brindándome su cariño, paciencia y apoyo (en toda la extensión de la palabra).

A Jaime, que desde mis primeros años me impulso en mis estudios y fué el primero que me presento a la biología.

A mis sobrinos Iván y Anahi, por compartir esos pequeños momentos.

A Rogelio por su gran apoyo, cariño y motivación incondicional.

A mi enorme familia que siempre me han alentado a seguir adelante.

A mis abuelos (as) y tíos (as), que a pesar de su ausencia, siempre van en mi pensamiento, donde quiera que voy.

En memoria de

Isaura Salazar Ruiz,

Santiago Martínez Martínez y

Giuseppe Baraldi Merchant.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Héctor Hernández Macías, Director del Instituto de Biología, de la UNAM y al Dr. Fernando Álvarez Noguera, Jefe del Departamento de Zoología, por permitirme el uso de las instalaciones.

A la Dra. Virginia León Règagnon directora de esta tesis, la cual siempre me ha brindado una oportunidad, apoyo y confianza incondicional, me ha introducido en esta área de la biología, fomentando mi formación profesional y académica en el mundo de los helmintos; así mismo le agradezco todas las facilidades otorgadas en el Laboratorio de Biología Molecular 3, del Instituto de Biología, donde me introdujo en las técnicas moleculares (mil gracias por tu paciencia!).

Al Dr. Rafael Lamothe Argumedo, jefe del Laboratorio de Helminología, por haberme permitido el uso de las instalaciones del mismo; por sus valiosos y acertados comentarios en este trabajo.

A la M. en C. Pilar Gabriela Ibañez Hernández, del Museo de Zoología de La Facultad de Ciencias, por ser parte de mí sínodo, gracias por ayudarme, apoyarme y enseñarme incondicionalmente algunas herramientas en el análisis estadístico.

A la M. en C. Laura Márquez V., por ser parte de mí sínodo, así como sus consejos en Biología Molecular, y por la ayuda brindada en la secuenciación del material biológico.

Al M en C. Luis García Prieto, por su paciencia otorgada, pero sobre todo por sus muy acertados y valiosos comentarios que enriquecieron a este trabajo; y la disposición incondicional del préstamo de bibliografía de la CNHE.

Agradezco a proyecto IN219198 a cargo del Dr. Gerardo Pérez Ponce de León y Dra. Virginia León R; así como al proyecto IN204600, a cargo del Dr. Rafael Lamothe Argumedo y la Dra. Virginia León, por el apoyo otorgado en el desarrollo de este trabajo.

Al dibujante Felipe Villegas Márquez, por la elaboración de los dibujos, tanto del ciclo de vida como el área de estudio.

Al M. en C. Alejandro Martínez Mena, por permitirme el uso de las instalaciones del Laboratorio de Microcine, Fac. Ciencias-UNAM.

Al M en C. Alejandro Zaldivar Riverón y al Biol. Ulises Razo M., por toda su disposición y consejos proporcionados, en los métodos moleculares.

A Rogelio Rosas Valdez, por todo el apoyo incondicional, a lo largo de todos estos años y por esos consejos académicos: Cierra la puerta ya, no la habrás jamás,... que puede ser el pájaro que osa cantar una vez más...

A Rogelio Rosas y Laura Paredes, por sus valiosas aportaciones a este trabajo, así como su disposición al dar respuestas a mis inquietudes.

A todos los maestros y compañeros de Laboratorio de Helminología: en particular a los egresados del Taller de "Parasitología de Vertebrados", por la colecta del material biológico.

A Diana Zavaleta, Elizabeth Robles, Esther Oropeza y Karina Cardona, que desde hace ya muchos años estamos juntas y con el paso del tiempo sigue creciendo el respeto y cariño, así como a Rogelio, Laura, Ulises, Karina (Tuzita), Maritza, Peter, Dulce, Vero (Primuchis), Falú, Juan Carlos y Chayo por esos magníficos momentos que pasamos juntos.

Dra. Maria Luisa Carreño (Paleodoc), mil gracias!! por sus experimentados consejos, el apoyo incondicional y su amistad.

Dra. Cecilia Vanegas, mil gracias!! por toda la confianza, amistad y motivación que me sigue proporcionado como a largo de la carrera.

A la Dra. Nuñez y Ma. De la Luz Hernández Macilla, por todas las facilidades otorgadas.

A M en C. Gabriela Ibañez, M. en C. Laura Vargas, Dra. Martha Gordillo, Dr. José Latournerie, Prof. José Ruíz Cardenas, Prof. Luis Castillo, y al Dr. Filiberto Malagón, por su motivación incondicional.

Estudio de la variación morfológica y molecular de las larvas del tercer estadio avanzado de *Gnathostoma* sp. (Nematoda: Gnathostomidae) en algunos peces de la Laguna de Tres Palos, Guerrero, México.

CONTENIDO

DEDICATORIAS

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. GENERALIDADES.....	3
1.2. EL GÉNERO <i>Gnathostoma</i>	3
1.3. CICLO DE VIDA.....	6
2. ANTECEDENTES	8
2.1 ANTECEDENTES EN MÉXICO.....	8
2.2 DATOS MORFOLOGICOS.....	13
2.3 LA VARIACIÓN.....	14
2.4 DATOS MOLECULARES	15
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
4. OBJETIVOS	17
4.1. OBJETIVO GENERAL.....	17
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	17
5. AREA DE ESTUDIO.....	17
6. MATERIALES Y METODOS.....	21
6.1. ESTUDIO MORFOLÓGICO-ESTADÍSTICO.....	21
6.2. ESTUDIO MOLECULAR.....	22
7. RESULTADOS	24
7.1. ESTUDIO MORFOLÓGICO.....	26
7.1.1. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (ACP).....	38
7.1.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO UNIVARIADO (ANOVA).....	39
7.2. ESTUDIO MOLECULAR.....	41
7.3. REDESCRIPCIÓN DE LAS LARVAS L3A DE <i>Gnathostoma binucleatum</i>	44
8. DISCUSIÓN	52
9. CONCLUSIONES.....	59
10. APENDICES.....	60
11. BIBLIOGRAFIA.....	67

RESUMEN

Las especies del género *Gnathostoma*, tienen una amplia distribución no solo nacional sino mundial, así como una gran importancia en el área de la salud pública, ya que producen la enfermedad llamada gnatostomosis. En México este parásito se adquiere comúnmente con el consumo de "ceviche", "callos", "sushi" o "sashimi", pues la etapa infectiva para el humano (larva del tercer estadio avanzado o L3A), se aloja en el músculo de peces que actúan como sus hospederos intermediarios.

La gnatostomosis ha cobrado importancia en las últimas décadas en México debido al incremento en su prevalencia (más de 3000 casos) en los últimos años y de ahí la trascendencia del estudio taxonómico del estadio larvario. La diferenciación morfológica de las especies del género en su etapa L3A, es complicada y ha ocasionado controversia, sin embargo la variabilidad morfológica y molecular del género *Gnathostoma* en México, no ha sido estudiada con profundidad.

Las larvas L3A (n = 81), se colectaron a partir del tejido muscular de 5 especies de peces de la Laguna de Tres Palos, Gro: *Eleotris picta* "alahuate", *Ariopsis guatemalensis* "cuatete", *Dormitator latifrons* "popoyote", *Cichlasoma trimaculatum* "charra", y *Gobiomorus maculatus* "guavina".

Se observó la presencia de seis tipos morfológicos de larvas L3A de *Gnathostoma*, en las cinco especies de peces de la Laguna de Tres Palos, que se diferencian a partir de la forma de los ganchos del bulbo cefálico.

A través de un estudio de componentes principales se demostró que la variación morfológica observada no corresponde con una subagrupación, por lo que indica que la variación de las larvas L3A, sugiere que sea el resultado de variación intraespecífica; mediante un análisis univariado se detectaron aquellos caracteres que varían entre los seis morfotipos: la longitud total del cuerpo, anchura del bulbo cefálico, la distancia entre las hileras de ganchos del bulbo cefálico, la distancia entre cada gancho del bulbo cefálico, la longitud del esófago, la longitud del intestino, el inicio y término de la localización de la papila cervical y la longitud de la punta del gancho a la base del gancho. Por lo que el valor taxonómico de estos caracteres se pone en duda. Esta variabilidad no es producida por efecto de los hospederos y no depende del proceso de fijación del material biológico.

Se observó independiente de la forma de los ganchos, la presencia 1 a 3 de ganchos fuera de las hileras de ganchos del bulbo cefálico, presentes solo en los morfotipos 1, 2 y 3.

Acorde con el análisis univariado, se propone evaluar la validez taxonómica de un carácter no considerado en estudios previos y el cual se mantuvo constante entre los seis morfotipos: La profundidad, que va de la punta del gancho al borde posterior de la base.

Se corrobora que la anchura máxima del cuerpo, la cobertura de espinas, las hileras de ganchos, la diferencia entre la I hilera y la IV, la longitud del bulbo cefálico, la distancia entre las hileras del cuerpo (anterior, media y posterior), distancia del ano a la terminación del cuerpo, anchura del esófago e intestino, anchura y longitud de los labios y la longitud de los sacos cervicales, son caracteres válidos para diferenciar a esta especie del género.

Asimismo, el análisis molecular, muestra que las secuencias de la región ITS-2 (~427pb.) de los tres primeros morfotipos presentan un porcentaje de divergencia no sobrepasa el 0.71%, respecto de la secuencia de *Gnathostoma binucleatum* obtenida de Genbank (No. acceso Z97072), mientras que presenta un porcentaje de divergencia del 12.04 al 12.72% con respecto de *G. spinigerum* (No. acceso Z97175). Se considera que las diferencias genéticas y morfológicas observadas en los tres morfotipos de larvas L3A de *Gnathostoma* sp. estudiadas en la Laguna de Tres Palos, pueden atribuirse a la variación intraespecífica y todos ellos corresponden a la especie *G. binucleatum*.

En cuanto los morfotipos 5 y 6 (fijados en formol 4%), se extrajo el ADN y se amplificó la región ITS-2 del rADN, sin embargo por lo fragmentado del producto, solo pudieron secuenciarse 70 pb, por lo que fue imposible su comparación con las secuencias de los otros morfotipos.

Se registra por primera vez la presencia de *G. binucleatum* en *Ariopsis guatemalensis*, *Cichlasoma trimaculatum* y *Gobiomorus maculatus* y se corrobora su presencia en *Eleotris picta*, así como en *Dormitator latifrons* en la Laguna de Tres Palos, Gro.

Se sugiere la realización de estudios morfológicos, estadísticos y moleculares con los morfotipos 4, 5, y 6 para corroborar su identidad específica, así como con larvas L3A obtenidas de otros hospederos y otras regiones geográficas de México.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. GENERALIDADES

Los nemátodos incluyen muchas especies de vida libre o parásitas. Las formas de vida libre tienen amplia distribución en el agua y la tierra. Las especies parásitas se pueden encontrar en plantas, diferentes invertebrados y vertebrados (Schmidt y Roberts, 1996).

Railliet en 1895, propuso la familia Gnathostomatidae (Spirurida: Gnathostomatoidea), la cual incluye a 3 subfamilias, Spiroxyinae, Ancyracanthinae y Gnathostomatinae. Esta última se caracteriza por la presencia de un bulbo cefálico. La subfamilia Gnathostomatinae (Railliet, 1895, Fam.) fue propuesta por Baylis y Lane, 1920, para incluir a los géneros *Gnathostoma* Owen, 1836, *Echinocephalus* Molin, 1858 y *Tanqua* Blanchard, 1904. Las especies del género *Gnathostoma*, se caracterizan por presentar un cuerpo parcialmente o completamente armado con espinas, y por ser parásitas de mamíferos en su estado adulto (Miyazaki, 1966; Yamaguti, 1961).

1.2. EL GÉNERO *Gnathostoma*

En 1836 Owen erigió al género *Gnathostoma*, estableciendo a *G. spinigerum* como especie tipo. Esos ejemplares se encontraron en la pared interna del estómago de un tigre de Bengala (*Felis tigris*), en el zoológico de Londres (Almeyda-Artigas, 1991). Hasta la fecha se han descrito aproximadamente 22 especies pertenecientes al género en el mundo, de las que 11 se reconocen como válidas (Miyazaki, 1960; Daengsvang, 1980; Almeyda-Artigas, 1991); de ellas 5 afectan al hombre (Miyazaki, 1920; Nomura *et al.*, 2000). El género *Gnathostoma* tiene una amplia distribución (India, Sri-Lanka, Malasia, Filipinas, Japón, Brasil, Argentina, Canadá, Estados Unidos, Ecuador, etc.), y gran importancia en el área de la salud pública, ya que puede parasitar al hombre, la enfermedad se llama gnatostomosis (Tabla I). Esta parasitosis es muy recurrente en países asiáticos como Tailandia, Japón, China, India y Filipinas, principalmente (Medina-Vences, 1988¹; Akahane *et al.*, 1994; Díaz-Camacho *et al.*, 2000). La infección es el resultado del consumo de carne cruda o parcialmente cocida de peces, anfibios o reptiles (hospederos intermediarios o paraténicos), con larvas del tercer estadio avanzado (Schmidt y Roberts, 1996).

En México, este padecimiento se adquiere comúnmente con el consumo de “ceviche”, “callos” y “sushi” (Lamothe-Argumedo, 1992, 1999a; Lamothe-Argumedo *et al.*, 1998). En estado adulto, los gusanos se encuentran formando tumores en el esófago y estómago de mamíferos carnívoros, ya sea domésticos o silvestres como tlacuaches, comadrejas, perros, gatos, cerdos y tigres (Díaz-Camacho, 1998²), y particularmente en aquellos que se alimentan de peces de agua dulce y estuarinos (Alvarez-Guerrero y Lamothe-Argumedo, 2000).

¹ Medina-Vences, R. L. 1988. Estudio de la Larva del Tercer Estadio de *Gnathostoma* sp. en Peces Dulceacuicolas de Temazcal Oaxaca, México. Tesis de Licenciatura Facultad de Ciencias UNAM. 53pp.
² Díaz-Camacho, S. P. 1998. Estudio epidemiológico y clínico sobre la gnathostomiasis en Sinaloa, México. Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina. Departamento de Microbiología y Parasitología. U.N.A.M. 96pp.

El hombre es un hospedero accidental y en él no se desarrolla el parásito adulto (Lamothe-Argumedo *et al.*, 1998; Cruz-Reyes, 1994); los gusanos inmaduros pueden estar en los órganos internos o cerca de la piel, donde producen edemas, y abscesos locales de naturaleza inflamatoria transitorios o persistentes. Pueden migrar por los tejidos del huésped (síndrome de *larva migrans*), y abrir túneles a través de los tejidos de la epidermis, produciendo una erupción de tipo serpiginoso. Se ha descrito invasión de ojos, con iritis, uveítis, hemorragia y celulitis orbitaria. La migración del gusano por médula espinal y encéfalo causa amplos rayectos necróticos hemorrágicos. Entre los signos y síntomas de la inflamación local están eosinofilia, leucocitosis, hematuria, hemoptisis, edema de faringe con disnea, edema angionecrótico y abscesos (Brown, 1977). No existe un tratamiento específico para la gnatostomosis, pero se recomienda recuperar al parásito a través de procesos quirúrgicos, sin embargo es difícil por su carácter migratorio (Díaz-Camacho, 1998³). Algunos tratamientos probados en la fase cutánea incluyen la prescripción de Albendazol, Mebendazol y Tiabendazol (Lamothe-Argumedo y Osorio, 1998).

Tabla I. Especies del género *Gnathostoma* (Owen, 1836) (Peláez y Pérez, 1970; Medina-Vences, 1988⁴; Díaz-Camacho 1998⁵ y Alvarez- Guerrero, 2000⁶).

Especie	Hospedero	Distribución	Autor
<i>G. americanum</i> ¹	<i>Felis pardalis</i>	Brasil	Travassos, 1925
<i>G. binucleatum</i> * ¹	<i>Felis pardalus</i>	México	Almeyda-Artigas, 1991
<i>G. brasiliense</i> ^{1, L}	<i>Lutreolina crassicaudata</i>	Brasil	Ruiz, 1952
<i>G. didelphis</i> ^{1, L}	<i>Didelphis virginiana</i> ; <i>Philander laniger</i>	Estados Unidos; Panamá	Chandler, 1932
<i>G. doloresi</i> * ¹	Cerdos y Jabalies	Filipinas	Tubangui, 1925
<i>G. gracile</i>	<i>Arapaima gigas</i>	Brasil	Diesing, 1838
<i>G. hispidum</i> * ¹	Jabalies y cerdos	Turquestán y Hungría	Fedchenko, 1872
<i>G. horridum</i> ^L	<i>Alligator mississippiensis</i>	Estados Unidos	Leidy, 1856
<i>G. malaysiae</i> * ¹	<i>Rattus r. tomancus</i>	Malasia	Miyazaki & Dunn, 1965
<i>G. minutum</i> ^L	<i>Bitis pascicornis</i>	Congo Belga	Schuermans-Stekhoven, 1943
<i>G. miyazaki</i> ¹	<i>Lutra c. canadiensis</i>	Canadá	Anderson, 1964
<i>G. nipponicum</i> * ¹	<i>Mustela Sibirica itatsi</i>	Japón	Yamaguti, 1941
<i>G. occipitira</i>	Aguila	Turquestán	Srjabin, 1915
<i>G. paronai</i>	<i>Mus rajah</i>	Islas Mentawai	Porta, 1908
<i>G. pelicani</i> ^L	Pelicano	Sin localidad	Chatin, 1874
<i>G. procyonis</i> ¹	<i>Procyon lotor</i>	Estados Unidos	Chandler, 1942
<i>G. robustum</i>	<i>Felis concolor</i>	Brasil	Diesing, 1838
<i>G. sociale</i>	<i>Mustelo vison</i>	Estados Unidos	Leidy, 1838
<i>G. spinigerum</i> * ¹	<i>Felis tigris</i>	Inglaterra	Owen, 1836
<i>G. turgidum</i> ¹	<i>Didelphis azarae</i> ; <i>Didelphis aurita</i>	Argentina; Estados Unidos	Stossich, 1902
<i>G. vietnamicum</i> ¹	<i>Lutra elioti</i>	Vietnam	Le- Van-Hoa, 1965
<i>G. weinbergi</i>	<i>Midas sp.</i>	Guayana Francesa	Skrjabin, 1916

* = especies que infectan hombre, L = descritas a partir de larvas L3A; 1 = especies válidas dentro del género, según Miyazaki (1920); Daensvang (1980), Ruiz (1952), Anderson (1964), Le-Van-Hoa (1965), Miyazaki y Dunn (1965), y Almeyda-Artigas (1991)

Medina-Vences, R. L. 1988 Estudio de la Larva del Tercer Estadio de *Gnathostoma* sp. en Peces Dulceacuicolas de Temazcal Oaxaca, México. Tesis de licenciatura Facultad de Ciencias UNAM 53pp

Díaz-Camacho, S. P. 1998 Estudio epidemiológico y clínico sobre la gnathostomiasis en Sinaloa, México Tesis de Doctorado Facultad de Medicina Departamento de Microbiología y Parasitología U.N.A.M. 96pp

Alvarez-Guerrero, C. 2000. Estudio de la gnathostomiasis en el estado de Nayarit Tesis de Mestría en Ciencias Pecuarias Universidad de Colima. 73pp.

3. CICLO DE VIDA

En sus hospederos definitivos los gusanos adultos forman tumores abiertos en las paredes del esófago o tómagos. Las hembras, después de la cópula, ponen huevos ovales (que salen con las heces y son arrastrados por el agua hacia diques, ríos, lagos, presas, etc.), de color amarillo o pardo amarillento, que miden aproximadamente 70 x 40 μm y presentan una pared gruesa, y se caracterizan por presentar uno o dos tapones laterales (dependiendo de la especie) (Miyazaki, 1991). En el huevo se desarrolla el primer estadio larvario (L1), que muda y eclosiona después de 12 días aproximadamente a través de un opérculo, a una temperatura entre los 24 y 28°C. La larva del segundo estadio (L2), vive entre 48 y 72 horas y puede ser ingerida por un copepodo (de los géneros *Eucyclops*, *Mesocyclops*, *Cyclops*, *Acantocyclops*, etc.) para continuar su desarrollo. Después de la ingestión, se introduce en el hemocele y se transforma en un tiempo que varía de 7 a 10 días dando lugar a la larva del tercer estadio temprano (L3T), la cual mide entre 3 y 4 mm de largo. El segundo hospedero intermediario (pez), ingiere al crustáceo; la larva migra y se aloja en la musculatura, transformándose en la larva del tercer estadio avanzado (L3A), que presenta un cuerpo cilíndrico con extremos redondeados de 3.0 a 4.7 mm de longitud (Díaz-Camacho, 1998⁷), siendo ésta la forma infectiva. Otros vertebrados como peces carnívoros, anfibios, reptiles, aves ictiófagas, etc., pueden actuar como hospederos paraténicos. Cuando el pez (o el hospedero paraténico), es ingerido por un mamífero (cerdos, perros, gatos, mapaches, tlacuaches, etc.), la larva L3A muda mientras migra por los diferentes órganos del cuerpo y de esta manera alcanza su madurez sexual en un periodo de cuatro a seis meses (Lamothe-Argumedo, 1997; Prommas Daengsvang, 1936) (Figura 1).

Díaz-Camacho, S. P. 1998. Estudio epidemiológico y clínico sobre la gnathostomiasis en Sinaloa, México. Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina. Departamento de Microbiología y Parasitología. U.N.A.M. 96pp.

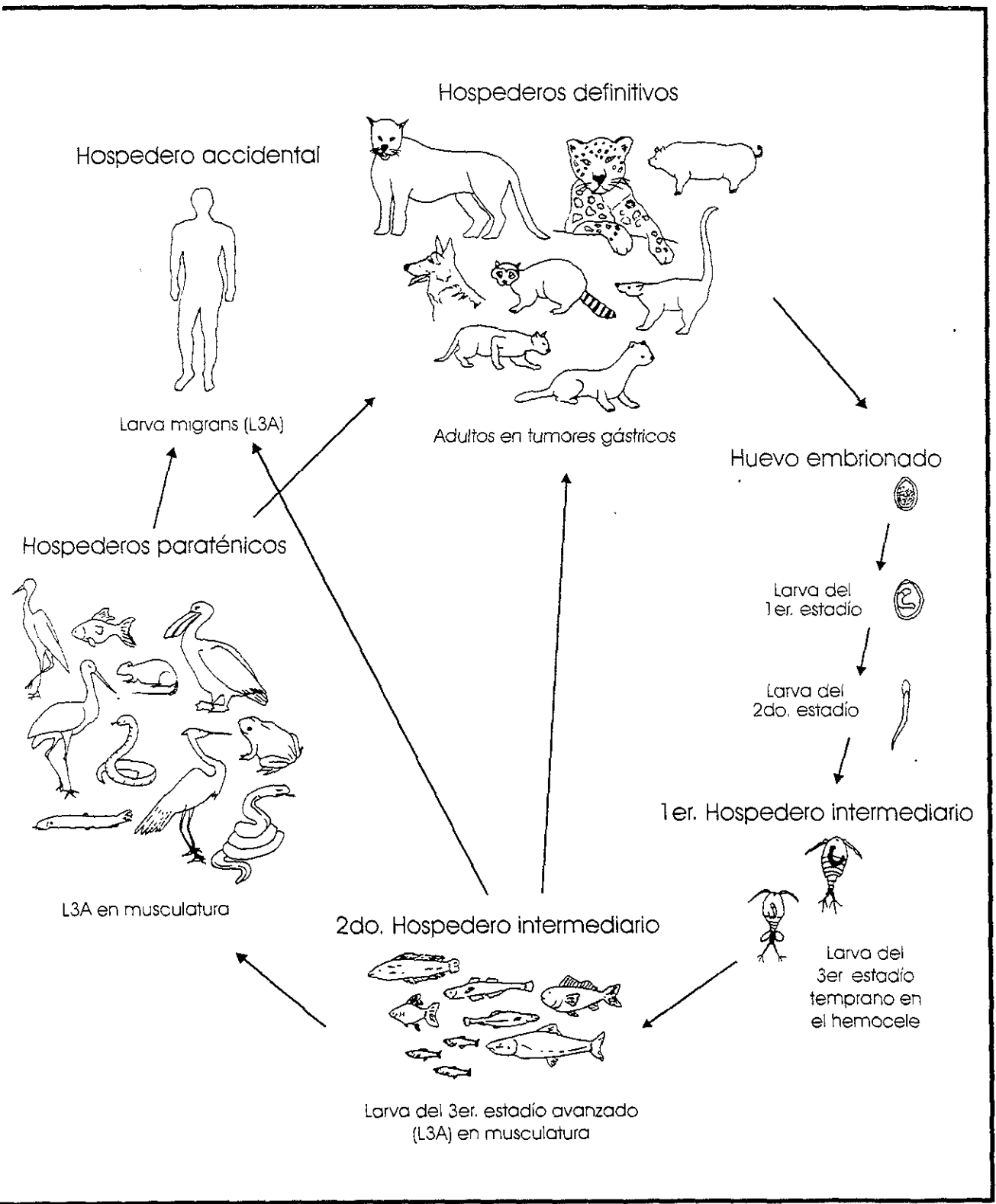


Figura 1. Ciclo de vida de *Gnathostoma* spp.

2. ANTECEDENTES

2.1. ANTECEDENTES EN MÉXICO

Caballero (1958), registró a *G. spinigerum* parasitando a *Didelphis marsupialis tabascensis* en Jaltenango, Chiapas, constituyendo éste el primer registro en México. La validez de esta identificación fue dudosa, ya que los ejemplares difieren de la descripción de la especie realizada por Miyazaki en 1960 en caracteres morfológicos tales como el número de anillos de ganchos del bulbo cefálico, el número, forma y disposición de los mismos, la espinación de la superficie corporal, etc. Posteriormente, ese material fue reasignado a la especie *G. turgidum* (Almeyda-Artigas *et al.*, 1991; Lamothe-Argumedo, 1992; Lamothe-Argumedo *et al.*, 1998). A partir de entonces se han realizado numerosos registros que se recopilan en la Tabla I; hasta el momento solo se han registrado en nuestro país a tres especies de este género formalmente descritas (*G. turgidum*, *G. binucleatum*, y *G. procyonis*) y dos más aun no nombradas (Almeyda-Artigas *et al.*, 2001).

Tabla II. Registro de las especies del género *Gnathostoma* (Owen, 1836) en México.

(^D= Hospedero Definitivo, ^C= Primer Hospedero Intermediario; ^I= Segundo Hospedero Intermediario; ^F= Hospedero paraténico).

Especie	Hospedero	Distribución	Referencia
<i>G. turgidum</i>	<i>Didelphis marsupialis</i> ^D	Jaltenango, Chis.	Caballero, 1958 ⁽¹⁾
Stossich, 1902	<i>Didelphis virginiana</i> ^D	Tlacotalpan, Ver.	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> , 2000
		Temazcal, Oax.	Lamothe-Argumedo <i>et al.</i> , 1998
		L. Tres Palos, Gro.	Almeyda-Artigas y Mosqueda-Cabrera, 2000 ⁸
	<i>Didelphis sp.</i> ^D	Temazcal, Oax	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> , 1991b. ⁹
	"Tlacuache cuatroojillos" ^D	Temazcal, Oax.	Lamothe-Argumedo, 1997
	<i>Poeciliopsis gracilis</i> ^I	Temazcal, Oax.	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> , 2000 ⁽²⁾
	<i>Oreochromis niloticus</i> ^I	P. Miguel Alemán, Oax	Almeyda-Artigas, 1991
	<i>Kinosternon integrum</i> ^P	L. Tres Palos, Gro.	Almeyda-Artigas y Mosqueda-Cabrera, 2000 ¹⁰
<i>G. binucleatum</i>	<i>Petenia splendida</i> ^I	P. Miguel Alemán, Oax.	Almeyda-Artigas, 1991
Almeyda-Artigas, 1991		L. Alvarado, Ver.	Almeyda-Artigas y Mosqueda-Cabrera, 1994 ¹¹
		R. Papaloapan, Ver.	
	<i>Cichlasoma fenestratum</i> ^I	P. Miguel Alemán, Oax.	Almeyda-Artigas, 1991
	<i>Oreochromis niloticus</i> ^I		
	<i>Cichlasoma urophthalmus</i> ^I		
	<i>Oreochromis mossambicus</i> ^I		

¹⁾ Originalmente registrada como *G. spinigerum*

²⁾ Infección experimental a partir de huevos obtenidos de una hembra colectada en *Didelphis marsupialis* en Temazcal, Oaxaca

Almeyda-Artigas R. J., y M. A. Mosqueda-Cabrera 2000 Hallazgo de *Gnathostoma binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991 y *G. turgidum* Stossich, 1902 (Nematoda: Spirurida) en carnívoros y marsupiales del Pacífico mexicano. Revista Latinoamericana de Microbiología. En: XIV Congreso Nacional de Ictiología. Octubre 42 (II) 161-162

Almeyda-Artigas, R. J., M. A. Mosqueda-Cabrera y E. Sánchez-Miranda. 1991b Ciclo de vida natural y experimental de *Gnathostoma turgidum*, Stossich, 1902 (Nematoda: Spiruridae) parásito de marsupiales en Temascal, Oaxaca. En: Memorias del XI Congreso Nacional de Zoología, Mérida, Yucatán

Almeyda-Artigas, R. J., y M. A. Mosqueda-Cabrera 1994. Análisis de la distribución de las larvas del tercer estadio de *Gnathostoma sp.* (Nematoda: Spiruridae) en la musculatura de peces dulceacuicolas y estuarinos de México, Ecuador y Japón. Resúmenes del IV Congreso Nacional de Ictiología. Sociedad Mexicana de Ictiología. Morelia, Michoacán

Tabla II. Registro de las especies del género *Gnathostoma* (Owen, 1836) en México (Continuación).

(^P= Hospedero Definitivo, ^C= Primer Hospedero Intermediario; ^I= Segundo Hospedero Intermediario, ^F= Hospedero paraténico).

<i>G. binucleatum</i>	<i>Oreochromis aureus</i> ¹	P. Miguel Alemán, Oax	Almeyda-Artigas, 1991
Almeyda-Artigas, 1991	<i>Eucyclops agilis</i> ^C	P. Miguel Alemán, Oax.	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> , 1995 ¹²
	<i>Eucyclops macrurus</i> ^C		---
	<i>Eucyclops prasinus</i> ^C		
	<i>Mesocyclops edax</i> ^C	P. Miguel Alemán, Oax	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> , 1995 ¹³
	<i>Mesocyclops leuckarti</i> ^C		
	<i>Mesocyclops tenuis</i> ^C		
	<i>Macrocyclus albidus</i> ^C		
	<i>Cyclops bicuspidatus</i> ^C		
	<i>Felis catus</i> ^C	Temazcal Oax	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> , 1991a ¹⁴
	<i>Felis pardalis</i> ^D	Temazcal Oax.	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> , 1991a. ¹⁵
	<i>Coragyps atratus</i> ^P	Temazcal Oax	Lamothe-Argumedo, 1997
	<i>Trachemys scripta</i> ^P		
	<i>Staurotypus triporcatus</i> ^P		
	<i>Pelecanus erythrorhynchus</i> ^P		
	<i>Pelecanus erythrorhynchus</i> ^P	L. Tres Palos, Gro	Almeyda-Artigas y Mosqueda-Cabrera, 2000 ¹⁶
	<i>Dormitator latifrons</i> ¹		
	<i>Cichlasoma sp</i> ¹		
	<i>Bufo marinus</i> ^P		
	<i>Rana swefelii</i> ^P		
	<i>Kinosternon integrum</i> ^P		
	<i>Casmerodius albus</i> ^P		
	<i>Natrix valida</i> ^P		
	<i>Kinosternon sp.</i> ^P	L. Agua Brava, Nay	Almeyda-Artigas y Mosqueda-Cabrera, 2000 ¹⁷
	<i>Boa constrictor</i> ^P		
	<i>Phalacrocorax auritus</i> ^P		
	<i>Casmerodius albus</i> ^P		
	<i>Procyon lotor</i> ^D	El Potrero, Ver	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> , 1994
	<i>Gobiomorus dormitor</i> ¹	Tampico, Tamps.	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> , 2000
		Tlacotalpan, Ver.	Almeyda-Artigas, 1991
		Cosamaloapan, Ver.	
		L. Alvarado, Ver.	Almeyda-Artigas y Mosqueda-Cabrera, 1994 ¹⁸

Almeyda-Artigas R J, M. A Mosqueda-Cabrera, y E Sánchez-Miranda 1995 El papel de crustáceos y peces en la transmisión y diseminación de *Gnathostoma binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991 (Nematoda), agente causal de la gnatostomosis en el Golfo de México Memorias del XIII Congreso Nacional de Ictiología Morelia, Michoacán

Almeyda-Artigas R J, V Acosta-Hernández, J. Alonso-Díaz, M Catañeda-Sánchez V, y R Zarate-Ramírez 1991a Nuevos registros helmintológicos reportados de la parte de la cuenca del Papaloapan, Veracruz III, Mammalia En Memorias del XI Congreso Nacional de Parasitología, Universidad Autónoma de Querétaro.

Almeyda-Artigas, R J, y M A Mosqueda-Cabrera 2000. Hallazgo de *Gnathostoma binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991 y *G. turgidum* Stossich, 1902 (Nematoda Spirurida) en carnívoros y marsupiales del Pacífico mexicano Revista Latinoamericana de Microbiología En XIV Congreso Nacional de Microbiología Octubre, 42 (II) 161-162

Almeyda-Artigas, R J, y M A Mosqueda-Cabrera 1994. Análisis de la distribución de las larvas del tercer estadio de *Gnathostoma* sp. (Nematoda Spirurida) en la musculatura de peces dulceacuicolas y estuarinos de México, Ecuador y Japón Resúmenes del IV Congreso Nacional de Ictiología Sociedad Mexicana de Ictiología Morelia Michoacán

Tabla II. Registro de las especies del género *Gnathostoma* (Owen, 1836) en México (Continuación).

(^p= Hospedero Definitivo, ^c= Primer Hospedero Intermediario; ^l= Segundo Hospedero Intermediario; ^p= Hospedero paraténico)

<i>G. binucleatum</i>	<i>Procyon lotor</i> ^{p, D}	Tlacotalpan, Ver	Lamothe-Argumedo, 1997
Almeyda-Artigas.	<i>Polyborus plancus</i> ^p		Mosqueda-Cabrera <i>et al</i> , 2000 ¹⁹
1991	<i>Gobiomorus dormitor</i> ¹	L. Alvarado, Ver	Almeyda-Artigas, 1991
		Cosamaloapan, Ver	
	<i>Centropomus parallelus</i> ¹	L. Alvarado, Ver.	Almeyda-Artigas y Mosqueda-Cabrera, 1994 ²⁰
		R. Papaloapan, Ver.	Lamothe-Argumedo, 1997
	<i>Cathorops melanotus</i> ¹	R. Papaloapan, Ver.	Lamothe-Argumedo, 1997
	<i>Eleotris pictus</i>	L. Tres Palos, Gro.	Osorio-Sarabia y León-Régagnon, 2000 ²¹
	<i>Gobiomorus dormitor</i> ¹	Pa. Centla, Tabs.	Almeyda <i>et al</i> , 2001a ²²
	<i>Atractosteus tropicus</i> ^p		
	<i>Casmerodius albus</i> ^p		Almeyda <i>et al.</i> , 2001b. ²³
	<i>Bubo virginianus</i> ^p		
	<i>Canis familiaris</i> ^D		Ortiz-Najera <i>et al</i> , 2001 ²⁴
<i>G. procyonis</i>	<i>Didelphis virginiana</i> ^D	Cuernavaca, Mor.	Ortiz <i>et al.</i> , 1990 en Lamothe-Argumedo,
Chandler, 1942		Tepoztlan, Mor.	1997
	<i>Procyon lotor</i> ^D	El Potrero, Ver.	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> , 2000
	<i>Procyon lotor hernandezii</i> ^D	Tlacotalpan, Ver.	Almeyda-Artigas <i>et al</i> , 1994
	<i>Didelphis marsupialis</i> ^D	B. Chamela, Jal	Caballero y C., 1977 en Lamothe-Argumedo <i>et al.</i> , 1997 ⁽³⁾
<i>Gnathostoma</i> sp	<i>Egretta alba</i> ^p	P. Cerro de Oro, Oax.	Lamothe-Argumedo, 1997
		D. Alhuate, Sin	Díaz-Camacho, 1998 ²⁵
		R. San Lorenzo, Sin.	
		P. El Varejonal, Sin.	
	<i>Egretta thula</i> ^p	P. Miguel Alemán, Oax.	Lamothe-Argumedo, 1997
		P. Cerro de Oro, Oax.	
		L. Tres Palos, Gro.	León-Régagnon <i>et al.</i> , 2000
	<i>Canis familiaris</i> ^D	Temazcal Oax	Lamothe-Argumedo, 1997
	<i>Boa constrictor</i> ^p		
	<i>Smilisca baudinii</i> ^p		

(3) Registrada como *G. spingerum*

Mosqueda-Cabrera, M. A., L. Carranza-Calderón, E. Sánchez-Miranda, R. J. Almeyda-Artigas, A. L. E. Catrillón-Rivera, y A. Palma-Ramos, 2000. Crecimiento y desarrollo de *Gnathostoma* spp. (Nematoda: Spirurida) in vitro de larva de tercer estadio temprano a tercer estadio avanzado y de tercero avanzado a adulta. Revista Latinoamericana de Microbiología. En XIV Congreso Nacional de Parasitología. Octubre, 42 (II), 166.

Almeyda-Artigas, R. J., y M. A. Mosqueda-Cabrera, 1994. Análisis de la distribución de las larvas del tercer estadio de *Gnathostoma* sp. (Nematoda, spiruridae) en la musculatura de peces dulceacuicolas y estuarinos de México, Ecuador y Japón. Resúmenes del IV Congreso Nacional de Ictiología. Sociedad Ictiología Mexicana, Morelia, Michoacán.

Osorio-Sarabia, D., y V. León-Régagnon, 2000. Avances en el estudio de la Gnatostomosis silvestre en la región de Acapulco, Guerrero. Revista Latinoamericana de Microbiología. En XIV Congreso Nacional de Parasitología. Guadalajara, Jalisco, Octubre, 2000, 42 (II) 59-60.

Almeyda-Artigas, R. J., M. A. Mosqueda-Cabrera, L. Carranza-Calderón, E. Sánchez-Miranda, y H. E. Ortiz-Nájera, 2001a. Análisis comparativo de larvas de tercer estadio avanzado de *Gnathostoma binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991 (Nematoda, Spirurida) aisladas de vertebrados de las costas del Golfo de México y del Océano Pacífico. En III Encuentro Nacional de Gnatostomiasis, Tépic, Nayarit, 21 y 22 de Septiembre, P 65.

Almeyda-Artigas, R. J., M. A. Mosqueda-Cabrera, L. Carranza-Calderón, y H. E. Ortiz-Nájera, 2001b. Hallazgo de *Gnathostoma binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991 (Nematoda Spirurida) en vertebrados de la Reserva de la Biosfera "Pantanos de Centla", Tabasco, México. En: III Encuentro Nacional de Gnatostomiasis, Tépic, Nayarit, 21 y 22 de Septiembre P 69.

Ortiz-Najera H. E., M. A. Mosqueda-Cabrera, L. Carranza-Calderón y R. J. Almeyda-Artigas. Hallazgo de la forma adulta de *Gnathostoma binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991 (Nematoda Spirurida) en *Canis familiaris* de la Reserva de la Biosfera "Pantanos de Centla", Tabasco. En: Memorias del XVI Congreso Nacional de Zoología. Del 28 de Octubre al 1 de Noviembre. Zacatecas, Zacatecas, México.

Ortiz-Camacho, S. P. 1998. Estudio epidemiológico y clínico sobre la gnatostomiasis en Sinaloa, México. Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina y Laboratorio de Microbiología y Parasitología. U.N.A.M. 96pp.

Tabla II. Registro de las especies del género *Gnathostoma* (Owen, 1836) en México (Continuación).

(^P= Hospedero Definitivo, ^C= Primer Hospedero Intermediario, ^I= Segundo Hospedero Intermediario, ^P= Hospedero paraténico)

<i>Gnathostoma</i> sp.	<i>Sus crofa</i> ^D	Temazcal Oax.	Lamothe-Argumedo, 1997
	<i>Trachemys scripta</i> ^P	Temazcal Oax	Lamothe-Argumedo, 1997
		P Cerro de Oro, Oax	
	<i>Staurotypus tripocatus</i> ¹	P Cerro de Oro, Oax.	Lamothe-Argumedo, 1997
	<i>Staurotypus salvanii</i> ¹		
	<i>Rana temporaria</i> ^P		
	<i>Ictalurus meridionalis</i> ¹		
	<i>Crocodylus moreletii</i> ^P	P Cerro de Oro, Oax.	Lamothe-Argumedo, 1997
	<i>Cichlasoma salvanii</i> ¹		
	<i>Philander opossum</i> ^P		
	<i>Tigrisoma lineatum</i> ^P		
	<i>Pandion haliaetus</i> ^P		
	<i>Oreochromis aureus</i> ¹	P. Miguel Alemán, Oax.	Lamothe-Argumedo, 1997
	<i>Oreochromis</i> sp. ¹		
	<i>Oreochromis niloticus</i> ¹		
	<i>Ardea herodias</i> ^P		
	<i>Petenia splendida</i> ¹		
	<i>Cathorops fuerthii</i> ¹	L. Agua Brava, Nay.	Alvarez-Guerrero, 2000 ²⁶
	<i>Dormitator latifrons</i> ¹		
	<i>Pelecanus erythrorhynchus</i> ¹	L. Agua Brava, Nay.	Alvarez-Guerrero, 2000 ²⁷
	<i>Felis catus</i> ^D		
	<i>Ardea herodias</i> ^P		
	<i>Phalacrocorax olivaceus</i> ^P	L. La Pesca, Nay.	Alvarez-Guerrero, 2000 ²⁸
	<i>Petenia splendida</i> ¹	L. La Concha, Ver.	Lamothe-Argumedo, 1997
	<i>Cathorops fuerthii</i> ¹ ;	E. Rosamorada, Sin.	Díaz-Camacho, 1998 ²⁹
	<i>Felis catus</i> ^D		
	<i>Ardea herodias</i> ^P	D. Alhuate, Sin.	Díaz-Camacho, 1998 ³⁰
	<i>Pelecanus erythrorhynchus</i> ^P		
	<i>Pelecanus occidentalis</i> ^P		
	<i>Rana montezumae</i> ^P	R Usila, Oax.	Lamothe-Argumedo, 1997
	<i>Nerodia rhombifer</i> ^P	Tlacotalpan, Ver.	Lamothe-Argumedo, 1997
	<i>Rana berlandieri</i> ^P	Cosamaloapan, Ver.	Lamothe-Argumedo, 1997
	<i>Cichlasoma ellioti</i> ¹		
	<i>Centropomus parallelus</i> ¹	L. Alvarado, Ver.	Lamothe-Argumedo, 1997
	<i>Gobiomorus dormitor</i> ¹		

²⁶ Alvarez-Guerrero, C. 2000 Estudio de la gnathostomiasis en el estado de Nayarit. Tesis de Maestría en Ciencias Pecuarias. Universidad de Nayarit. 73pp

²⁹ Díaz-Camacho, S. P. 1998 Estudio epidemiológico y clínico sobre la gnathostomiasis en Sinaloa, México. Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina. Departamento de Microbiología y Parasitología. U.N.A.M. 96pp

Tabla II. Registro de las especies del género *Gnathostoma* (Owen, 1920) en México (Continuación).

(^P= Hospedero Definitivo, ^C= Primer Hospedero Intermediario, ^I= Segundo Hospedero Intermediario, ^P= Hospedero paratenico)

<i>Gnathostoma</i> sp	<i>Eleotris pictus</i> ¹	L. Tres Palos, Gro.	León-Règagnon <i>et al.</i> , 2000
	<i>Dormitator latrifrons</i> ¹		
	<i>Cichlasoma trimaculatum</i>		
	<i>Gobiomorus maculatus</i>		
	<i>Cathorops caerulescens</i>		
	<i>Rana forreri</i> ^P	L. Tres Palos, Gro.	Osorio y León-Règagnon, 2000 ³
	<i>Didelphis virginiana</i> ^D	Colonia el Ferrocarrilero, Col. Villahermosa, Tabs	Cruz-Reyes <i>et al.</i> , 1997 ³²
	<i>Rhamdia guatemalensis</i> ¹	Pa Centla, Tabs.	Lamothe-Argumedo, 1997
	<i>Belonesox belizanus</i> ¹	Pa Centla, Tabs.	López-Jiménez <i>et al.</i> , 2000
	<i>Heros managuensis</i> ¹		López-Jiménez <i>et al.</i> , 2000
	<i>Algansea lacustris</i> ¹	La Pátzcuaro, Mich.	Salgado-Maldonado <i>et al.</i> , 2001
	<i>Dormitator latrifrons</i> ¹	Sinaloa	Díaz-Camacho <i>et al.</i> , 2001 ³³
	<i>Cichlasoma beanii</i> ¹		
	<i>Eleotris picta</i> ¹		
	<i>Gobiomorus maculatus</i> ¹		
	<i>Arius spp.</i> ¹		
	<i>Oreochromis spp.</i> ¹		
	<i>Nycticorax nycticorax</i> ^P		
	<i>Egretta thula</i> ^P		
	<i>Phalacrocorax olivaceus</i> ^P		
	<i>Anhinga anhinga</i> ^P		
<i>Gnathostoma</i> sp. I	<i>Procyon lotor hernandezii</i>	Tlacotalpan, Ver.	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> , 2000 ⁽⁴⁾
<i>Gnathostoma</i> sp. II	<i>Philander opossum</i>	Tlacotalpan, Ver.	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> , 2000 ⁽⁵⁾

- (4) En Almeyda *et al.*, 1994, consideraron a esta especie como *G. procyonis*, sin embargo los datos moleculares arrojaron que se trata de una nueva especie del género, la cual no se ha descrito
- (5) Almeyda-Artigas *et al.* (2000), sugiere que es una nueva especie para el género, sin embargo no esta descrita

L = Laguna, La = Lago, P = Presa; R = Rio; D = Dique; E = Estero; B = Bahía; Pa = Pantanos.

¹ Osorio-Sarabia D., y V León-Regagnon 2000 Avances en el estudio de la Gnatostomosis silvestre en la region de Acapulco, Guerrero Revista Latinoamericana de Microbiología En XIV Congreso Nacional de Parasitología, Guadalajara, Jalisco Octubre, 2000, 42 (II): 59-60.

³² Cruz-Reyes, A., A Zepeda-Rodríguez, A Pérez-Torres y J. Banquera-Heredia, 1997, Hallazgo de un adulto de *Gnathostoma* sp (Nematoda Spirurida) en el estómago de *Didelphis virginiana* (Marsupialia Didelphidae) del municipio de Colima, Colima, Mexico En Resúmenes del I Encuentro México-Japón sobre Gnatostomiasis, Culiacan, Sinaloa, 12-13 de Septiembre

³³ Díaz-Camacho, S. P., E H Torres-Montoya., S. Sánchez-González., J Ríos-Sicarios., Ma del C de la Cruz-Otero., M L Zazueta-Ramos., S Bayliss-Gaxiola, y H Akahane 2001 Investigación de Hospederos naturales de *Gnathostoma* spp en Sinaloa, México En III Encuentro Nacional de Gnatostomiasis Tepic, Nayarit, 21 y 22 de Septiembre P 73

Existen cinco especies del género de las que se ha comprobado que producen la gnatostomosis humana alrededor del mundo siendo éstas *G. spinigerum* Owen, 1836, *G. hispidum* Fedtchenko, 1925, *G. nipponicum* Yamaguti, 1942, *G. doloresi* Tubangui, 1925 (Lamothe-Argumedo y Osorio-Sarabia, 1998; Díaz-Camacho, 1998³⁴), y *G. malayiase* Miyazaki y Dunn, 1965 (Nomura *et al.*, 2000).

Algunos autores señalaron a *G. spinigerum* como el posible responsable de la gnatostomosis humana en nuestro país (Peláez y Pérez-Reyes, 1970; Lamothe-Argumedo, 1997; Díaz-Camacho, 1998³⁵), sin embargo se ha puesto en duda la existencia de esta especie en México y en América, atribuyendo las infecciones humanas a *G. binucleatum* (Almeyda-Artigas, 1991; Almeyda-Artigas y Mosqueda-Cabrera, 1999³⁶; Almeyda-Artigas *et al.*, 2000), aun cuando autores como Vidal-Martínez *et al.* (2001), consideraron que *G. turgidum* podría estar involucrada en dichas infecciones.

En México esta enfermedad zoonótica ha cobrado importancia en las últimas décadas debido al incremento en su prevalencia (Lamothe-Argumedo y Osorio, 1998). Actualmente se han registrado más de 3 000 casos distribuidos en los estados de Veracruz, Guerrero, Oaxaca, Sinaloa, Tamaulipas, Tabasco y Nayarit, sin estar bien definida la identidad específica del agente etiológico (Díaz-Camacho, 1998³⁷; Lamothe-Argumedo y Osorio-Sarabia, 1998; Lamothe-Argumedo, 1999a, 1999b; Vargas-Ocampo *et al.*, 1998; Rojas-Molina *et al.*, 1999; Martínez-Cruz *et al.*, 1989; Lamothe-Argumedo, 2001³⁸), de aquí la importancia y trascendencia del estudio taxonómico de este estadio larvario.

2. 2. DATOS MORFOLOGICOS

Tradicionalmente, la taxonomía de las especies del género en su etapa L3A se ha basado en caracteres morfológicos, tales como las espinas cuticulares, que tienden a ser más pequeñas y más escasas conforme se alejan del bulbo cefálico (Akahane *et al.*, 1994), forma y número de ganchos en los anillos cefálicos, la diferencia entre el número de ganchos del anillo I-IV, el ancho y la longitud del esófago, ancho y longitud del intestino, la localización de la papila cervical, tamaño de las espinas del cuerpo, la longitud de los sacos cervicales, entre otros caracteres morfométricos importantes (Lamothe-Argumedo *et al.*, 1989; Almeyda-Artigas *et al.*, 1995; López-Jiménez y García-Magaña, 2000; Alvarez-Guerrero y Lamothe-Argumedo, 2000). Algunos autores se han basado en el número de núcleos del epitelio monoestratificado intestinal (Akahane *et al.*, 1986; Akahane y Iwata, 1997), por considerarlo de importancia taxonómica, sin embargo se ha observado que no tiene validez para la identificación de *G. binucleatum* (Akahane *et al.*, 1994). La diferenciación morfológica entre las especies del género en el tercer estadio avanzado es complicada y ha ocasionado controversia.

^{34, 35, 37} Díaz-Camacho, S P 1998 Estudio epidemiológico y clínico sobre la gnathostomiasis en Sinaloa, Mexico Tesis de Doctorado Facultad de Medicina Departamento de Microbiología y Parasitología U N A M 96pp

³⁶ Almeyda-Artigas, R J y M A Mosqueda-Cabrera 1999 Situación actual de la gnathostomosis en humana en América, con énfasis en los casos del estado de Guerrero México En Memorias del XIV Congreso Latinoamericano de Parasitología Del 11 al 16 de Octubre de 1999 Acapulco, Guerrero México

³⁸ Lamothe-Argumedo 2001 La Gnatostomiasis como problema de Salud Pública en México En III Encuentro Nacional de Gnathostomiasis Tepic, Nayarit. 21 de Septiembre P 13-16

Miyazaki (1966), mencionó que la cantidad de tapones polares en el huevo, la cantidad de hileras de ganchos en el bulbo cefálico, el arreglo y la forma de las espinas cuticulares en la superficie del cuerpo puede servir como una clave para la clasificación de los adultos en el género, sin embargo es difícil la identificación a nivel específico en los estadios larvarios y en particular en la larva L3A.

Otros autores han detectado una variación en algunos caracteres taxonómicos considerados de importancia, como el número de ganchos, su forma y en el número de núcleos de las células intestinales (Daengsvang, 1980, Akahane y Mako, 1987; Akahane *et al.*, 1994; Akahane *et al.*, 1995; Almeyda-Artigas *et al.*, 1995; Almeyda-Artigas y Mosqueda-Cabrera, 2000³⁹), variación geográfica (Akahane *et al.*, 1986), o bien, variación intraespecífica en infecciones en hospederos experimentales (Rojekittikhun y Pubampen, 1998).

Estas variaciones han dado pie a algunos autores para sugerir la existencia de nuevas formas o especies del género (Lamothe-Argumedo *et al.*, 1989; Akahane *et al.*, 1995; López-Jiménez y García-Magaña, 2000; Alvarez-Guerrero y Lamothe-Argumedo, 2000; Akahane *et al.*, 1995; Setasuban *et al.*, 1991).

A pesar de la controversia existente, la variabilidad intraespecífica en el género *Gnathostoma*, ha sido poco estudiada.

Rojekittikhun y Pubampen (1998), realizaron el primer trabajo dirigido al estudio de la variación morfológica de las larvas L3A. Estos autores observaron variaciones morfológicas y anomalías en los ganchos del bulbo cefálico de 1000 larvas de *G. spinigerum*, obtenidas a partir de la infección en ratones, donde se evidenció la presencia de varios tipos morfológicos. Lo más común fue un gancho rudimentario extra posterior a las cuatro hileras de ganchos (10.8%), la presencia de una quinta hilera de ganchos (1.9%), ganchos anormales en solo una de las cuatro hileras (1.2%), ganchos lobulados o bifurcados (0.5%), arreglo en espiral de las cuatro hileras de ganchos (0.4%), y ganchos fragmentados (0.4%). En este estudio, el 0.5 % de L3A de *G. spinigerum* presentaron un tipo lobulado o bifurcado en los ganchos del bulbo el cual era muy similar a lo descrito por Setasuban *et al.* (1991) y Akahane *et al.* (1995), como un nuevo tipo morfológico de L3A de *Gnathostoma*.

3. LA VARIACIÓN

La variación es uno de los elementos fundamentales del proceso evolutivo de los seres vivos, y se ha estudiado desde diferentes enfoques: morfológico, morfométrico, cariológico y molecular (Santos y Hortelano, 1997). Los estudios sobre la variación buscan la resolución de problemas taxonómicos, conservación, biogeografía y coevolución (Chilton *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1997; Verneau *et al.*, 1997; Jousson *et al.*, 1998;

Almeyda-Artigas, R. J. y M. A. Mosqueda-Cabrera. 2000 Hallazgo de *Gnathostoma binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991 y *G. turgidum* Stossich, 1902 (Nematoda Spirurida) en carnívoros y marsupiales del Pacífico mexicano Revista Latinoamericana de Microbiología En XIV Congreso Nacional de Parasitología Octubre, 42 (II) 161-162

Guidici *et al.*, 1999). Los estudios de variación intrapoblacional son de gran importancia para el desarrollo de un sistema de clasificación biológica, ya que para elaborar éste se necesita un amplio conocimiento del grado de variación que puede presentar un taxón (Santos y Hortelano, 1997).

Las técnicas para el estudio de la variación se han abordado desde diversos aspectos a lo largo del tiempo, como resultado de los avances tecnológicos y científicos: uso de computadoras, desarrollo de técnicas de análisis estadístico de datos de todo tipo, técnicas moleculares (Nadler, 1990; Monis, 1999), etc.

En el caso particular de los helmintos, se han aplicado técnicas de análisis estadístico sobre datos morfométricos que son fuente importante de datos taxonómicos en todos los grupos, en la búsqueda de elucidar problemas taxonómicos (Amin, 1986; Shostak *et al.*, 1987; Georgi y McCulloch, 1989; Mo, 1991; Bray y Des Clers, 1992; Pérez-Ponce de León, 1995; Guidici *et al.*, 1999; Cabaret y Hoste, 1998; Cabaret y Schmidt, 2001; Jousson y Bartoli, 2001). Asimismo, se ha tratado de dar respuestas a algunos problemas taxonómicos a través del uso de cariotipos (Bullini *et al.*, 1978; Spakulová y Casanova, 1998), y posteriormente se utilizaron técnicas de bandeado guanina (G) y citosina (C). Con el desarrollo de las técnicas moleculares, se han realizado estudios electroforéticos de proteínas para evaluar la variación intrapoblacional (Agatsuma y Habe, 1985; Andrews *et al.*, 1988; Lymbery y Thompson, 1988; Wongkham *et al.*, 2000), y más recientemente se han incrementado este tipo de estudios gracias al conocimiento de la estructura y propiedades de los ácidos nucleicos, alrededor de los cuales se han desarrollado diversas técnicas para su análisis y manipulación, tal como la hibridación (Zaralega *et al.*, 1994; Cunningham *et al.*, 1995; Vernau *et al.*, 1997), uso de enzimas de restricción (Vernau *et al.*, 1997; Andrews y Chilton, 1999), así como secuenciación de ADN y ARN (Bowles y McManus, 1994; Morgan y Blair, 1998; McDonnell *et al.*, 2000; Mac Manus y Bowles, 1996). En la actualidad un gran número de los estudios que intentan resolver problemas filogenéticos y taxonómicos, emplean técnicas de biología molecular (Qu *et al.*, 1986; Nadler, 1992; Chilton *et al.*, 1995; Littlewood y Johnston, 1995; Stevenson *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1997, 1999; Blair *et al.*, 1998; León-Régagnon *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2000).

2.4. DATOS MOLECULARES NUCLEARES

Recientemente se ha desarrollado un gran número de estudios moleculares basados primariamente en el estudio directo o indirecto de las secuencias del ADN. Se ha observado que en el ADN ribosomal, hay regiones que evolucionan lentamente y otras rápidamente, proveyendo ventajas para el estudio sistemático de los organismos (Unnasch y Zimmerman, 1995). Los genes ribosomales codifican para moléculas del rARN y están presentes en el genoma nuclear de todos los eucariontes (Figura 2); están subdivididos en tres regiones codificantes (gen 18s, 5.8s y 28s) y en cuatro regiones no codificantes o espaciadores (espaciador transcrito externo o ETS (localizado antes del gen 18s) y los espaciadores transcritos internos o ITS (el ITS-1 se localiza entre el gen 18s y el 5.8s; ITS-2 se encuentra entre el gen 5.8s y 28s), y el espaciador no transcrito o NTS (llamado IGS- Intergenic Spacer) (Hillis *et al.*, 1996).

NTS	ETS	18s	ITS-1	5.8s	ITS-2	28s
-----	-----	-----	-------	------	-------	-----

Figura 2. Mapa del rADN nuclear (tomado de Hillis *et al.*, 1996).

Los datos de las secuencias de nucleótidos representan un gran potencial para las investigaciones taxonómicas y filogenéticas en todos los grupos taxonómicos, incluyendo a los nemátodos (Nadler, 1992; Hitch *et al.*, 1995). Los estudios filogenéticos basados en el estudio del gen 18s rARN en su mayoría han resultado congruentes con los datos morfológicos, del ciclo de vida y biogeográficos (Liu *et al.*, 1997), haciendo más robustas las clasificaciones existentes. Dentro de las regiones no codificantes se han utilizado las regiones ITS-1 e ITS-2 (~400 a 480 pb) para distinguir parásitos congénericos y a menudo indistinguibles morfológicamente (Almeyda-Artigas *et al.*, 2000; Campbell *et al.*, 1995; Chilton *et al.*, 1995, 1997; Hoste *et al.*, 1993, 1995, 1998; León-Règagnon *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999; Nadler, 1990, 1992; Nadler *et al.*, 1995; Powers *et al.*, 1997).

Almeyda-Artigas *et al.* (2000), han demostrado la utilidad de las secuencias de ADN para la diferenciación de especies de *Gnathostoma*. Estos autores utilizaron la región ITS-2 (421 - 427pb), como un marcador molecular eficaz para diferenciar a *G. spinigerum* de Tailandia, *G. binucleatum* de México, *G. turgidum* de Ecuador y *G. procyonis* de México, las cuales son morfológicamente muy similares. En la Tabla III se enlistan los números de acceso de las secuencias de *Gnathostoma* spp. disponibles en Genbank.

Tabla III. Secuencias de *Gnathostoma* registradas en Genbank (Almeyda-Artigas *et al.*, 2000; Kuramochi, datos no publicados; Uparanukrawl *et al.*, 2001).

Especie	ITS-2	18s, V4	5.8 s	18s	COI	MMP
<i>G. turgidum</i>	Z97176 *		AJ243253	Z96948		
<i>G. spinigerum</i>	Z97175	AJ005274	AJ243252		BAA89707	AAF82802
<i>G. binucleatum</i>	Z97072		AJ243251	Z96946	BAA89706	
<i>Gnathostoma</i> sp	Z97173		AJ249464			
<i>Gnathostoma</i> sp	Z97292		AJ243255			
<i>Gnathostoma</i> sp			AJ243254			
<i>G. oligomucronatum</i> **		AJ005275				
<i>G. neoprocyonis</i> **				Z96947		

*Esta clave corresponde al número de acceso; COI = Citocromo Oxidasa subunidad 1, MMP = Matrix Metalloproteinasas-like Protein.

** Estas especies se no se han descrito.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El reciente registro de las larvas del tercer estadio de *Gnathostoma* sp. en los peces de importancia comercial de la Laguna de Tres Palos (León-Régagnon *et al.*, 2000), así como la utilización de la región ITS-2 como un buen marcador para la diferenciación de las especies de *Gnathostoma* en América (Almeyda-Artigas *et al.*, 2000), llamó nuestra atención, hacia el estudio de la variación intraespecífica a nivel morfológico y molecular de las larvas del tercer estadio de *Gnathostoma* sp., en esta localidad; utilizando tales herramientas pretendemos contribuir al esclarecimiento de la taxonomía de las larvas del tercer estadio avanzado de este nemátodo, así como al estudio de la helmintofauna de esta zona.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL :

- Estudiar la variación morfológica y molecular de las larvas del tercer estadio avanzado de *Gnathostoma* sp. de cinco especies de peces de la Laguna de Tres Palos, Gro.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES:

- Realizar un estudio morfológico comparativo de las larvas del tercer estadio avanzado de *Gnathostoma* sp. recuperadas a partir de cinco especies de peces de la Laguna de Tres Palos, Gro.
- Obtener y comparar las secuencias de nucleótidos de la región ITS-2 de las larvas del tercer estadio avanzado de *Gnathostoma* sp. de cinco especies de peces de la Laguna de Tres Palos, Gro.
- Evaluar la validez de diversos caracteres morfológicos para el estudio taxonómico de las larvas del tercer estadio avanzado de *Gnathostoma* sp.

5. ÁREA DE ESTUDIO

El presente trabajo se llevó al cabo en la Laguna de Tres Palos, ubicada en la planicie costera del Estado de Guerrero, al sureste de Acapulco, entre el Río Papagayo (este) y el Río Sabana (oeste) y al sur con el Océano Pacífico, entre los paralelos 16° 41' a 16° 50' de latitud norte y los meridianos 99° 37' a 99° 47' de longitud oeste (Figura 3). Se encuentra a 35 Km, al sureste del Puerto de Acapulco, sobre la carretera Acapulco-Barra Vieja (Diego-Pérez y Lozada-Pérez, 1994; Yáñez-Arancibia, 1978).

La comunicación de la laguna con el mar es por medio de un canal sinuoso con ondulaciones meándricas de aproximadamente 10 km de longitud y por la barra que abre en forma periódica. La salinidad de la laguna es de 1.21 – 4.57 0/00, de tipo oligohalino y varía con la época del año (Guzmán, 1987⁴⁰).

⁴⁰ Guzmán M. 1987 Biología, ecología y pesca del Langostino *Macrobrachium tenellum* en lagunas costeras del Estado de Guerrero Tesis Doctoral UNAM P 7-16

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El reciente registro de las larvas del tercer estadio de *Gnathostoma* sp. en los peces de importancia comercial de la Laguna de Tres Palos (León-Règagnon *et al.*, 2000), así como la utilización de la región ITS-2 como un buen marcador para la diferenciación de las especies de *Gnathostoma* en América (Almeyda-Artigas *et al.*, 2000), llamó nuestra atención, hacia el estudio de la variación intraespecífica a nivel morfológico y molecular de las larvas del tercer estadio de *Gnathostoma* sp., en esta localidad; utilizando tales herramientas pretendemos contribuir al esclarecimiento de la taxonomía de las larvas del tercer estadio avanzado de este nemátodo, así como al estudio de la helmintofauna de esta zona.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL :

- Estudiar la variación morfológica y molecular de las larvas del tercer estadio avanzado de *Gnathostoma* sp. de cinco especies de peces de la Laguna de Tres Palos, Gro.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES:

- Realizar un estudio morfológico comparativo de las larvas del tercer estadio avanzado de *Gnathostoma* sp. recuperadas a partir de cinco especies de peces de la Laguna de Tres Palos, Gro.
- Obtener y comparar las secuencias de nucleótidos de la región ITS-2 de las larvas del tercer estadio avanzado de *Gnathostoma* sp. de cinco especies de peces de la Laguna de Tres Palos, Gro.
- Evaluar la validez de diversos caracteres morfológicos para el estudio taxonómico de las larvas del tercer estadio avanzado de *Gnathostoma* sp.

5. ÁREA DE ESTUDIO

El presente trabajo se llevó al cabo en la Laguna de Tres Palos, ubicada en la planicie costera del Estado de Guerrero, al sureste de Acapulco, entre el Río Papagayo (este) y el Río Sabana (oeste) y al sur con el Océano Pacífico, entre los paralelos 16° 41' a 16° 50' de latitud norte y los meridianos 99° 37' a 99° 47' de longitud oeste (Figura 3). Se encuentra a 35 Km, al sureste del Puerto de Acapulco, sobre la carretera Acapulco-Barra Vieja (Diego-Pérez y Lozada-Pérez, 1994; Yáñez-Arancibia, 1978).

La comunicación de la laguna con el mar es por medio de un canal sinuoso con ondulaciones meándricas de aproximadamente 10 km de longitud y por la barra que abre en forma periódica. La salinidad de la laguna es de 1.21 – 4.57 ‰, de tipo oligohalino y varía con la época del año (Guzmán, 1987⁴⁰).

⁴⁰ Guzmán, M 1987 *Biología, ecología y pesca del Langostino *Macrobranchium tenellum* en lagunas costeras del Estado de Guerrero* Tesis Doctoral UNAM P 7-16

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El reciente registro de las larvas del tercer estadio de *Gnathostoma* sp. en los peces de importancia comercial de la Laguna de Tres Palos (León-Règagnon *et al.*, 2000), así como la utilización de la región ITS-2 como un buen marcador para la diferenciación de las especies de *Gnathostoma* en América (Almeyda-Artigas *et al.*, 2000), llamó nuestra atención, hacia el estudio de la variación intraespecífica a nivel morfológico y molecular de las larvas del tercer estadio de *Gnathostoma* sp., en esta localidad; utilizando tales herramientas pretendemos contribuir al esclarecimiento de la taxonomía de las larvas del tercer estadio avanzado de este nemátodo, así como al estudio de la helmintofauna de esta zona.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL :

- Estudiar la variación morfológica y molecular de las larvas del tercer estadio avanzado de *Gnathostoma* sp. de cinco especies de peces de la Laguna de Tres Palos, Gro.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES:

- Realizar un estudio morfológico comparativo de las larvas del tercer estadio avanzado de *Gnathostoma* sp. recuperadas a partir de cinco especies de peces de la Laguna de Tres Palos, Gro.
- Obtener y comparar las secuencias de nucleótidos de la región ITS-2 de las larvas del tercer estadio avanzado de *Gnathostoma* sp. de cinco especies de peces de la Laguna de Tres Palos, Gro.
- Evaluar la validez de diversos caracteres morfológicos para el estudio taxonómico de las larvas del tercer estadio avanzado de *Gnathostoma* sp.

5. ÁREA DE ESTUDIO

El presente trabajo se llevó al cabo en la Laguna de Tres Palos, ubicada en la planicie costera del Estado de Guerrero, al sureste de Acapulco, entre el Río Papagayo (este) y el Río Sabana (oeste) y al sur con el Océano Pacífico, entre los paralelos 16° 41' a 16° 50' de latitud norte y los meridianos 99° 37' a 99° 47' de longitud oeste (Figura 3). Se encuentra a 35 Km, al sureste del Puerto de Acapulco, sobre la carretera Acapulco-Barra Vieja (Diego-Pérez y Lozada-Pérez, 1994; Yáñez-Arancibia, 1978).

La comunicación de la laguna con el mar es por medio de un canal sinuoso con ondulaciones meándricas de aproximadamente 10 km de longitud y por la barra que abre en forma periódica. La salinidad de la laguna es de 1.21 – 4.57 ‰, de tipo oligohalino y varía con la época del año (Guzmán, 1987⁴⁰).

⁴⁰ Guzman, M 1987 Biología, ecología y pesca del Langostino *Macrobranchium tenellum* en lagunas costeras del Estado de Guerrero. Tesis Doctoral UNAM P 7-16

Los suelos aluviales de textura arenosa son muy permeables y los suelos de litoral están resesados en la barra arenosa, expuesta al mar y al suelo lacustre con inundaciones periódicas, al oeste de la una, en contacto directo con los suelos de aluvión y litoral, el sedimento está constituido por limo y limonoso, el limo es de color pardo de características hidratantes con fuerte olor a ácido sulfhídrico (Contreras, 1985). La zona pertenece a la región hidrológica de Costa Grande; la principal fuente de agua dulce a la laguna de Palos es el río Las Sabanas (Diego-Pérez y Lozada-Pérez, 1994). La laguna presenta una forma subcircular elíptica, la cual mide 15.85 km de longitud máxima y 5.585 km de ancho máximo, con una profundidad de 1 m a 7 m máximo. El sistema se localiza en una zona tropical y el clima es de tipo caliente subhúmedo, el promedio entre el más seco y húmedo de los subhúmedos, con lluvia en verano y sequías en invierno.

La temperatura promedio anuales de 22°C, 28°C la máxima y 18 °C la mínima. La precipitación promedio anual es de 1200 mm (García, 1981).

La vegetación subacuática está representada por tres tipos, en el primer tipo están las hidrófitas libres y flotantes compuesta por las especies de *Azolla caroliniana*, *Pistia stratiotes*, *Lemna minuscula*, *Nymphaea ampla* y *Eichhornia crassipes*, el segundo tipo están representadas por las hidrófitas arraigadas con hojas flotantes se encuentra *Nymphaea banda*, *Ludwigia peploides* y *Neptunia plena*, y dentro del tercer tipo encontramos a las hidrófitas arraigadas sumergidas; que son *Utricularia foliosa*, *U. gibba* y *Najas adalupensis* (Diego-Pérez y Lozada-Pérez, 1994).

La fauna del macrobentos está integrada por *Macrobrachium tenellum*, *Pennaeus* spp., algunos cangrejos y jaibas *Callinectes toxotes* y *C. arcuatus*; la zooplanctónica está compuesta por ciliados, sarcodinos, rotíferos, nauplios, larvas zoea de cangrejo, anélidos, nemátodos, moluscos (véliges), celenterados y larvas de peces (Contreras, 1985); así como microcrustáceos: cladóceros, ostrácodos, copépodos, isópodos y anfípodos. Aunque algunos de ellos no son parte de las comunidades zooplánctónicas, pero pueden ser colectados por el somero de las aguas y también están presentes larvas de algunos insectos como *Chironomus* sp. y *Chironomus meigeni* así como *Cirolana* sp. (isópoda). La ictiofauna registrada la integran *Elops affinis*, *Lilechalcus olifera*, *Achovia macrolepidota*, *Chanos chanos*, *Astynax dasciatus*, *Ariopsis guatemalensis*, *Poecilia reticulata*, *Poeciliopsis lucida*, *P. porosus*, *P. balsas*, *Thyrinops crystallina*, *Centropomus robalito*, *Caranx ruber*, *Oligoplites saurus*, *Lutjanus guttatus*, *Diapterus peruvianus*, *Gerres cinereus*, *Eugerres lineatus*, *E. lineatus*, *Eucimostomus currani*, *Cichlasoma trimaculatum*, *Tilapia mossambica*, *Mugil cephalus*, *M. curema*, *Eleotris picta*, *Gobiomorus maculatus*, *Dormitator latifrons*, *Microgobius microflourensensis*, *Gobionellus* sp., *G. sagittula* y *Achirus mazatlanus* (Yáñez-Arancibia, 1978).

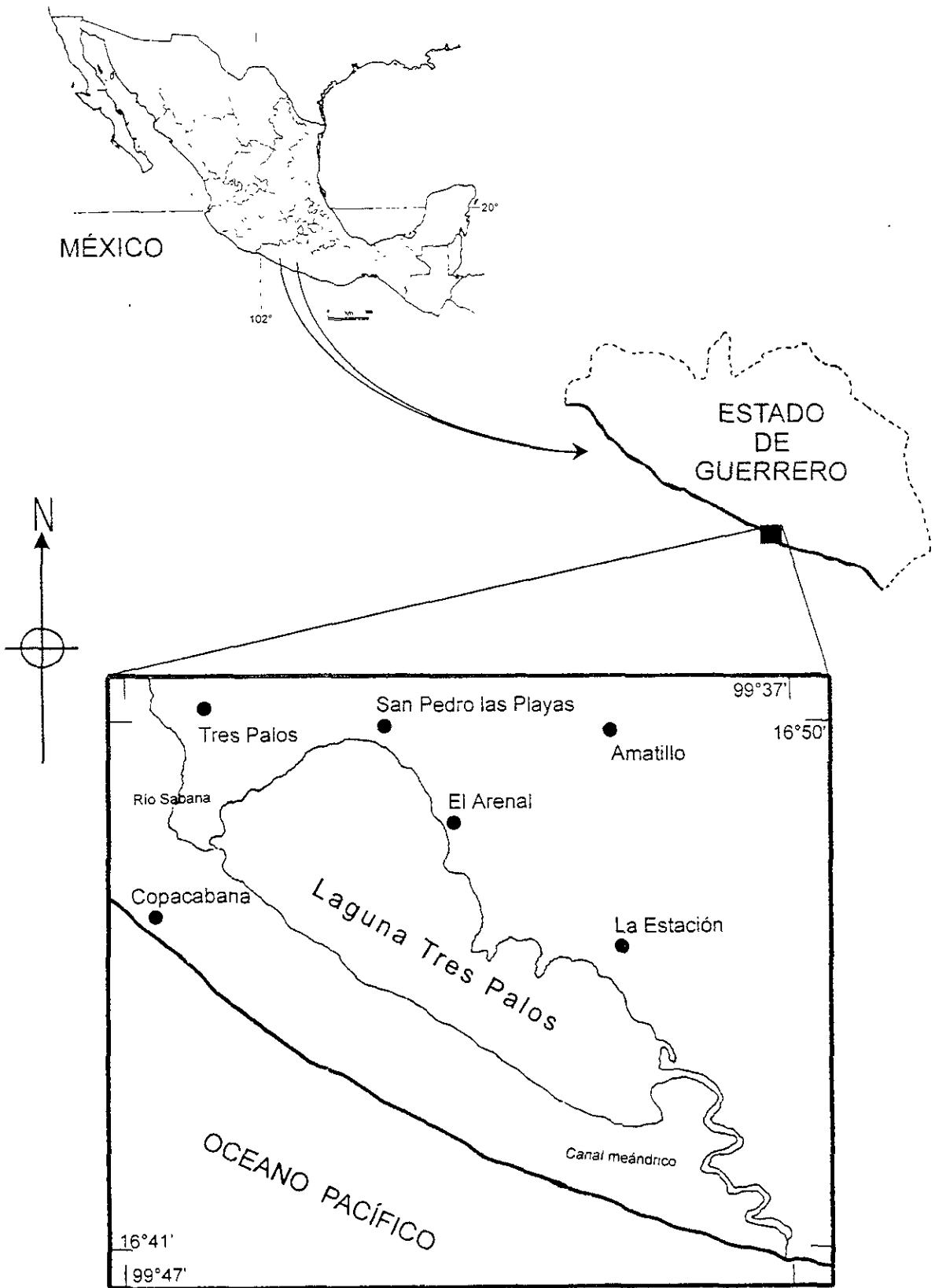


Figura 3. Localización de la Laguna de Tres Palos, Gro.

La herpetofauna de las costas del estado de Guerrero está representada por *Bufo marmoratus*, *Rana berlandieri*, *Rana forreri*, *Rana sweifeli*, *Hyla eximia*, *Leptodactylus labialis*, *Leptodactylus melanonotus*, *Stenosaurina pectinata*, *Iguana iguana*, *Loxocemus bicolor*, *Crotalus durussus* y *Agkistrodon bilineatus*, siendo estas dos últimas de importancia en salud pública; asimismo existen algunas especies de importancia económica como *Crocodylus acutus*, *Chelonia agassizi*, *Lepidochelys olivacea*, (Casas y Reyna, 1990a, 1990b, 1990 c; Pérez et al., 2000).

La avifauna en las costas del estado de Guerrero está representada por un gran número de especies entre las que destacan, *Jacana spinosa* (Jacana), *Larus atricilla*, *L. delawarensis* (gaviotas), *Sterna nilotica*, *S. caspia*, *S. forsteri*, *S. antillarum* (golondrinas marinas), *Anas crecca*, *Anas acuta*, *Oxyura jamaicensis* (patos), *Phalacrocorax brasilianus* (cormoranes), *Pelecanus erythrorhynchus* (pelícanos), *Cathartes aura*, *Coragyps atratus* (zopilotes), *Geranoospiza caerulescens* (gavilanes), *Camptostoma imberbe*, *Myiarchus tuberculifer*, *Calocitta formosa*, *Thyothorus sinaloa*, *Parula pitiayumi* (Pesseriformes) (Howell y Webb, 1995), así como por la Familia Trochilidae (colibríes), Troglodytidae (saltaparedes) (Márquez y Ornelas, 1990; Márquez, 1990),

La mastofauna está representada por tlacuaches, musarañas, murciélagos, mono araña, osos hormigueros, armadillos, conejos, liebres, ardillas terrestres, ardillas arborícolas, tuzas, ratones espinosos, ratas y ratas de campo, metoritos, puerco espines, coyotes, zorras grises, cacomistles, coatíes, martuchas, mapaches, cabeza de viejo, grisonos, comadrejas, zorrillos, nutrias, pumas, ocelotes, margayes, jaguarundis, jaguares, jabalíes, temazates y venados (Ramírez y Castro, 1990; Müdespancher y Ramírez, 1990a, 1990 b).

El área que comprende la Laguna de Tres Palos es un lugar de condiciones socio-económicas precarias, donde sus principales actividades son la agricultura y la pesca, en esta última las principales especies explotadas entre los peces son la mojarra, charra, robalo, lisa, malacapa, alahuate, cuatete, pijolín, guavina, popoyote, tilapia y entre los crustáceos esta el camarón blanco y el chacal, (Yokoyama, 1981⁴¹).

⁴¹ Yokoyama, A 1981 La comunidad de aves acuáticas nidificantes de la laguna de Tres Palos. Guerrero: un ejemplo de la problemática de recursos naturales en México Tesis Profesional Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se efectuaron muestreos de los peces a partir de la captura comercial en el poblado San Pedro las Playas, en los meses de marzo, mayo, agosto, octubre, diciembre de 1999 y en junio del 2000. Los pescadores de la laguna utilizaron diversos artes de pesca (red agallera, chinchorro, atarraya y anzuelo).

Se colectaron ejemplares de cinco especies de peces: *Dormitator latifrons* “popoyote”; *Eleotris picta* “calahuate”; *Gobiomorus maculatus* “guavina”; *Ariopsis guatemalensis* “cuatete” y *Cichlasoma trimaculatum* “charra”, de la Laguna de Tres Palos, Gro., los cuales se conservaron en refrigeración hasta su revisión, dentro de las 36 hrs. siguientes a su captura. El tejido muscular se molió y presionó entre dos vidrios para su revisión a contraluz. Se extrajeron de la musculatura las larvas del tercer estadio avanzado que fueron colocadas en solución salina al 0.65%. A continuación las larvas se desenquistaron con agujas entomológicas y se fijaron en alcohol etílico al 70% o formol 4% caliente y se conservaron en alcohol 70%, para su estudio morfológico. Se fijaron algunos ejemplares en etanol absoluto para su estudio molecular.

1. Estudio morfológico-estadístico.

Las larvas del tercer estadio avanzado de *Gnathostoma* se aclararon con lactofenol de Amman y/o glicerina y se montaron temporalmente; su estudio morfométrico se efectuó mediante microscopía de luz y un ocular micrométrico. En la redescipción se señalan la medida mínima, máxima y entre paréntesis el promedio expresándose en mm excepto cuando se indique otra unidad de medida (Apéndice 1). Los dibujos se realizaron con ayuda de una cámara clara adaptada a un microscopio óptico compuesto marca Zeiss modelo 4290995.

Se tomaron microfotografías de las larvas del tercer estadio avanzado con un equipo fotográfico digital Kodak DC120 y/o con una cámara de 35mm marca Pentax Zx-M, adaptada al microscopio óptico compuesto.

Para la identificación de los organismos a nivel genérico se utilizaron claves como Yamaguti (1961) y Chabaud *et al.*, (1978), y a nivel específico, se comparó con las descripciones originales y literatura especializada de las especies del género.

Las larvas L3A se aclararon en glicerina, para identificar morfotipos (6), con base en la forma del los ganchos del bulbo cefálico.

Utilizando los datos morfológicos se estudió la variación de las larvas del tercer estadio avanzado de *Gnathostoma* sp., por medio del análisis multivariado de componentes principales en el programa STATISTICA versión 4.5, obteniéndose los coeficientes de correlación entre los distintos caracteres morfométricos para seis morfotipos (Apéndice 1), con un nivel de confiabilidad del 95%. Se obtuvieron los valores propios (eigenvalores) para los cuatro primeros componentes principales y se graficaron los componentes que explicaron el mayor porcentaje de variación de los caracteres morfométricos.

Con el fin de detectar aquellos caracteres que aportan variación, se realizó un análisis estadístico univariado (ANOVA), a partir de una matriz de 36 caracteres morfométricos y 6 tipos morfológicos ($n=69$), usando el programa STADISTICA versión 4.5, y con un nivel de confiabilidad del 95%.

El material helmintológico recolectado se depositó en la Colección Nacional de Helmintos, Instituto de Biología, UNAM (CNHE).

5. 2. Estudio molecular

Se realizó la identificación de los morfotipos de las larvas L3A, con base en la forma de los ganchos del bulbo cefálico, aclarándolas en glicerina, previo a la extracción de ADN. Se extrajo el ADN genómico de las 12 larvas del tercer estadio avanzado fijadas en etanol absoluto y 3 en OH 70%, por medio de la técnica de extracción fenol/cloroformo que se describe a continuación: el tejido de los helmintos se incubó individualmente en tubos de microfuga, con proteinasa K, SDS (duodecil sulfato de sodio) y buffer STE, a 50°C por 3 horas. Posteriormente, el ADN se extrajo con dos cambios de fenol y uno de cloroformo: alcohol isoamílico (Hillis *et al.*, 1996). A partir de 9 larvas L3A fijadas en formol 4%, se extrajo el ADN acorde con la técnica propuesta por Chatigny (2000).

Se amplificó la región ITS-2, ya que de acuerdo a estudios previos (Almeyda-Artigas *et al.*, 2001), es de utilidad para distinguir parásitos congénicos indistinguibles morfológicamente. Esta región comprende un total de 421 - 427pb.

La amplificación se realizó en un volumen final de 25 μ l utilizando los oligonucleótidos BD1 (forward) 5'-GTCGTAACAAGGTTTCCGTA-3' y BD2 5'-TATGCTTAAATTCAGCGGGT-3' (Luton *et al.*, 1992); así como ITS-2 NEWS2 (forward) 5'-TGTGTCGATGAAGAACGCAG-3' e ITS-2- RIXO (Reverse) 5'-TTCTATGCTTAAATTCAGGGG-3' (Gasser y Hoste, 1995).

La reacción en cadena de la polimerasa (Palumbi, 1996), se llevó a cabo con el siguiente programa:

1.- 94°C	1 minuto
2.- 92°C	30 segundos
3.- 55 °C	30 segundos
4.- 72° C	1 minuto y 30 segundos
+0.0°	+ 1 minuto
R= 3°C/s	+ 0.0°/s
G= 0.0°	
5.- repetir 35 veces a partir del 2	
6.-72 °C	1 minuto y 30 segundos
7.- 4°C	24 horas.

Los productos obtenidos se analizaron en un gel de agarosa al 1% en buffer TAE (Temed, ácido acético y EDTA), y se compararon con un marcador de peso molecular de 1Kb.

El producto de la PCR se purificó con el kit Quiaquick (Quiagen) y se llevó al cabo la reacción de secuencia (Sanger *et al.*, 1977). Este método utiliza un templado de ADN de cadena sencilla (csADN), un oligonucleótido, Taq polimerasa para sintetizar la cadena complementaria del templado y deoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) más un dideoxirribonucleótido trifosfatado terminador (ddNTP), marcados con fluorescencia. La polimerasa sintetiza la cadena complementaria y al incorporar un ddNTP, la cadena deja de sintetizarse, ya que este nucleótido carece del grupo 3' hidroxilo necesario para la unión fosfodiéster (Balbás y Bolívar, 1989). La proporción del ddNTP con el dNTP correspondiente es tal, que la polimerasa incorpora un ddNTP por lo menos una vez en cada posición donde aparece el nucleótido complementario en el templado. Al final de la reacción, cada uno de los nucleótidos está marcado con fluorescencia de diferente color. El producto obtenido se purificó con columnas Centrisep. La terminación de cada fragmento se detectó con un Secuenciador automático marca Perkin- Elmer modelo 310 Genetic Analyzer.

Las secuencias obtenidas de las larvas del tercer estadio avanzado de *Gnathostoma* sp., se analizaron y alinearon usando el programa computacional Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), y se ajustaron manualmente utilizando el programa ESEE (Cabot and Beckenbach, 1989). Estas secuencias se alinearon a su vez con aquellas registradas en Genbank para su comparación. Se calculó el porcentaje de variación de las secuencias entre cada muestra y con respecto a las secuencias obtenidas de Genbank, elaborándose una matriz de similitud utilizando el programa PAUP versión 4.0b8 (Swofford, 1998).

7. RESULTADOS

Los resultados se presentan dos secciones, estudio morfológico-estadístico y molecular. En la Tabla IV, se presenta el número de larvas L3A de *Gnathostoma* sp., utilizadas en cada uno de los estudios. Dentro del estudio morfológico se detectó la presencia de seis morfotipos, los cuales se diferencian en la forma de los ganchos del bulbo cefálico (que es de importancia taxonómica, según Miyazaki (1960); Rojekkittikhun y Pubampen (1998)), de las cuales se obtuvieron sus medidas. Se elaboró un análisis de componentes principales (únicamente con 18 caracteres y 69 larvas L3A de *Gnathostoma*), y posteriormente se realizó un análisis estadístico univariado (ANOVA) (36 caracteres y 6 morfotipos de *Gnathostoma*).

En el estudio molecular se caracteriza a la región ITS-2 en larvas L3A de *Gnathostoma*, de los morfotipos 1, 2 y 3; se obtuvieron ~427pb., de cada larva L3A procedentes de las cinco especies de peces que resultaron positivas a la infección en la Laguna de Tres Palos, Gro. (Figura 4). Las secuencias fueron analizadas y alineadas mediante el programa CLUSTAL W, y se ajustaron manualmente utilizando el programa ESEE, y se compararon con las secuencias presentes en Genbank; a partir de esto se obtuvo una matriz de similitud para observar el porcentaje de variación entre las secuencias.

Finalmente se presenta la redescrición de las larvas L3A de *Gnathostoma binucleatum*., presente en cinco especies de peces de la Laguna de Tres Palos, Guerrero.

Tabla IV. Relación del número de larvas L3A de *Gnathostoma* sp., utilizadas en el estudio morfológico-estadístico y molecular de las cinco especies que resultaron positivas a la infección en la Laguna de Tres Palos, Gro. (n= 81)

Hospedero	EMFR-E	EMOL
<i>Dormitator latifrons</i> "Popoyote"	11	1
<i>Eleotris picta</i> "Alahuate"	48*	6
<i>Gobiomorus maculatus</i> "Guavina"	3	2
<i>Ariopsis guatemalensis</i> "Cuatete"	5	2
<i>Cichlasoma trimaculatum</i> "Charra"	2	1
TOTAL	69	12

EMFR-E = Estudio morfológico y estadístico. EMOL =Estudio Molecular

* = se utilizaron 9 larvas de este estudio fijadas en Formol al 4% y 3 fijadas en OH 70%, para el estudio molecular

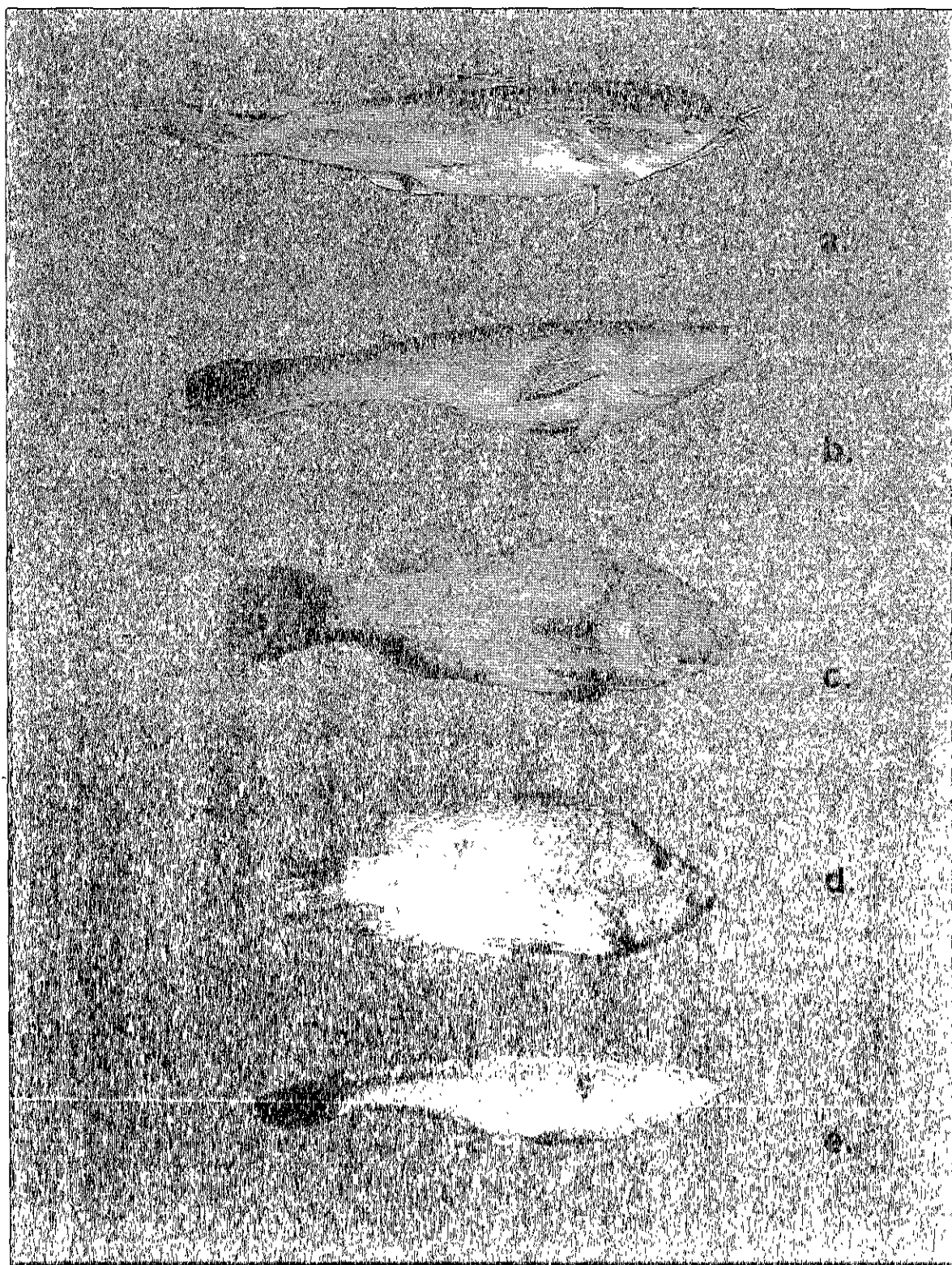


Figura 4. Especies de peces que resultaron positivos a la infección de *Gnathostoma* sp., en la Laguna de Tres Palos, Gro.: a. *Ariopsis guatemalensis* "Cuatete"; b. *Eleotris picta* "Alahuate"; c. *Dormitator latifrons* "Popoyote"; d. *Cichlasoma trimaculatum* "Charra"; e. *Gobiomorus maculatus* "Guayma".

7.1. ESTUDIO MORFOLÓGICO.

A lo largo de 6 muestreos durante los meses de marzo, mayo, agosto, octubre y diciembre de 1999, y junio del 2000, se encontró que cinco especies de peces resultaron positivas a la infección con las larvas del tercer estadio avanzado de *Gnathostoma* sp. (Figura 4): que corresponden a las siguientes, *Eleotris picta*, *Dormitator latrifrons*, *Gobiomorus maculatus* (Eleotriidae); *Cichlasoma trimaculatur* (Cichlidae) y *Ariopsis guatemalensis* (Ariidae).

Al realizar el estudio morfométrico de las 69 larvas, se detectó variación en la forma de los ganchos del bulbo cefálico y con base en este caracter fue posible distinguir seis morfotipos, asimismo se identificó qué morfotipo corresponden las 12 larvas utilizadas en el estudio molecular. Otra variación que se observó independiente de la forma de los ganchos, fue la presencia de ganchos adicionales a las hileras de ganchos del bulbo cefálico en tres morfotipos (Tabla V)

Tabla V. Proporción de ejemplares por cada uno de los morfotipos de larvas L3A de *Gnathostoma* sp estudiadas (n=81) Se indica el número de ganchos adicionales a las hileras del bulbo cefálico.

Tipo de variación	n	% de ejemplares
MF1	60	74.07
2 ganchos adicionales por debajo de la IV hilera de ganchos del bulbo cefálico	2	02.46
3 ganchos adicionales por debajo de la IV hilera de ganchos del bulbo cefálico	3	03.70
MF2	5	06.17
1 gancho adicional por arriba de la I hilera de ganchos del bulbo cefálico	1	01.23
MF3	3	03.70
1 gancho adicional por arriba de la I hilera de ganchos del bulbo cefálico	1	01.23
MF4	1	01.23
MF5	2	02.46
MF6	10	12.34

MF = morfotipo n = número de larvas L3A identificadas % = porcentaje

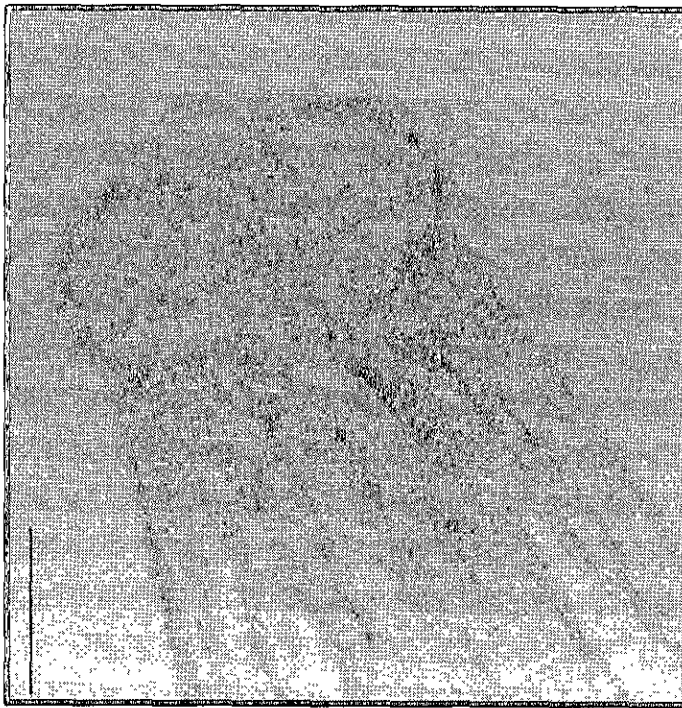
El morfotipo 1 se distingue por presentar la base de los ganchos del bulbo cefálico en forma cuadrécspide o cuadrangular, con los contornos lisos (Figura 5, 11a), el morfotipo 6 presenta la base de los ganchos en forma irregular con ondulaciones en los bordes y la punta del gancho es achatada (Figura 10, 11f)

Los cuatro morfotipos restantes son formas intermedias entre el morfotipo 1 y el morfotipo 6, como lo a 9. El morfotipo 2 presenta los bordes de la base de los ganchos con ondulaciones menos circulares que el morfotipo 6 y la punta del gancho es menos achatada que en el morfotipo 6 (Figura 10,

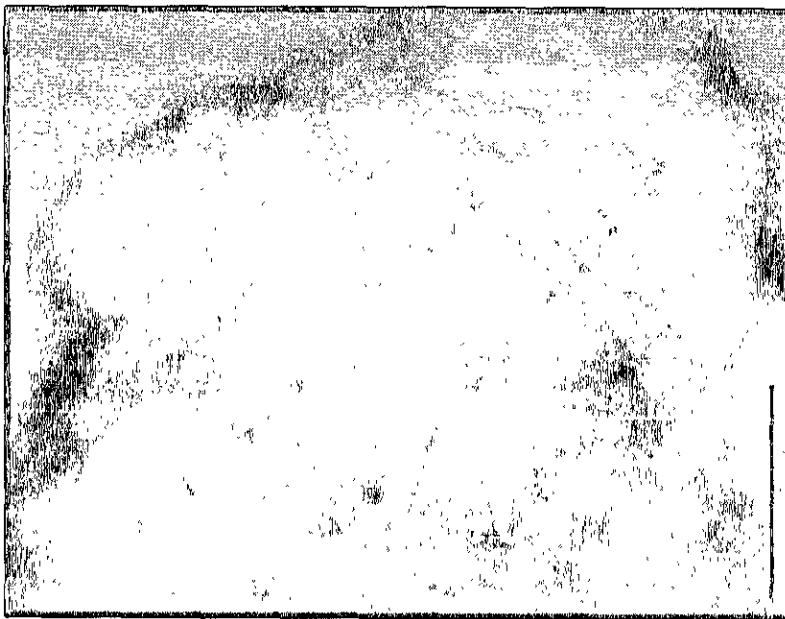
El morfotipo 3 presenta la base de los ganchos en forma semicuadrangular y la punta de los ganchos menos pronunciada que en el resto de los morfotipos, teniendo una forma ovoide en vista lateral (Figura 11c).

El morfotipo 4 presenta la base de los ganchos de las hileras I, II y III, con un contorno irregular, ligeramente ondulado y la punta de los ganchos es achatada y pronunciada; en la IV hilera ligeramente ondulada y de menor tamaño que en el resto de las hileras de ganchos (Figura 11d).

El morfotipo 5 se diferencia del resto de los morfotipos por presentar la base de los ganchos en forma de 8 alargado (Figura 11e). En la tabla VI se enlistan los datos morfométricos recabados en este estudio.



A.

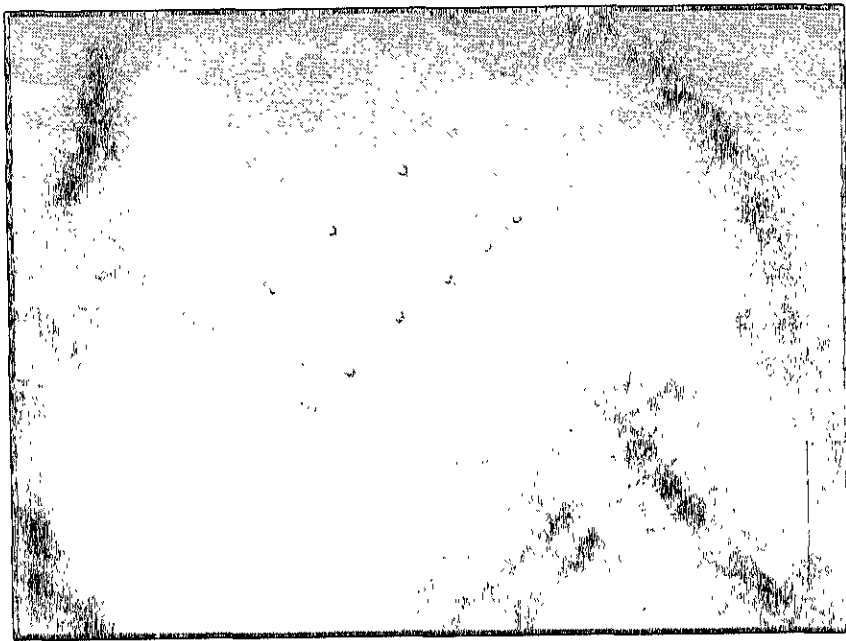


B.

Figura 5. A) Región cefálica de *Gnathostoma* sp., morfotipo 1 (MF1), en la Laguna de Tres Palos, Gro., recuperada del "Alahuate" (10X; escala 0.3mm); B) Bulbo cefálico de *Gnathostoma* sp., morfotipo 1 en la Laguna de Tres Palos, Gro., recuperada del "Alahuate" (40X; escala 0.05mm)

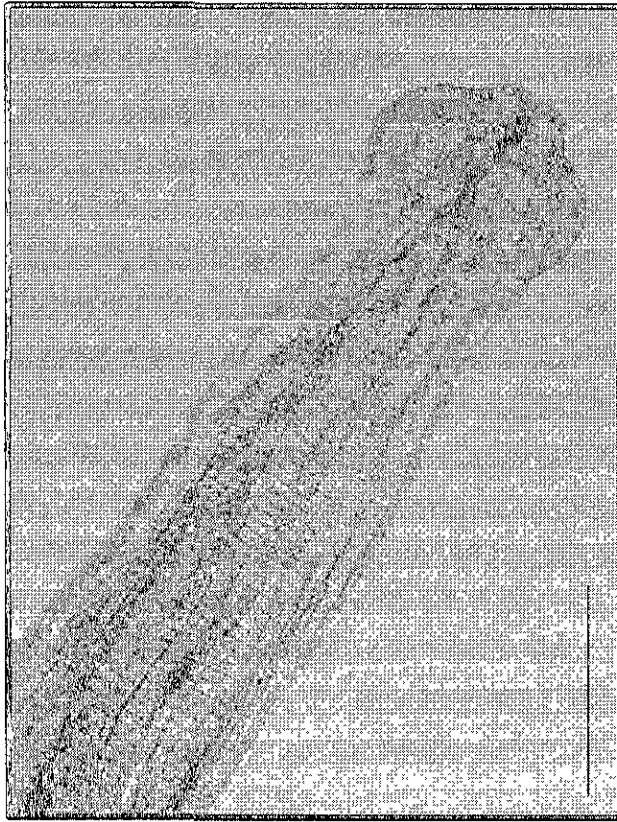


A.



B.

Figura 6. A) Región cefálica de *Gnathostoma* sp., morfotipo 2 (MF2), en la Laguna de Tres Palos, Gro., recuperada del "Alahuate" (10X: escala 0.3mm); B) Bulbo cefálico de *Gnathostoma* sp., morfotipo 2 en la Laguna de Tres Palos, Gro., recuperada del "Alahuate" (40X: escala 0.04mm).



A.

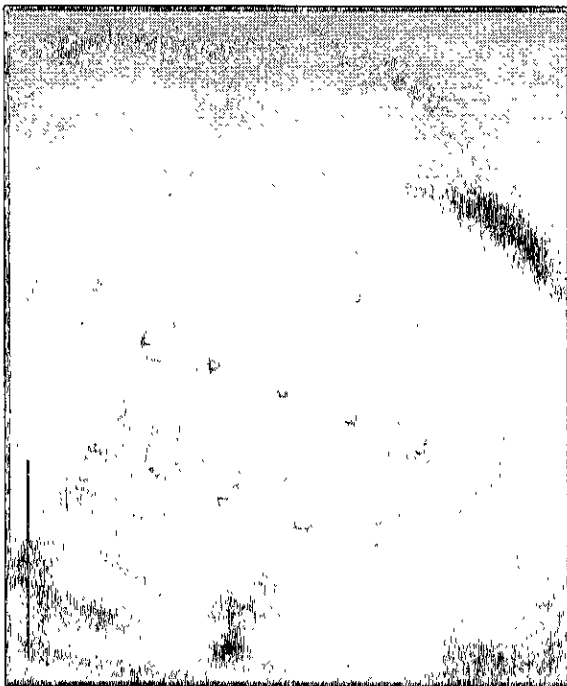


B.

Figura 7 A) Región cefálica de *Gnathostoma* sp , morfotipo 3 (MF3), en la Laguna de Tres Palos, Gro., recuperada del "Alahuate" (10X, escala 0.4mm), B) Bulbo cefálico de *Gnathostoma* sp , morfotipo 3 en la Laguna de Tres Palos, Gro., recuperada del "Alahuate" (40X, escala 0.03mm)

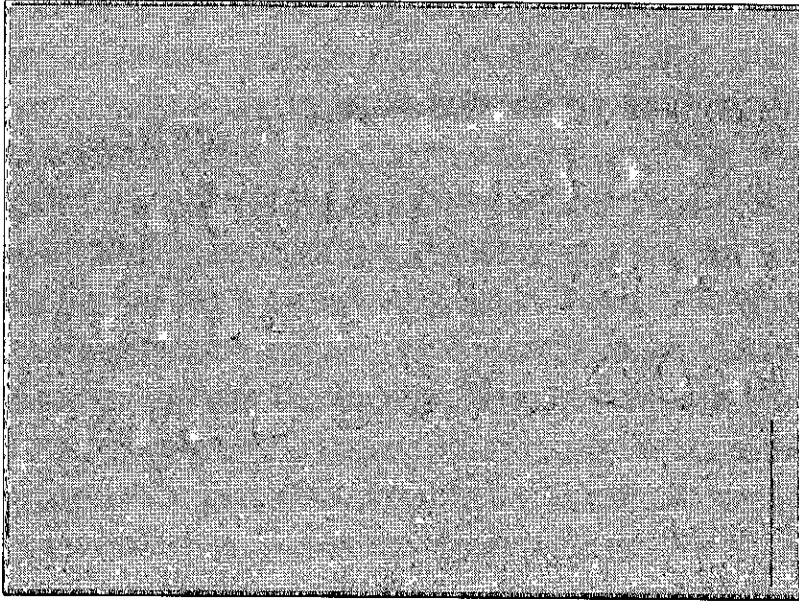


A.

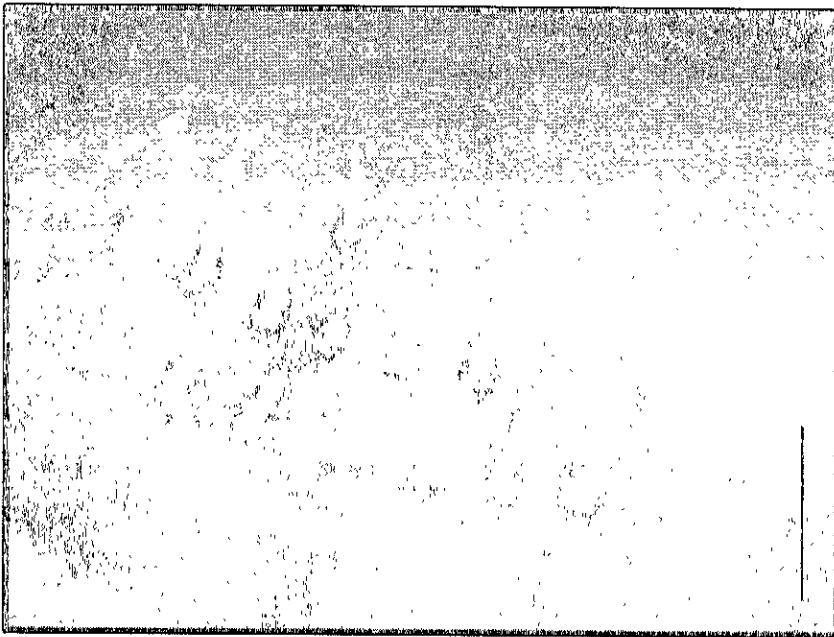


B.

Figura 8. A) Región cefálica de *Gnathostoma* sp., morfotipo 4 (MF4), en la Laguna de Tres Palos, Gro., recuperada del "Alahuate" (10X: escala 0.4mm). B) Bulbo cefálico de *Gnathostoma* sp., morfotipo 4 en la Laguna de Tres Palos, Gro., recuperada del "Alahuate" (40X: escala 0.04mm)



A.

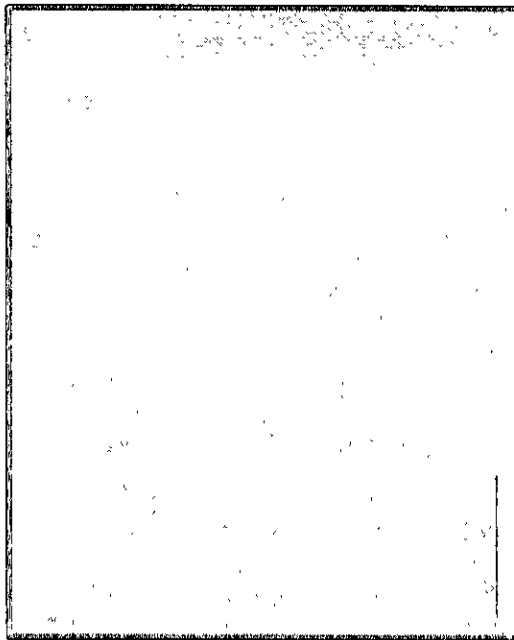


B.

Figura 9. A) Bulbo cefálico de *Gnathostoma* sp., morfotipo 5 (MF5), en la Laguna de Tres Palos, Gro., recuperada del "Alahuate" (40X; escala 0.04mm), B) Bulbo cefálico de *Gnathostoma* sp., morfotipo 5 en la Laguna de Tres Palos, Gro., recuperada del "Alahuate" (40X; escala 0.03mm).



A.



B.

Figura 10. A) Región cefálica de *Gnathostoma* sp., morfotipo 6 (MF6), en la Laguna de Tres Palos, Gro., recuperada del "Alahuate" (10X; escala 0.4mm). B) Bulbo cefálico de *Gnathostoma* sp., morfotipo 6 en la Laguna de Tres Palos, Gro., recuperada del "Alahuate" (40X; escala 0.05mm)

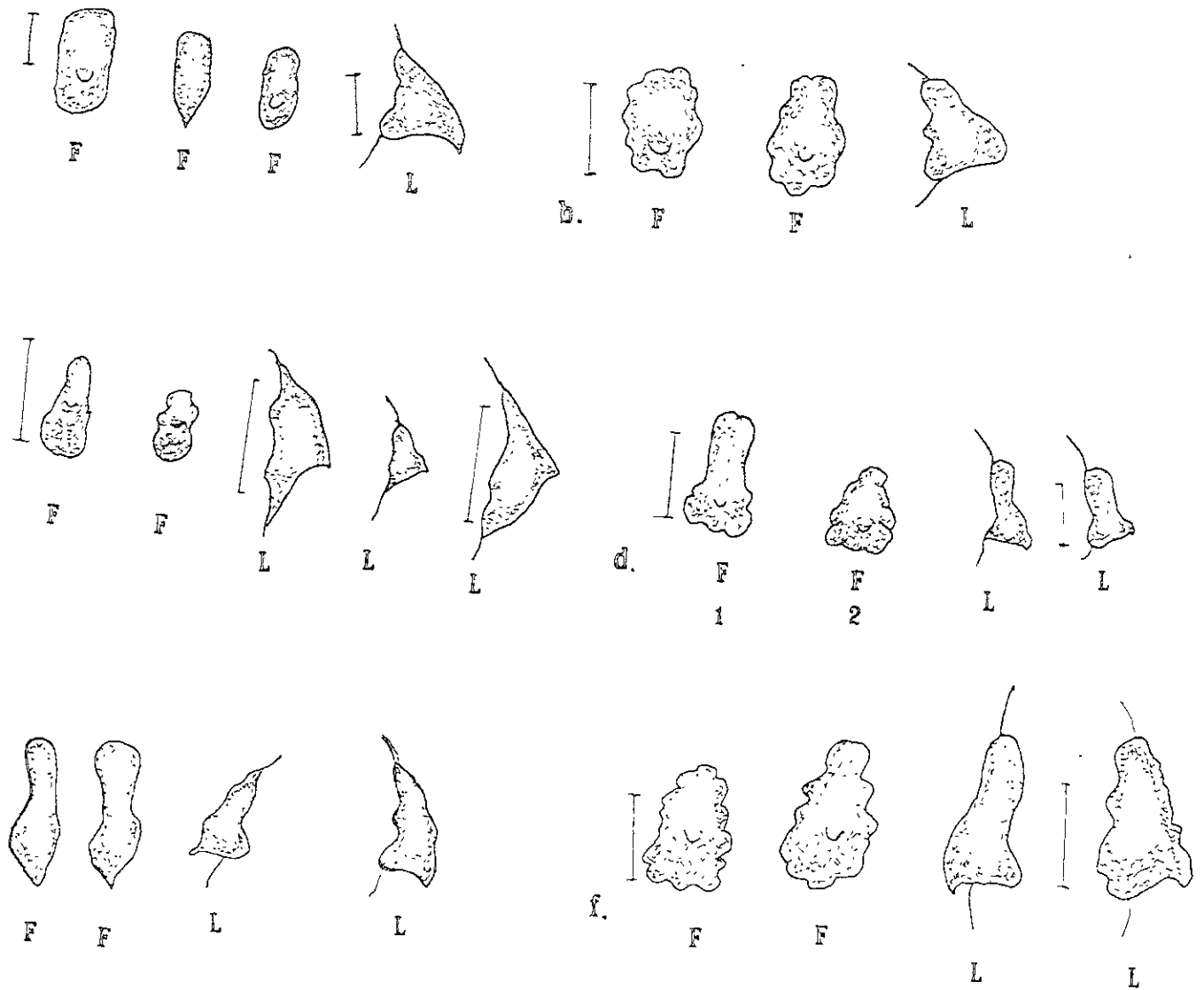


Figura 11. Ganchos del bufo cefálico de los seis morfotipos vista frontal (F) y vista lateral (L) de *C. (M.) stoma* sp. n. (epéridas del "Ahuante") (100X, escala 0.01mm): a) MI1, b) MI2, c) MI3, d) MI4, e) fucos 1-6. 7) Tabla 11 (e) A1, 5 y A17.

Tabla VI. Comparación morfométrica de los seis morfotipos identificados, con base en la forma del los ganchos del bulbo cefálico, en las larvas L3A de *Gnathostoma* en las cinco especies de peces de la Laguna de Tres Palos. Gro. MF = morfotipo.

Caracte	MF1 n = 48	MF2 n = 5	MF3 n = 3	MF4 n = 1	MF5 n = 2	MF6 n = 10
Longitud total del cuerpo	1 1011 - 4 4199 (3 2614) 0.3599	3 1964 - 4 0223 (3 6491) 0.3870	3 1177 - 3 9458 (3 4615) 0.5774	3 63997	2 6917 - 2 9211 (2 806) 0.1622	2 1258 - 3 1199 (2 6473) 0.3364
Amplitud máxima de cuerpo	0 1835 - 0 4129 (0 3300) 0.0463	0 2447 - 0 3517 (0 3150) 0.0440	0 3058 - 0 3058 (0 3058) 0.0000	0 35176	0 3058 - 0 3364 (0 3211) 0.0216	0 2294 - 0 3976 (0 2997) 0.0505
Cobertura de la espinia	T	T	T	T	T	T
N.º de ganchos	4	4	4	4	4	4
N.º de ganchos en la hembra	34 - 50 (39 4418) 3.7626	36 - 40 (37 2000) 1.7888	34 - 38 (36 0000) 2.8284	34	36 - 40 (39 0000) 1 4142	34 - 44 (38 0000) 4.0000
N.º de ganchos en la macho	36 - 52 (41 8421) 4.4450	36 - 42 (39 0000) 2 2360	36 - 40 (38 0000) 2.8284	36	36 - 42 (41 0000) 1 4142	36 - 46 (39 4285) 3.5989
N.º de ganchos en la macho I	38 - 53 (43 0681) 3.9964	38 - 46 (40 6000) 3 1304	36 - 42 (40 0000) 3.4641	36	42 - 44 (43 0000) 1 4142	38 - 48 (41 0000) 3.5456
N.º de ganchos en la macho IV	38 - 54 (44 1363) 4.1684	40 - 48 (42 4000) 3.2863	40 - 42 (41 0000) 1 4142	38	42 - 46 (45 0000) 1.4142	40 - 48 (43 6666) 2.9439
N.º espinas adicionales	2 - 3 (2 6000) 0.5477	---	---	---	1 - 1 (1 0000) ---	1 - 1 (1 000) ---
N.º de ganchos en la macho V	4 - 10 (4 5833) 2.5751	4 - 8 (4 8000) 1.7888	2 - 8 (4 6666) 3.0550	4	4 - 8 (6 0000) 2.8284	2 - 8 (4 6000) 1 6465
Longitud de bulbo cefálico	0 0977 - 0 1835 (0 1395) 0 0210	0 1070 - 0 1529 (0 1345) 0 0167	0 0917 - 0 1529 (0 1223) 0 03058	0 12235	0 1223 - 0 1376 (0 13000) 0 0108	0 1070 - 0 1682 (0 1377) 0 0206
Alcance de bulbo cefálico	0 1070 - 0 2600 (0 2029) 0 0328	0 1070 - 0 1988 (0 1712) 0 0380	0 1529 - 0 1988 (0 1784) 0 2336	0 48353	0 2294 - 0 2447 (0 2370) 0 0108	0 1682 - 0 2294 (0 2026) 0 0201
Alcance de ganchos del bulbo cefálico	0 0038 - 0 0177 (0 0175) 0 0017	0 0038 - 0 0069 (0 0218) 0 0403	0 0077 - 0 0075 (0 0077) 0 0000	0 00388	0 0038 - 0 0177 (0 0058) 0 0027	0 0038 - 0 0077 (0 0065) 0 0018
Diferencia en el alcance de ganchos	0 0038 - 0 0177 (0 0175) 0 0016	0 0038 - 0 0038 (0 0038) 0 0000	0 0038 - 0 0038 (0 0038) ---	0 00775	0 0038 - 0 0038 (0 0038) 0 0000	0 0038 - 0 0177 (0 0048) 0 0013

Tabla VI. Comparación morfométrica de los seis morfotipos identificados, con base en la forma del los ganchos del bulbo cefálico, en las larvas L3A de *Gnathostoma* en las cinco especies de peces de la Laguna de Tres Palos, Qto. (Continuación)

Distancia entre las mitades del cuerpo (anterior)	0 0038 - 0 0116 (0 0070) 0.0028	0 0038 - 0 0077 (0 0069) 0.0017	0 0077 - 0 0116 (0 0090) 0.0022	0 00775 0.0000	0 0038 - 0 0388 (0 00381) 0.0000	0 0038 - 0 0155 (0 0079) 0.0037
Distancia entre las mitades del cuerpo (media)	0 0112 - 0 0764 (0 0180) 0.0090	0 0150 - 0 0232 (0 0186) 0.0032	0 0155 - 0 0193 (0 0167) 0.0022	0 01938 0.0000	0 0193 - 0 0193 (0 0193) 0.0000	0 0155 - 0 0193 (0 0182) 0.0018
Distancia entre las mitades del cuerpo (posterior)	0 0038 - 0 0775 (0 0116) 0.0142	0 0077 - 0 0155 (0 0108) 0.0032	0 0038 - 0 0116 (0 0071) 0.0040	0 00775 0.0000	0 0077 - 0 0116 (0 0096) 0.0027	0 0038 - 0 0116 (0 0071) 0.0027
Distancia del ano a la terminación del cuerpo	0 0305 - 0 0764 (0 0539) 0.0150	0 0455 - 0 0764 (0 0581) 0.0129	0 0077 - 0 1070 (0 0484) 0.0520	0 04588 0.0009	0 0445 - 0 458 (0 0452) 0.0009	0 0305 - 0 0764 (0 4432) 0.0168
Longitud del esófago	0 8564 - 1 5294 (1 1427) 0.1322	1 0399 - 1 2541 (1 1225) 0.0799	0 9023 - 1 2388 (1 0705) 0.1682	1 00940 0.0108	1 1929 - 1 2082 (1 2005) 0.0108	0 0795 - 1 1164 (0 9654) 0.1009
Anchura del esófago	0 1223 - 0 3058 (0 1932) 0 0459	0 1376 - 0 2141 (0 1682) 0.0305	0 1223 - 0 1988 (0 1682) 0.0404	0 16823 0.0540	0 1682 - 0 2447 (0 2064) 0.0540	0 1223 - 0 1988 (0 1590) 0.0218
Longitud del intestino	1 1011 - 2 9058 (1 9649) 0.4329	1 9117 - 2 6764 (2 3369) 0.3538	1 8046 - 2 5999 (2 1972) 0.3977	2 41645 0.1405	1 2999 - 1 4988 (1 3994) 0.1405	1 1011 - 1 1850 (1 47961) .28211
Anchura del intestino	0 0611 - 0 2140 (0 1169) 0.0347	0 0611 - 0 0917 (0 0734) 0.0127	0 0917 - 0 1682 (0 1300) 0.0540	0 06882 0.0108	0 0764 - 0 0917 (0 0881) 0.0108	0 0917 - 0 1682 (0 1162) 0 2330
Longitud de los labios	0 0232 - 0 0658 (0 0343) 0 0090	0 0193 - 0 0465 (0 0317) 0.0110	0 0232 - 0 0310 (0 0284) 0 0044	0 02713 0 0109	0 0271 - 0 0426 (0 0348) 0 0109	0 0232 - 0 0503 (0 0329) 0.0080
Anchura de los labios	0 0077 - 0 1240 (0 0737) 0 0222	0 0503 - 0 1085 (0 0720) 0 0239	0 0581 - 0 0968 (0 0723) 0 0213	0 08138 0.0164	0 0581 - 0 0813 (0 06975) 0.0164	0 0581 - 0 1007 (0 7246) 0 0152
Forma de los sacos cefálicos (dorsal)	0 4782 - 0 8870 (0 6101) 0.0825	0 5047 - 0 6270 (0 5781) 0.0670	0 5505 - 0 7035 (0 6270) 0.1081	0 61176 0.0216	0 5505 - 0 58117 (0 5658) 0.0216	0 5047 - 0 6117 (0 5689) 0 0476
Forma de los sacos cefálicos (ventral)	0 5047 - 0 8717 (0 6210) 0 0895	0 5352 - 0 6117 (0 5735) 0.0364	0 5811 - 0 6423 (0 6117) 0.0432	0 58117 0.0540	0 5200 - 0 5964 (0 5582) 0.0540	0 5047 - 0 5811 (0 5457) 0.0276
Forma de los sacos cefálicos (ventral)	0 1435 - 0 9023 (0 6140) 0 0798	0 5200 - 0 6576 (0 5842) 0.0500	0 5658 - 0 6117 (0 5913) 0.0233	0 62705 0.0324	0 5658 - 0 6117 (0 5888) 0.0324	0 5047 - 0 5964 (0 5454) 0 0315
Forma de los sacos cefálicos (dorsal)	0 5047 - 0 8255 (0 6631) 0.0714	0 5352 - 0 6270 (0 5963) 0.0352	0 6117 - 0 6270 (0 6194) 0 0108	0 59647 0.0216	0 5505 - 0 5811 (0 5658) 0.0216	0 5047 - 0 5811 (0 5522) 0 0300

Tabla VI Comparación morfométrica de los seis morfotipos identificados, con base en la forma del los ganchos del bulbo cefálico, en las larvas L3A de *Gnathostoma* en las cinco especies de peces de la Laguna de Tres Palos. Grupo (Continuación)

Inicio de la localización de la papila cervical (dorsal)	9 - 16 (11 6511) 1.6018	8 - 14 (11 0000) 2.8284	12 - 13 (12 5000) 0.7071	12 12	13 - 21 (17 0000) 5.6568	10 - 16 (12 4000) 1.5776
Término de la localización de la papila cervical (dorsal)	10 - 19 (14 2766) 1.9415	11 - 17 (13 6000) 2.7018	14 - 15 (14 5000) 0.7071	14 14	15 - 24 (19 5000) 6.3639	13 - 18 (15 0000) 1.3333
Inicio de la localización de la papila cervical (ventral)	9 - 18 (12 2325) 1.6306	11 - 13 (11 7500) 0.9574	10 - 15 (12 0000) 2.6457	13 13	17 - 17 (17 0000) -----	9 - 17 (12 5000) 2.2236
Término de la localización de la papila cervical (ventral)	9 - 18 (14 5957) 1.8726	10 - 17 (13 8000) 2.5884	13 - 17 (14 3333) 2.3094	15 15	13 - 19 (16 0000) 4.2426	12 - 19 (15 0000) 1.9436
Localización de la papila cervical *	9 - 19	8 - 17	10 - 17	12 - 15	13 - 24	9 - 19
Longitud de la papila cervical (dorsal)	0.1123 - 0.5352 (0.2516) 0.0715	0.2053 - 0.2673 (0.2356) 0.02198	0.1705 - 0.2790 (0.2247) 0.0767	0.24025 0.24025	0.2480 - 0.3332 (0.2906) 0.0602	0.1782 - 0.3526 (0.2654) 0.0521
Longitud de la papila cervical (ventral)	0.0900 - 0.3758 (0.2526) 0.0710	0.1937 - 0.3177 (0.2619) 0.0513	0.2286 - 0.3100 (0.2738) 0.0414	0.24800 0.24800	0.2170 - 0.2906 (0.2538) 0.0520	0.1976 - 0.3565 (0.2611) 0.0502
Forma de los ganchos del bulbo cefálico (medida)	0.0077 - 0.0155 (0.0099) 0.0020	0.0077 - 0.0116 (0.0104) 0.0017	0.0077 - 0.0096 (0.0090) 0.0011	0.0075 0.0075	0.0077 - 0.077 (0.0677) 0.0000	0.0077 - 0.0116 (0.0093) 0.0021
Formas de los ganchos del bulbo cefálico (ángulo)	0.0155 - 0.0235 (0.0185) 0.0017	0.0155 - 0.0193 (0.0178) 0.0021	0.0135 - 0.0193 (0.0167) 0.0029	0.01550 0.01550	0.0193 - 0.0193 (0.0193) 0.0000	0.0155 - 0.0190 (0.0176) 0.0018
Forma de los ganchos del bulbo cefálico (medida)	0.0132 - 0.0176 (0.0160) 0.0011	0.0136 - 0.0170 (0.0151) 0.0014	0.0118 - 0.0147 (0.0132) 0.0020	0.01526 0.01526	0.0170 - 0.0172 (0.0171) 0.0001	0.0155 - 0.0176 (0.0167) 0.0007
Forma de los ganchos del bulbo cefálico (ángulo)	0.00862 - 0.0138 (0.0113) 0.0011	0.0089 - 0.0120 (0.0103) 0.0015	0.0070 - 0.0096 (0.0080) 0.0014	0.00952 0.00952	0.0088 - 0.0089 (0.0088) 0.00007	0.0084 - 0.0116 (0.0095) 0.0011

* Máximo y Mínimo entre parentesis el promedio y en negritas se muestra la desviación standard. * este representa el límite inferior al límite superior promedio de la localización de la papila cervical. En negritas se muestra la desviación standard. En tallos se muestran los nuevos caracteres propuestos en este trabajo.

7.1.1. Análisis de Componentes Principales (ACP)

Se realizó un análisis de componentes principales (ACP), con la finalidad de determinar si las diferencias morfológicas observadas en la forma de los ganchos representan en cierto grupo taxonómico separados o son producto de la variación intraespecífica, considerando que el ancho y el largo de los ganchos del bulbo cefálico, la hoja (longitud de la punta del gancho a la base del gancho) y la profundidad (del borde anterior de la base del gancho a su borde posterior), pueden reflejar la forma de los ganchos (Figura 13). Además se tomaron en cuenta 14 caracteres que son de importancia taxonómica (Apéndice 1).

Se construyó una matriz, considerando los 18 caracteres y 69 larvas L3A recolectadas de 5 especies de peces de la Laguna de Tres Palos (a partir de los datos arrojados en la Tabla VI). Se aplicó el análisis multivariado por medio del análisis de componentes principales, en el programa STADISTICA, con un nivel de confiabilidad del 95%. Se obtuvieron así los valores propios (eigenvalores) para cada componente principal (Apéndice 1 y Apéndice 2), y se graficaron los primeros componentes, que explicaron el mayor porcentaje de variación de los caracteres morfométricos (Tabla VII).

Este análisis indica que el 36.58% del total de varianza acumulada en las medidas morfométricas de las L3A de *Gnathostoma*, comprende a los componentes principales (CP) I-II y 31.37 % a los CP I-III.

Tabla VII Valores propios para 18 caracteres morfométricos y 69 L3A de *Gnathostoma* sp., a partir de cinco especies de peces que resultaron positivas a la infección en la Laguna de Tres Palos. Gro (valores para los primeros 4 componentes).

Componente	Valores Propios	% total de la varianza	% acumulado
CPI	3.554751	19.74862	19.74862
CPII	3.030858	16.83810	36.58672
CPIII	2.093331	11.62961	48.21633
CPIV	1.522685	8.45936	56.67569

Se graficaron los componentes I y II, los cuales explicaron la mayor cantidad de variación de los caracteres morfométricos para los seis tipos morfológicos (Figura 12).

La distribución continua de los puntos en la gráfica indica que las larvas forman un solo grupo taxonómico (como se observa en el solapamiento de los polígonos del morfotipo 1 y el morfotipo 6) y que las diferencias arrojadas por el análisis son producto de la variación intraespecífica (Apéndice 2).

Asimismo se observa que tampoco existe un agrupamiento que este correlacionado con el hospedero de procedencia, por lo que podemos decir que las variaciones observadas tampoco son producidas por la influencia de los hospederos.

bulbo cefálico, tanto el largo como el ancho de los ganchos del bulbo cefálico, entre otros caracteres (ver Apéndice

La forma de los ganchos del bulbo cefálico, se exploró en dos caracteres: Longitud de la punta del gancho a la base del gancho (hoja) y de la punta del gancho al borde posterior de la base (profundidad) (Figura 13). Se observó en base al análisis univariado que existe variación intraespecífica en la longitud de la punta del gancho a la base del gancho (hoja); mientras que la profundidad, se mantuvo más constante.

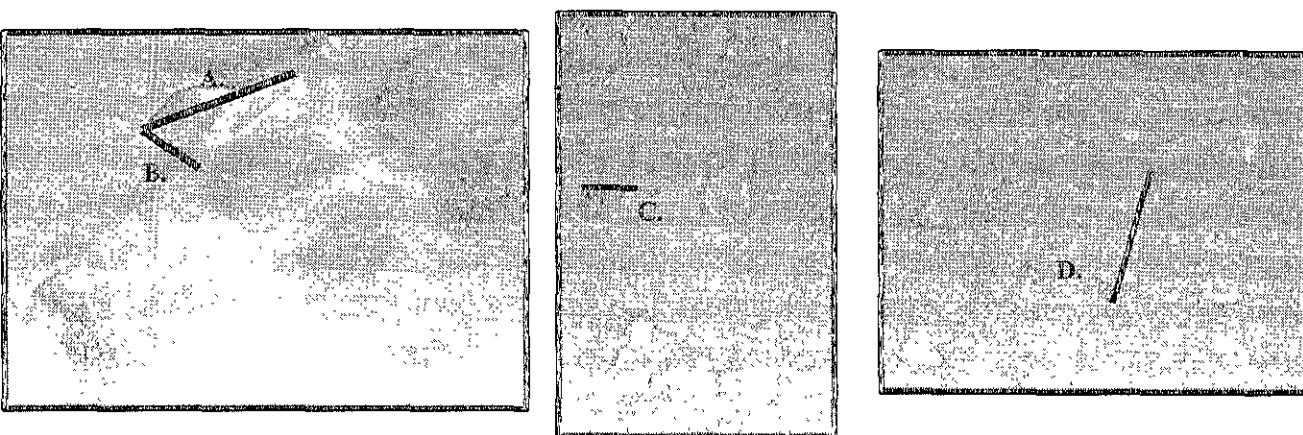


Figura 13. Caracteres evaluados en el estudio morfológico: A. Hoja: longitud de la punta del gancho a la base del gancho; B. Profundidad: de la punta del gancho al borde posterior de la base; C. ancho del gancho y D. largo del gancho.

7. 2. ESTUDIO MOLECULAR.

Producto de un análisis morfológico previo a la extracción de ADN, se identificaron 12 larvas correspondientes con el morfotipo 1 fijadas en OH 100% (colectadas de las 5 especies de hospederos), 2 larvas del morfotipo 2 (*E. picta*) y 1 larva del morfotipo 3 (*E. picta*), fijadas en OH 70% (Tabla IV)

Las larvas de los morfotipos 5 y 6 (n =9), estaban fijadas en formol al 4%, y no se fue suficiente la cantidad de ADN extraído para la reacción de secuencia, por lo que los datos obtenidos no fueron confiables, menos de 70 pb., y no pudieron incluirse en el estudio. Tampoco se extrajo ADN del morfotipo 4 ya que solo contaba con un ejemplar

Se amplificó y secuenció un fragmento de 427 pb (Figura 14), de la región ITS-2, de las 15 larvas estudiadas

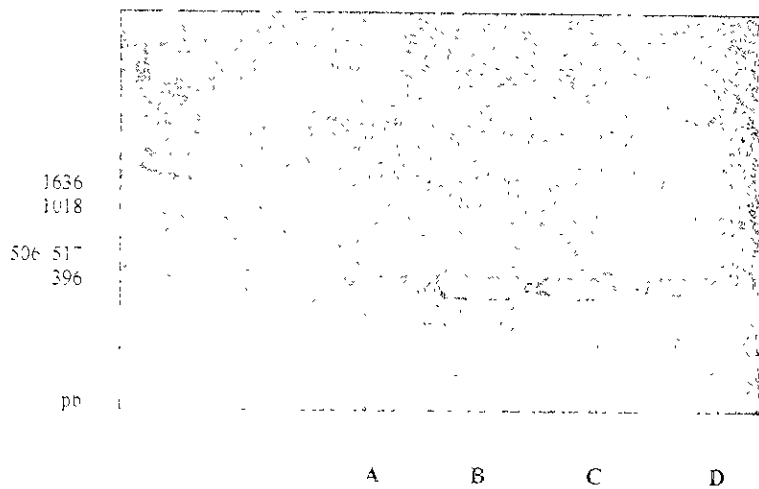


Figura 14 Fragmento amplificado por PCR de la región ITS-2 para *Gnathostoma* sp., en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, procedentes de A) cuatete, B) guayana, C) popoyote y D) charra

En el apéndice 5 se muestra el alineamiento de las secuencias de *G. bimaculatum* y *G. spinigerum* obtenidas de Genbank y las secuencias de los tres morfotipos examinados. No se muestran las secuencias que fueron idénticas a alguna de las secuencias que se enlistan.

La divergencia observada entre las secuencias de los tres morfotipos de las larvas L3A alcanza el 0.98% entre el MF1 y el MF3.

Entre secuencias de un mismo morfotipo (MF1) se observaron valores de divergencia de 0.95% como máximo (Tabla VIII)

Con respecto a la secuencia de *G. bimaculatum* obtenida en Genbank, el grado de divergencia no solo repasa el 0.71%. En contraste, la divergencia observada con respecto a la secuencia *G. spinigerum* va del 12.07% al 12.72%.

Los bajos niveles de divergencia observados entre las secuencias de los morfotipos estudiados y con respecto a la secuencia de *G. binucleatum*, así como los elevados niveles de divergencia con respecto a *G. spinigerum*, indican que las diferencias morfológicas son el producto de la variación intraespecífica y que los ejemplares estudiados pertenecen a *G. binucleatum*.

Es necesario obtener las secuencias de los morfotipos 4, 5 y 6 para corroborar su identidad específica.

Tabla VIII. Matriz de similitud entre secuencias de la región ITS2 de larvas L3A de *Gnathostoma* sp., en la Laguna de Tres Palos, Oro

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>G. bucheletum</i>	-										
M11A	0.00236	-									
M11B	0.00236	0.00000	-								
M11C	0.00713¹	0.00475	0.00474	-							
M11D	0.00242	0.00000	0.00000	0.00478	-						
M11E	0.00486	0.00244	0.00244	0.00729	0.00244	-					
M11F	0.00709	0.00473	0.00472	0.00952¹	0.00240	0.00724	-				
M11G	0.00238	0.00000	0.00000	0.00474	0.00000	0.00244	0.00475	-			
M11H	0.00497	0.00250	0.00249	0.00737²	0.00256	0.00496	0.00733	0.00252	-		
M13	0.00491	0.00491	0.00493	0.00980²	0.00501	0.00750	0.00974	0.00495	0.00755	-	
<i>G. spangenum</i>	0.12125	0.12299	0.12266	0.12620	0.12193	0.12040	0.12535	0.12131	0.12723⁴	0.12697	-

Los datos muestran los valores máximos de divergencia entre las secuencias de un mismo morfotipo¹, entre morfotipos², con respecto a *G. bucheletum*³ y *G. spangenum*⁴, respectivamente

7. 3. Redescripción de las larvas L3A de *Gnathostoma binucleatum*.

Phylum: Nematelminthes

Clase: Nematoda Rudolphi, 1808

Orden: Spirurida

Superfamilia : Spiruroidea Railliet y Henry, 1915

Familia: Gnathostomidae Railliet, 1985

Subfamilia: Gnathostominae Baylis y Lane, 1920

Género : *Gnathostoma* Owen, 1836

Especie: *binucleatum* Almeyda, 1991 (Figuras 15-16)

La siguiente descripción está basada en 56 ejemplares. Se excluyeron una larva enquistada a partir de la cual no se pudieron obtener las medidas (Figuras 17), y las larvas L3A de los morfotipos 4, 5 y 6. A pesar de que las medidas presentadas en la Tabla VI, caen dentro del intervalo de la especie, preferimos reservar su determinación específica hasta corroborar con herramientas moleculares. Las larvas se encontraban enquistadas en la musculatura de los peces, su cuerpo en vivo presentaba un color rojizo, su desplazamiento se realizaba por invaginación y eversión del bulbo cefálico y movimientos ondulatorios del cuerpo.

Miden de 1.101 a 4.419 (3.306) de longitud total por 0.183 a 0.412 (0.327) de anchura máxima. Bulbo cefálico localizado en el extremo anterior del cuerpo, provisto con dos labios semicuadrangulares, cada uno con dos papilas simples y armado con cuatro hileras transversales de ganchos; mide de 0.091 - 0.183 (0.138) de largo por 0.107 - 0.260 (0.198) de ancho.

Ganchos del bulbo cefálico con base cuadrangular y extremo en punta, miden 0.013 - 0.023 (0.018) de largo por 0.007 - 0.015 (0.0107) de ancho, y una profundidad del 0.007 a 0.014 (0.011). La distancia entre una hilera de ganchos y otra es de 0.003 - 0.096 (0.008). El número de ganchos en la primera hilera es de 34 - 50 (39.08), en la segunda hilera de 36 - 52 (41.35), en la tercera de 36 - 53 (42.65) y en la cuarta de 38 - 54 (43.88), con una diferencia entre el promedio de la cuarta hilera y el promedio de la primera de 4.607. La distancia entre un gancho y otro es de 0.0038 a 0.0077 (0.0043).

Se observaron de 1 a 3 ganchos adicionales posteriores a la IV hilera del bulbo cefálico (Figura 19a), en algunas larvas procedentes del "popoyote" (3 larvas) y del "alahuate" (2 larvas), así como la presencia de un gancho adicional antes de la I hilera de ganchos de bulbo cefálico, en dos larvas colectadas del "alahuate".

Asociado al bulbo cefálico, el sistema balloneta-saco cervical presenta cuatro sacos cervicales que miden 0.428 - 0.902 (0.609) de longitud total.

Cuerpo totalmente cubierto de espinas puntiagudas o semicirculares (Figura 20), dispuestas transversalmente, siendo muy abundantes en la parte anterior del cuerpo, haciéndose más escasas conforme

se alejan del bulbo cefálico, que hiban de 210 a 229 (219.8) hileras de espinas. Distancia entre hileras en la parte anterior del cuerpo de 0.003 - 0.011 (0.007), en la parte media es de 0.011 - 0.076 (0.018) y en la parte posterior es de 0.003 - 0.077 (0.011).

Papila cervical derecha localizada interrumpiendo las hileras 8 - 19 (12.921) y la papila cervical izquierda interrumpe las hileras 8 - 18 (13.264) (Figura 19b). Distancia del ano a la terminación del cuerpo de 0.077 a 0.107 (0.054) (Figura 18); distancia de la papila cervical a los labios del bulbo cefálico de 0.090 a 0.535 (0.225).

El poro excretor se localizo en la 25 a 28 (26.5) hileras de espinas del cuerpo.

Longitud del esófago de 0.856 - 1.529 (1.13) por 0.122 - 0.305 (0.189). Intestino de color café obscuro a pardo amarillento; termina en el ano y mide de 1.101 - 2.141 (1.921) de longitud por 0.061 - 0.214 (0.122) de anchura (Figura 15).

Hospederos: *Eleotris picta*, *Ariopsis guatemalensis*, *Dormitator latifrons*, *Cichlasoma trimaculatum*, *Gobiomorus maculatus*.

Habitat: Tejido muscular.

Ejemplares, depositados en la CNHE con los Nos. de Catálogo:

Morfotipo 1 No. Catálogo: 4335, 4336

Morfotipo 2 No. Catálogo: 4337

Morfotipo 3 No. Catálogo: 4338

Gnathostoma sp.

Hospederos: *Eleotris picta*.

Habitat: Tejido muscular.

Morfotipo 4 No. Catálogo: 4339

Morfotipo 5 No. Catálogo: 4340

Morfotipo 6 No. Catálogo: 4341

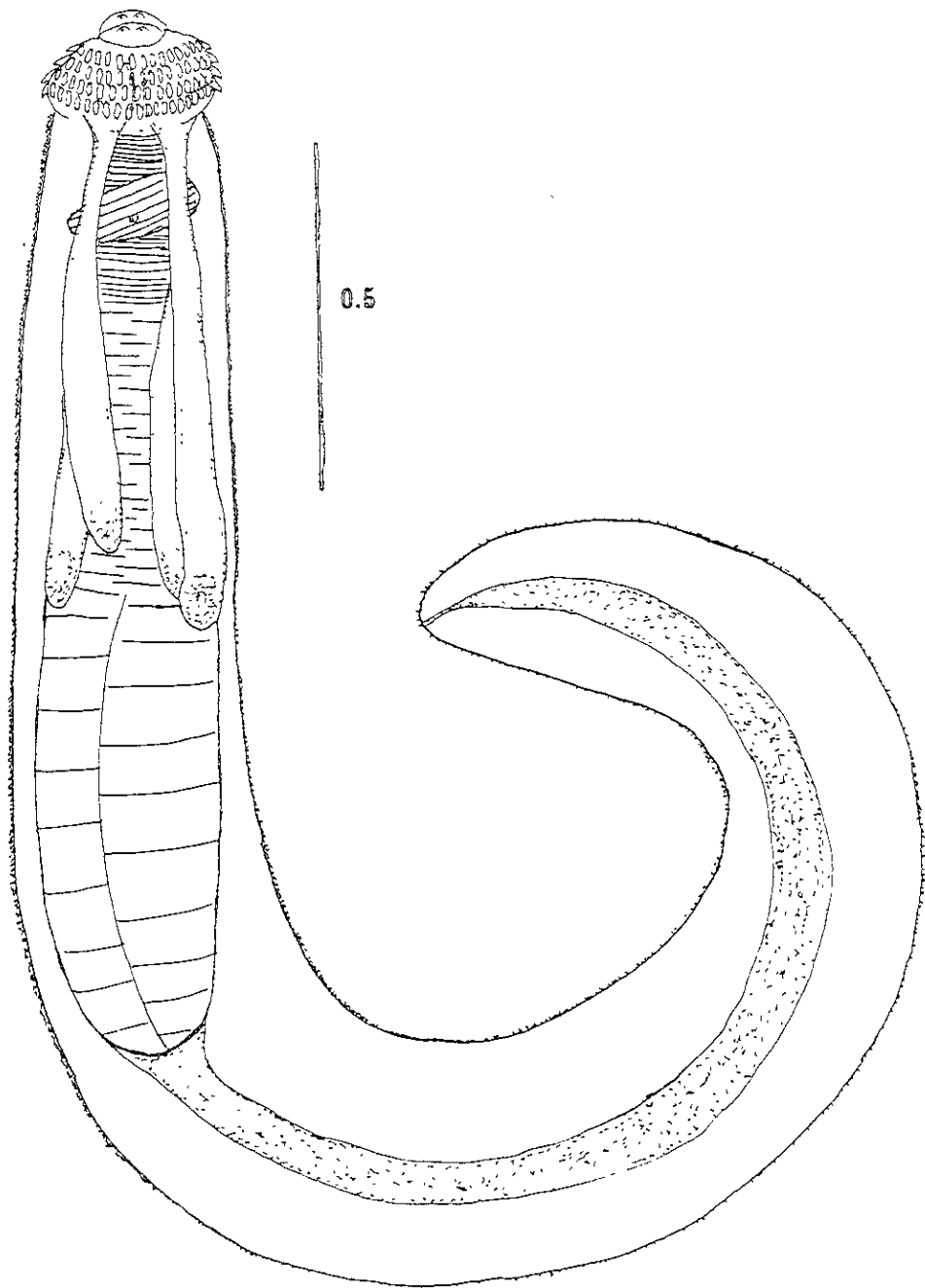


Figura 15 Larva del tercer estado avanzado de *Onchocerca volvulus*, obtenida a partir de algunos peces de la Laguna de Tres Pinos (C.O. 1987).

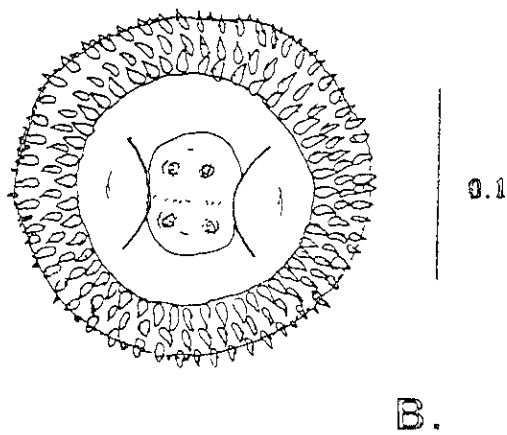
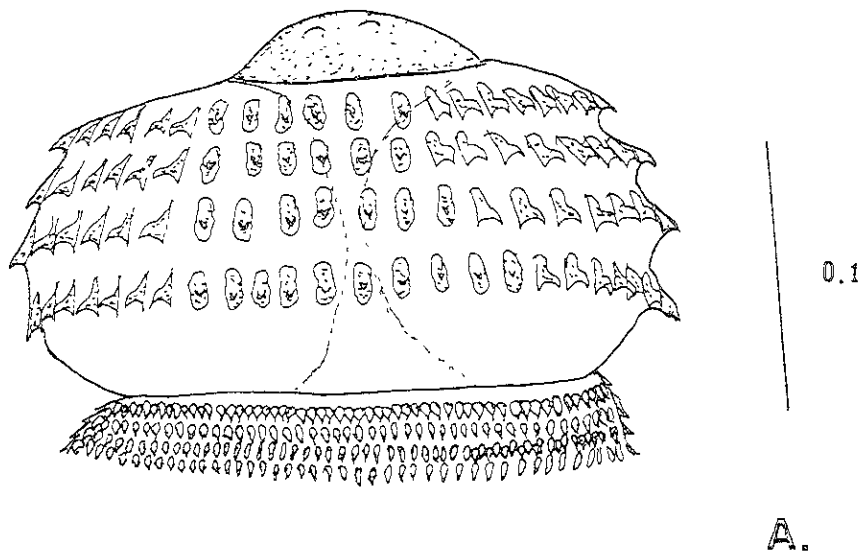


Figura 16 Larva del tercer estadio avanzado de *Gnathostoma bimucronatum*, obtenida a partir de algunos peces de la Laguna de Tres Palos, Cmo. (10x). A) Bulbo cefálico, vista ventral (40X) y B) Corte del Bulbo cefálico (vista Cont. 10X)

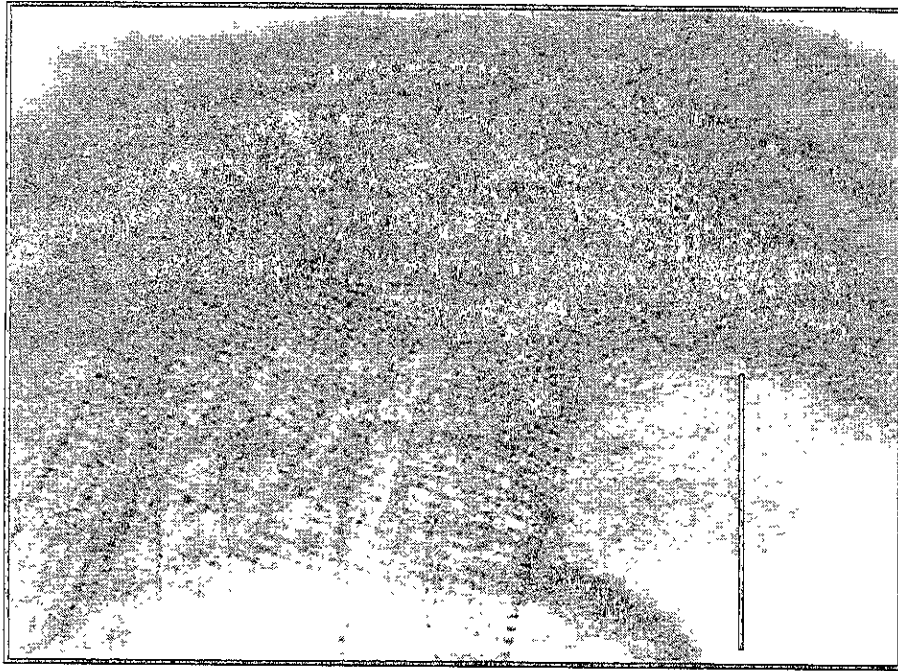
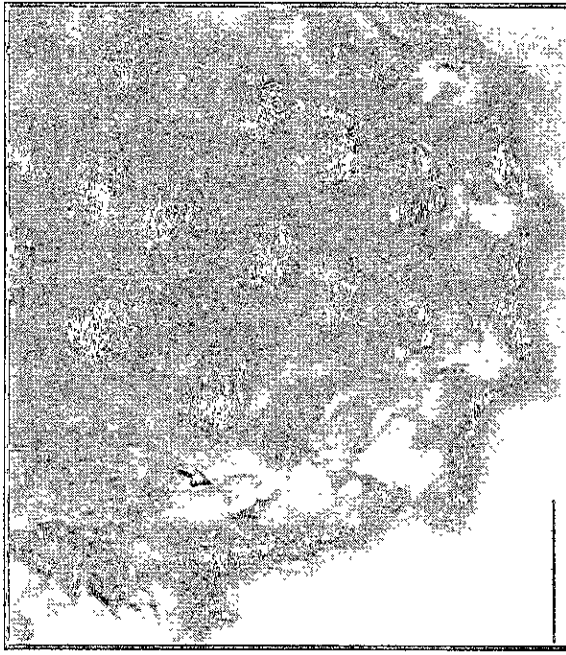


Figura 17. Larva del tercer estadio avanzado enquistada de *Gnathostoma binucleatum*, obtenida a partir de *Eleotris picta* Laguna de Tres Palos, Gro. (4x; escala 0.4mm).



Figura 18 Región caudal de una larva del tercer estadio avanzado de *Gnathostoma binucleatum*, obtenida a partir de *Eleotris picta* Laguna de Tres Palos, Gro (10x; escala 0.2mm)



A.

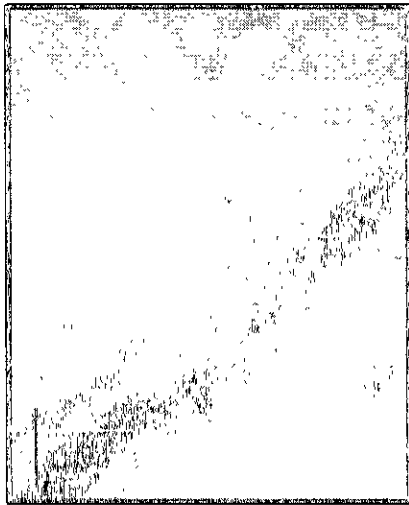


B.

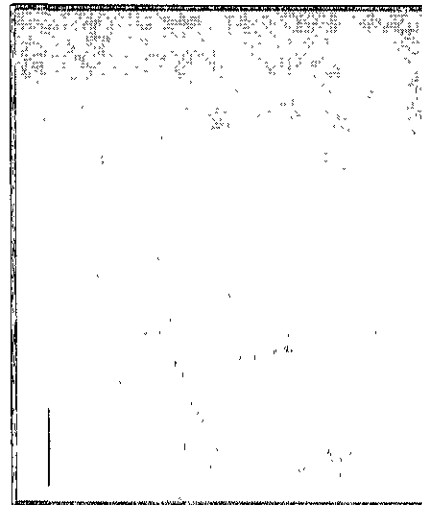
Figura 19 A) Bulbo cefálico de una larva del tercer estadio avanzado de *Gnathostoma binucleatum*, recuperada a partir de "Popoyote" en la Laguna de Tres Palos, Gro. 2 ganchos adicionales después de la IV hilera (40x, escala 0.04mm). B) Una flecha señala la papila cervical de *Gnathostoma* sp., en la Laguna de Tres Palos, Gro. (40x, escala 0.05mm)



A.



B.



B.

Figura 20. Espinas del cuerpo de *Gnathostoma binucleatum*: A. Puntiaguda, B. Semicircular. Recuperadas a partir de las cinco especies de peces en la Laguna de Tres Palos, Gro (40x; escala 0.007mm)

CARÁCTER	<i>G. bimaculatum</i> (Este estudio) n = 56	<i>G. bimaculatum</i> Almeyda-Artigas et al. 1994	<i>Gnathostoma</i> sp.+ López y Magaña, 2000			<i>Gnathostoma</i> sp.+ Alvarez y Lamothe- Argumedo, 2000	<i>Gnathostoma</i> sp.* Lamothe-Argumedo et al., 1989	<i>G. spumigerum</i> Miyazaki, 1960	
			A	B	C				
I. Cantidad del cuerpo total	3 306	3 690	2.75	4.62	4 523	3 10	4	4	
	Anchura máxima	0 327	0 342	0 2	0 316	0 276	0 340	0 3	
	Abertura de la espina	Total	4	4	4	4	Total	Total	
	Anillos de ganchos	4	4	4	4	4	4	4	
II. Ganchos en anillos del bulbo cefálico	I	34 - 50 (39 08)	37-41 (38 3)	35-44* (38 7)	38	41	38	36-44 (40.2)	37 - 44 (40.125)
	II	36 - 52 (41 35)	39-44 (41 7)	38-47* (42 4)	45	44	45	40-46 (42 7)	41 - 48 (42 875)
	III	36 - 53 (43 65)	41-47 (44 1)	40-49* (44 7)	46	44	44	40-48 (43.8)	43 - 59 (40 06)
	IV	38 - 54 (44 88)	44-53 (47.9)	43-52* (48 2)	45	48	47	42 - 48 (45.5)	46 - 52 (49.41)
Ganchos adicionales	I-3 (2 14)	---	---	---	---	---	---	---	
	Diferencia entre la I-IV	4 607	9 6	9 5*	---	---	---	5.3	9 29
	Cantidad del bulbo cefálico	0 138	0 181	0 082	0 135	0 1	0 143	0 165	---
	Anchura del bulbo cefálico	0 198	0 323	0 175	0 237	0 205	0 225	0 245	---
Cantidad de los sacos cervicales	0 428 - 0 902 (0 609)	0 737 - 0 970 (0 873)	0 872	0 732	0 671	---	---	0 715	---
	Calificación de la papila cervical	8 - 19	12 - 13	10	14	11	13 - 15	12-14	7 - 15

*Las medidas están dadas en mm y entre paréntesis el promedio. ** = basados en Almeyda-Artigas, 1991. *** = basados en Anantaphruti et al., 1982. A I-3A de Pseudo, B I-3A de Pseudo, C I-3A de Pinta y C I-3A de Inul. proponen que la especie podría ser *G. bimaculatum*

DISCUSION

A nivel mundial las especies del género *Gnathostoma* tienen una amplia distribución, así como importancia en el área de salud pública; desde que se descubrió que las larva L3A de este nemátodo eran las causantes de la gnatostomosis, han sido objeto de diversos estudios taxonómicos (Akahane y Mako, 1987; Akahane *et al.*, 1994; Almeyda-Artigas *et al.*, 1995; Lamothe-Argumedo *et al.*, 1989; López-Jiménez y García-Magaña, 2000; Alvarez-Guerrero y Lamothe-Argumedo, 2000). en su mayoría utilizando como herramienta la morfología.

La morfología es la principal característica usada por los parasitólogos para identificar y clasificar a los grupos de estudio (Crites, 1962). Sin embargo la variación intraespecífica que resulta de la influencia que perciben los diferentes ambientes ocupados por el parásito, puede generar problemas taxonómicos, ya que se encuentran en diferentes ambientes en individuos de una sola especie de hospedero, así como hospederos de diferentes especies (Kennedy, 1980).

Las especies de nemátodos se determinan tradicionalmente con base en caracteres morfológicos, pero la variabilidad en un grupo particular es a menudo poco conocida. Muchas especies han sido descritas con base en ejemplares que se han colectado una sola vez o en muestras pequeñas, lo que impide tener una adecuada idea de su variabilidad. Además, el valor taxonómico de cada carácter ha sido poco estudiado (Grise y Loff, 1970), el género *Gnathostoma* no ha sido la excepción.

La identificación de las larvas L3A es importante ya que permitiría esclarecer el o los agentes etiológicos de la gnatostomosis humana, y aquí la importancia del estudio taxonómico de este estadio larvario: Sin embargo a nivel de larva es difícil distinguir a las especies del género y por lo tanto identificarlas, ya que en los caracteres morfológicos, tales como la son el número de ganchos del bulbo cefálico, la longitud y anchura de la larva L3A, localización de la papila cervical, la forma de los ganchos del bulbo cefálico, la cobertura de las pinas corporales, la diferencia entre el número de ganchos del anillo I-IV, el tamaño de los sacos cervicales y el número de núcleos del epitelio intestinal, entre otros caracteres importantes, se han detectado intervalos amplios de variación (Akahane y Mako, 1987; Akahane *et al.*, 1994; Almeyda-Artigas *et al.*, 1995; Lamothe-Argumedo *et al.*, 1989; López-Jiménez y García-Magaña, 2000; Alvarez-Guerrero y Lamothe-Argumedo, 2000). A pesar de la controversia existente, la variabilidad intraespecífica en las especies del género *Gnathostoma* ha sido poco estudiada.

Cuando se realizó el estudio morfométrico de las larvas L3A de *Gnathostoma* sp., en la Laguna de los Palos, Gro., se lograron diferenciar seis morfotipos, con base en la forma de los ganchos del bulbo cefálico (Figura 11). La forma de los ganchos es un carácter distintivo entre las especies del género, ha sido útil para diferenciar a *G. spinigerum*, *G. doloresi* y *G. nipponicum* por ejemplo, sin embargo, *G. spinigerum* no se puede diferenciar de *G. bimaculatum* utilizando este solo criterio (Figura 21). Si se estudia la variación

intraespecífica de éste y otros caracteres de importancia taxonómica se contribuye en la caracterización de las especies del género, y por otro lado, se evalúa la validez de los caracteres que tradicionalmente se han utilizado. Es posible, asimismo, descubrir otros caracteres que aporten más información acerca del grupo. ---

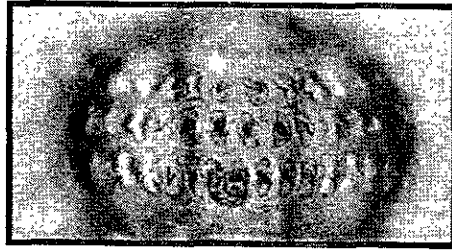
El análisis individual de componentes principales demostró que la variación morfológica observada no corresponde con una subagrupación de los individuos, por lo que se asume que es resultado de una variación intraespecífica de las larvas L3A de *Gnathostoma* sp., en las cinco especies de peces que resultaron positivas a la infección en la Laguna de Tres Palos, Gro., no es significativa.

El análisis univariado arrojó como resultado que hay caracteres que deben ser tomados con cautela cuando se realice determinaciones taxonómicas, en este estadio, ya que presentan variación tales como la longitud total del cuerpo, anchura del bulbo cefálico, la distancia entre las hileras de ganchos del bulbo cefálico, la distancia entre cada gancho del bulbo cefálico, la longitud del esófago, la longitud del intestino, el inicio y término de la localización de la papila cervical y la longitud de la punta del gancho a la base del gancho (Apéndice 3), estos caracteres no deben ser empleados de manera exclusiva para distinguir a las especies del género, como se evidencia en las Tablas VI y IX.

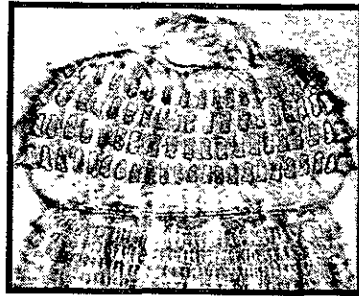
La forma de los ganchos del bulbo cefálico es un carácter de importancia taxonómica, sin embargo es difícil expresar la forma de una estructura en medias cuantitativas. Esta puede expresarse como el ancho y largo de los ganchos del bulbo cefálico y se recomiendan adicionalmente dos medidas que podrían describir con más detalle la forma de los ganchos: la longitud de la punta del gancho a la base del gancho (hoja) y de la punta del gancho al borde posterior de la base (profundidad) (Ver Figura 13). El análisis univariado, demuestra que la hoja, presenta variación intraespecífica; sin embargo la segunda medida se mantiene dentro de los límites de variación, por lo que podría ser un carácter válido para diferenciar especies (Figura 21).

Existen algunos otros caracteres como son, la anchura máxima del cuerpo, la cobertura de espinas, las hileras de ganchos, la diferencia entre la I hilera y la IV, la longitud del bulbo cefálico, la distancia entre las hileras del cuerpo (anterior, media y posterior), distancia del ano a la terminación del cuerpo, anchura del esófago e intestino, anchura y longitud de los labios y la longitud de los sacos cervicales se mantienen dentro de los límites de variabilidad, estos caracteres también deben ser tomados en cuenta para sustentar una adecuada división de las especies congénéricas.

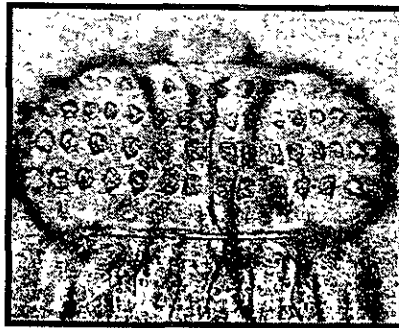
Sin embargo cuando las especies son muy similares morfológicamente (como *G. binucleatum* y *G. spinigerum*), se dificulta la determinación de la especie con base a la forma y número de los ganchos del bulbo cefálico, por ejemplo Hernández-Ortiz *et al.* (1982) y Vargas-Ocampo *et al.* (1998), identificaron una larva L3A extraída de tejido humano como *G. spinigerum*, basándose únicamente en caracteres morfológicos, siendo que en nuestro país no se ha documentado con certeza la presencia de esta especie, ni como agente etiológico, ni en naturaleza.



A.



B.



C.



D.

Figura 21. Forma de los ganchos del bulbo cefálico: A. *G. nipponicum*; B. *G. spinigerum*; C. *G. doloresi*; D. *G. binucleatum* (Miyazaki, 1960; Koga y Ishii, 1981; Presente trabajo).



C.



B.

Figura 22. Ganchos del bulbo cefálico. A) ganchos del bulbo cefálico del morfotipo 1 (= *G. binucleatum*), recuperada a partir de "Popoyote"; B) ganchos del bulbo cefálico del morfotipo 6, recuperada a partir del "alahuate".

— Muestra la profundidad del gancho.

La morfología es básica y esencial para los diferentes estudios en helmintología, tanto para identificar a las especies, como para clasificarlas, sin embargo estos caracteres en ocasiones provocan controversia. Recientemente el uso de las herramientas moleculares en taxonomía han contribuido, a esclarecer problemas morfológicos (Littlewood y Johnston, 1995; Stevenson *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1997; Blair *et al.*, 1998; León-Règagnon *et al.*, 1999; Jousson y Bartoli, 2001).

La región ITS-2 ha sido usada para ayudar a distinguir parásitos congenéricos y a menudo distinguibles morfológicamente, ya que se ha demostrado que puede ser relativamente conservada pero tiene varias unidades de repetición que son responsables de variación, a menudo entre especies muy cercanas (Alard *et al.*, 1993; Chilton *et al.*, 1995; Anderson y Barker, 1993; Stevenson *et al.*, 1996). Se ha registrado que el ITS-2 varía desde un 9% en especies muy relacionadas de *Ostertagia* hasta 13-15 % entre otras del mismo género (Stevenson *et al.*, 1996). Se encontró que la variación molecular entre las larvas L3A de *Gnathostoma* de la Laguna de Tres Palos no sobrepasa el 0.98% y 0.71% con respecto a *G. binucleatum*, mientras que la variación con respecto a *G. spinigerum* es de 12.04% como mínimo. Estos resultados indican que los morfotipos examinados pertenecen a la misma especie y que corresponde a *G. binucleatum*.

Para los morfotipos 5 y 6 (n =9), donde el material estaba fijado en formol al 4%, se intentó la técnica propuesta por Chatigny (2000), pero no fue suficiente la cantidad de ADN extraído para la reacción de PCR, por lo que los datos obtenidos no pudieron incluirse en el análisis. Se atribuye este resultado a la pequeña cantidad de tejido utilizado; ya que la técnica sugiere utilizar más de 100mg de tejido para obtener un ADN de calidad. No se extrajo ADN del morfotipo 4 ya que solo había un ejemplar.

Por lo que se puede observar en la Tabla VI, las medidas de los morfotipos 4, 5 y 6 caen dentro de los intervalos del morfotipo 1 y en el análisis de componentes principales no se formaron subgrupos, por lo que podría sugerirse que pertenecen a la especie *G. binucleatum*; sin embargo, considerando que hay especies cuyos caracteres morfológicos se sobrelapan en sus intervalos de variación (por ejemplo *G. spinigerum* y *G. binucleatum*, ver Tablas IX y XI), existe la posibilidad de que pertenezca a una especie diferente y solo hasta realizar estudios a nivel molecular se podrá determinar con certeza su identidad específica.

Los ejemplares aquí estudiados difieren ligeramente de *G. spinigerum* en la longitud total de cuerpo, siendo más pequeñas las larvas L3A de la Laguna de Tres Palos: la diferencia entre la I-IV hilera de ganchos es mayor en *G. spinigerum*; asimismo difieren en el número de ganchos en las cuatro hileras del bulbo cefálico, ya que en promedio, las larvas L3A de *G. spinigerum* presentan un mayor número de ganchos y por último, se puede diferenciar notablemente en la localización de la papila cervical, ya que en *G. binucleatum* es más anterior (Tabla IX). El intervalo de variación del número de ganchos del bulbo cefálico de las larvas L3A de *G. binucleatum* en la Laguna de Tres Palos, se amplían con respecto de la descripción original (Almeyda-Artigas, 1991).

Tabla XI. Número de ganchos del bulbo cefálico de las larvas L3A de algunas especies del género *Gnathostoma*

Hileras de ganchos del bulbo cefálico	<i>G. binucleatum</i> Almeyda-Artigas, 1991	<i>G. spingerum</i> Miyazaki, 1960	<i>G. procyonis</i> Ash, 1962	<i>G. nipponicum</i> Ando <i>et al.</i> , 1989	<i>G. hispidum</i> Koga <i>et al.</i> , 1987	<i>G. doloresi</i> Miyazaki, 1954	<i>G. turgidum</i> Sánchez-Miranda <i>et al.</i> , 2001 ⁴²	<i>G. binucleatum</i> (presente estudio)
I	35-44 (38.7)	42-54 (47.3)	29-36 (32.7)	34.8	31-40 (37.0)	43-42 (37.6)	28-35 (31.25)	34 - 50 (39.08)
II	38-47 (42.4)	42-54 (47.3)	32-40 (36.6)	36.1	33-41 (36.0)	35-43 (37.9)	29-39 (33.96)	36 - 52 (41.35)
III	40-49 (44.7)	45-56 (49.6)	37-45 (41.0)	39.7	34-40 (38.0)	33-39 (36.5)	33-40 (37.04)	36 - 53 (43.65)
IV	43-52 (48.2)	45-58 (52.0)	42-47 (45.0)	*	40-45 (43.0)	33-41 (37.0)	38-45 (41.82)	38-54 (44.88)

* El bulbo cefálico de esta especie solo esta armada con tres hileras de ganchos.

⁴² Sánchez-Miranda, E., M. A. Mosqueda-Cabrera., L. Carranza-Calderón y R. J. Almeyda-Artigas. 2001. Primera descripción de la larva del tercer estadio avanzado de *Gnathostoma turgidum* Stossich, 1902 (Nematoda: Spirurida) a partir de formas naturales y experimentales. En Memorias del XVI Congreso Nacional de Zoología. Del 28 de Octubre al 1 de Noviembre. Zacatecas, Zacatecas, México.

En México se han registrado, además de *G. binucleatum*, a *G. procyonis* y *G. turgidum*, como se muestra en la tabla XI, es difícil diferenciar las larvas L3A de *G. procyonis* de *G. turgidum*, y a su vez de *G. binucleatum* con base en el número de ganchos del bulbo cefálico. Al contar con una descripción detallada de las larvas L3A de las especies registradas en México es posible hacer una diferenciación a nivel morfológico de *G. binucleatum*.

A pesar de que el análisis univariado demostró que el número de ganchos del bulbo cefálico es un buen carácter en la determinación taxonómica de *G. binucleatum*, se sugiere realizar análisis estadísticos más detallados para evaluar este carácter en otras especies del género, ya que como se observa, en la Tabla XI, el número de ganchos de *G. procyonis*, *G. turgidum* y *G. hispidum*, cae dentro del intervalo de *G. binucleatum*.

En los ejemplares aquí estudiados se observó un menor número de ganchos del bulbo cefálico, en comparación con la descripción original de *G. binucleatum* y posteriores registros; así mismo hay variación en la localización de la papila cervical que va desde la octava hilera de espinas del cuerpo hasta la vigésima cuarta hilera (Figura 19b); y el tamaño corporal es menor, el morfotipo 1 y en él se presenta la forma cuadrícuspide de los ganchos típica de *G. binucleatum*. Existe a su vez variación morfológica de las larvas L3A al presentar ganchos adicionales.

La presencia de una hilera adicional con pocos ganchos en el bulbo cefálico, puede atribuirse a un estado de desarrollo más avanzado en estos ejemplares. Esta idea coincide con lo expuesto por Rojekittikhun y Subampen (1998), quienes atribuyen la presencia de ganchos rudimentarios, a una posible pre-diferenciación a la siguiente fase dentro del ciclo de vida de este nemátodo.

En cuanto al morfotipo 6, se logra ligeramente diferenciar de *G. binucleatum*, principalmente por la forma de los ganchos del bulbo cefálico y acorde con el análisis univariado por longitud total del cuerpo, anchura del bulbo cefálico, la distancia entre las hileras de ganchos del bulbo cefálico, la distancia entre cada gancho del bulbo cefálico, la longitud del esófago, la longitud del intestino, la localización de la papila cervical y la longitud de la punta del gancho a la base del gancho (Apéndice 3). El número y las dimensiones de los ganchos del bulbo cefálico de *G. binucleatum* son indistinguibles a las de este morfotipo, sin embargo, al no contar con descripciones detalladas de las larvas L3A de otras especies registradas en México, y solo hasta contar con evidencia molecular, se podrá descartar la posibilidad de que se trate de una especie diferente, o que se trate de variación intraespecífica de *G. binucleatum*.

CONCLUSIONES

* Se observó la presencia de seis tipos morfológicos de larvas L3A de *Gnathostoma*, en las cinco especies de peces de la Laguna de Tres Palos, que se diferencian a partir de la forma de los ganchos del bulbo cefálico.

* A través de un estudio de componentes principales se demostró que la variación observada en los caracteres morfométricos no corresponden con una subagrupación de los individuos por lo que se asume que es el resultado de variación intraespecífica.

* Mediante un análisis univariado se identificaron aquellos caracteres que varían entre los seis morfotipos: la longitud total del cuerpo, anchura del bulbo cefálico, la distancia entre las hileras de ganchos del bulbo cefálico, la distancia entre cada gancho del bulbo cefálico, la longitud del esófago, la longitud del intestino, el inicio y término de la localización de la papila cervical y la longitud de la punta del gancho a la base del gancho, por lo que la validez de estos caracteres se pone en duda.

* Esta variabilidad no es efecto de los hospederos y no depende del proceso de fijación del material biológico.

* Acorde con el análisis univariado, se recomienda la profundidad del gancho como un carácter taxonómico, el cual se mantiene constante entre los seis morfotipos y se propone para la diferenciación de especies congenéricas.

* Se corrobora, que la anchura máxima del cuerpo, la cobertura de espinas, las hileras de ganchos, la diferencia entre la I hilera y la IV, la longitud del bulbo cefálico, la distancia entre las hileras del cuerpo (anterior, media y posterior), distancia del ano a la terminación del cuerpo, anchura del esófago e intestino, anchura y longitud de los labios y la longitud de los sacos cervicales, son caracteres válidos en la taxonomía de una especie del género.

* Las secuencias del ITS-2 de tres de los seis morfotipos presentan un porcentaje de divergencia máximo de 0.71% con respecto de la secuencia de *G. binucleatum* obtenida de Genbank, mientras que presentan un porcentaje de divergencia del 12.04 a 12.72% con respecto de *G. spinigerum*. Se considera que las diferencias, tanto genéticas como morfológicas observadas entre los tres morfotipos de larvas L3A de *Gnathostoma* sp., estudiadas en la Laguna de Tres Palos, pueden atribuirse a la variación intraespecífica y todos ellos corresponden a la especie *G. binucleatum*.

* Se registra por primera vez la presencia de la larva *G. binucleatum* en *Gobiomorus maculatus*, *Ariopsis kuatemalensis* y *Cichlasoma trimaculatum* y se corrobora su presencia en *Eleotris picta*, así como en *Dormitator latifrons* en la Laguna de Tres Palos, Guerrero, y se amplía el rango de distribución de *G. binucleatum*.

* Se sugiere la realización de este tipo y otros estudios morfológicos, estadísticos y moleculares (con otras regiones del ADN) con los morfotipos 4, 5 y 6 para corroborar su identidad específica, así como con larvas L3A obtenidas de otros hospederos y otras regiones geográficas del país.

10. APÉNDICES

Apéndice 1. Lista de caracteres morfométricos analizados en el estudio morfológico de larvas L3A de *Gnathostoma* sp.

# de carácter	Acronimo	Descripción
1	LTC *	Longitud total del cuerpo
2	AM *	Anchura máxima del cuerpo
3	CE	Cobertura de la espina
4	AG	Hileras de ganchos
5	AI *	Numero de ganchos en la hilera I
6	AII *	Numero de ganchos en la hilera II
7	AIII *	Número de ganchos en la hilera III
8	AIV *	Numero de ganchos en la hilera IV
9	EA *	Número de espinas adicionales
10	DI-IV *	Diferencia entre la IV y la I hilera de ganchos
11	LBC *	Longitud del bulbo cefálico
12	ABC *	Anchura del bulbo cefálico
13	DHBC	Distancia entre las hileras de ganchos del bulbo cefálico
14	DCEBC	Distancia entre cada gancho del bulbo cefálico
15	DHCA	Distancia entre las hileras del cuerpo (Anterior)
16	DHCM	Distancia entre las hileras del cuerpo (Media)
17	DHCP	Distancia entre las hileras del cuerpo (Posterior)
18	DATC	Distancia del ano a la terminación del cuerpo
19	LE	Longitud del esófago
20	AE	Anchura del esófago
21	LI	Longitud del intestino
22	AIN	Anchura del intestino
23	LL	Longitud de los labios
24	AL	Anchura de los labios
25	LSC1D	Longitud de los sacos cervicales (1 dorsal)
26	LSC2D	Longitud de los sacos cervicales (2 dorsal)
27	LSC1V	Longitud de los sacos cervicales (1 ventral)
28	LSC2V	Longitud de los sacos cervicales (2 ventral)
29	ILPCD *	Inicio de la localización de la papila cervical (Dorsal)
30	TLPCD *	Termino de la localización de la papila cervical (Dorsal)
31	ILPCV *	Inicio de la localización de la papila cervical (Ventral)
32	TLPCV *	Termino de la localización de la papila cervical (Ventral)
33	LPCD	Longitud de la papila cervical (dorsal)
34	LPCV	Longitud de la papila cervical (ventral)
35	TEA *	Tamaño de los ganchos del bulbo cefálico (ancho)
36	TEL *	Tamaño de los ganchos del bulbo cefálico (largo)
37	LBP *	Longitud de la punta del gancho a la base del gancho (Hoja)
38	ABP *	De la punta del gancho al borde posterior de la base (Profundidad)

* Estos caracteres taxonómicos se utilizaron en el Análisis de Componentes Principales

Apéndice 2 Análisis por Componentes Principales de 18 caracteres morfométricos y 69 larvas L3A de *Gnathostoma* sp., de cinco especies de peces de la Laguna de Tres Palos, Gro. (se muestran los eigenvalores de los primeros 4 CP).

VARIABLE	VALORES PROPIOS (EIGENVALOR)			
	CPI	CPII	CPIII	CPIV
LTC	-0.339544	0.182701	-0.490397	0.238894
AM	-0.413152	0.386501	-0.309324	0.080407
AI	-0.807807	0.127175	0.083316	-0.340216
AII	-0.896096	0.141675	0.120873	-0.121844
AIII	-0.871047	0.56084	0.270360	0.094654
AIV	-0.874235	-0.051224	0.222287	0.100855
EA	-0.107841	-0.194254	0.389808	0.155370
DI-IV	-0.146593	-0.042740	0.246756	0.654224
LBC	-0.239203	0.456016	-0.543046	-0.161100
ABC	-0.069975	-0.004361	-0.462879	-0.283952
ILPCD	-0.071770	-0.790654	-0.374135	0.130270
TLPCD	-0.148863	-0.802474	-0.417631	0.054693
ILPCV	-0.176603	-0.774415	-0.004497	-0.134714
TLPCV	-0.323887	-0.763544	-0.103037	-0.198721
TEA	-0.46862	0.106725	-0.435094	-0.117995
TEL	-0.094438	0.274357	-0.571581	.379064
LBP	-0.033799	0.114710	-0.133089	-0.248926
ABP	-0.139004	-0.083138	-0.179873	0.673439

Apéndice 3. Resumen de valores arrojados en el análisis univariado (ANOVA) ($p < 0.05$).

Carácter	SS error	N	F	P
LTC*	18.8932*	63*	3.30257*	0.010343*
AM	0.1322	63	0.93572	0.0464140
AI	697.4047	53	1.10597	0.368362
AII	838.7669	49	1.25289	0.299300
AIII	839.9955	57	1.49724	0.205126
AIV	841.1111	55	0.89621	0.490204
EA	1.2000	4	6.09524	0.061038
DI-IV	375.5333	63	0.14792	0.979956
LBC	0.0278	63	0.72222	0.609234
ABC *	0.0615*	63*	17.95263*	0.00000*
DHBC *	0.0067*	63*	2.71740*	0.027551*
DCEBC *	0.000*	36*	2.51013*	0.047598*
DHCA	0.005	63	0.96247	0.447638
DHCM	0.0040	63	0.3571	0.999291
DHCP	0.0097	63	0.28246	0.921051
DATC	0.0188	61	0.72210	0.609404
LE *	0.9407*	59*	3.08935*	0.015239*
AE	0.1136	63	1.48971	0.205858
LI *	10.6288*	63*	4.65165*	0.001122*
AIN	0.0521	52	0.95411	0.454417
LL	0.0051	63	0.43974	0.819094
AL	0.0239	61	0.10230	0.991304
LSC1D	0.3118	50	0.4800	0.789472
LSC2D	0.3513	55	1.67784	0.155353
LSC1V	0.2518	55	1.85169	0.117960
LSC2V	0.1763	46	1.03163	0.410421
ILPCD *	194.6674*	57*	3.62704*	0.006439*
TLPCD *	259.6043*	61*	2.77936*	0.025133*
ILPCV	207.1611	58	1.48885	0.207499
TLPCV	250.7858	62	0.44614	0.814473
LPCD	0.2717	61	0.34734	0.882019
LPCV	0.2716	62	0.09070	0.993426
TEA	0.0001	42	1.95744	0.135062
LEL	0.0002	63	1.47077	0.212015
LBP *	0.000*	34*	4.24743*	0.004160*
ABP	0.0056	34	0.44568	0.813354

* Presentan diferencias significativas entre los 6 morfotipos.

(1)	-	G	A	G	C	A	C	G	T	T	T	A	A	C	G	A	G	G	A	C	G	G	C	G	A	T	G	A	C	C	G	
(2)	-
(3)	-
(4)	-
(5)	-
(6)	-
(7)	-
(8)	-
(9)	-
(10)	-
(11)	T	C	.	G	A	

(1)	C	T	C	-	-	C	C	G	A	T	C	G	A	C	-	-	A	T	C	A	T	C	T	A	T	C	G	A	T	G	A	A	C
(2)	-
(3)	-
(4)	-
(5)	-
(6)	-
(7)	-
(8)	-
(9)	-
(10)	-
(11)

(1)	-	-	-	G	T	C	G	A	T	A	-	-	-	-	C	G	-	-	-	A	G	C	G	C	C	T	C	A	T	T	G	T	
(2)	-
(3)	-
(4)	-
(5)	-
(6)	-
(7)	-
(8)	-
(9)	-
(10)	-
(11)	G	C	T	T	C	

Apéndice 4. Alineamiento de las secuencias de la región ITS-2 de los morfotipos 1, 2 y 3 de *Gnathostoma binucleatum* y *G. spingerum*; (.) estado idéntico a *G. binucleatum*, recuperadas de cinco especies de peces colectadas en la Laguna de Tres Palos, Gro., (-) deleción o inserción A= adenina, T= timina, G= guanina; C= citosina (Continuación).

1. LITERATURA CITADA

- AKATSUMA, T., AND S. HABE. 1985. Electrophoretic studies on diploid and triploid *Paragonimus westermani*. *Parasitology*, **91**: 489-497.
- AKAHANE, H., AND K. IWATA. 1997. A morphological observation on the intestinal cross sections of the early third-stage larvae of *Gnathostoma hispidum*. *Journal of Growth*, **36** (2): 39- 41.
- AKAHANE, H., R. LAMOTHE-ARGUMEDO. A., J. M. MARTÍNEZ-CRUZ., D. OSORIO-SARABIA, AND L. GARCÍA-PRIETO. 1994. A morphological observation of the advanced third-stage larvae of mexican *Gnathostoma*. *Japanese Journal of Parasitology*, **43**: 18- 22.
- AKAHANE H., AND T. MAKO. 1987. Morphological Features of "Large -Type" larval *Gnathostoma* in Loaches from Mainland China. *Japanese Journal of Parasitology*, **36**(6):424-226.
- AKAHANE H., T. SANO, AND T. MAKO. 1986. Morphological difference in cross sections of the advanced third-stage larvae of *Gnathostoma spinigerum*, *G. hispidum* and *G. doloresi*. *Japanese Journal of Parasitology*, **35**: 465-467.
- AKAHANE, H., P. SETASUBAN., S. NUAMTANONG., S. HORIUCHI., M. KOGA, AND S. KOJIMA. 1995. A new type of advanced third-stage larvae of the genus *Gnathostoma* in freshwater eels, *Fluta alba*, from Nakhon Nayok, Central Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **26**: 743 - 747.
- AKAHANE, H., K. SHIBUE., A. SHIMIZU., AND S. TOSHITANI. 1998. Human gnathostomiasis caused by *Gnathostoma doloresi*, with particular reference to the parasitological investigation of the causative agent. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **92**(6): 721-726.
- ALARD, R. D., S. C. BARKER., D. BLAIR, AND T. H. CRIBB. 1993. Comparison of the second internal transcribed spacer (ribosomal DNA) from populations and species of Fasciolidae (Digenea). *Internal Journal for Parasitology*, **23**: 423 - 426.
- 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 Gnathostomiasis humana en la cuenca baja del río Papaloapan, Oaxaca- Veracruz , México. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México*, **18** (2): 137- 155.
- ALMEYDA-ARTIGAS, R. J., V. ACOSTA- HERNÁNDEZ, L. ALONSO-DÍAZ, M. CASTAÑEDA-SÁNCHEZ, AND V. R. ZARATE-RAMÍREZ. 1994. First record of *Gnathostoma procyonis* Chandler, 1942 in Mexico. and a note on larval *G. binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991 (Nematoda: Spirurida). *Research and Reviews in Parasitology*, **54** (2): 93-98.
- ALMEYDA-ARTIGAS, R. J., M. D. BARGUES, AND S. MAS-COMA. 2000. ITS-2 rDNA secuencing of *Gnathostoma* species (Nematoda) and elucidation of the species causing human gnathostomiasis in the Americas. *Journal of Parasitology*, **86** (3): 537 – 544.

- ALMEYDA-ARTIGAS, R. J., M. A. MOSQUEDA-CABRERA, E. SÁNCHEZ-NUÑEZ, G. SALDAÑA-MARTÍNEZ, M. E. HERNÁNDEZ-VICICONTI, AND E. ALCOLEA-HERRERA. 1995. Development of *Gnathostoma binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991 (Nematoda: Gnathostomidae) in its first intermediate experimental host. *Research and Reviews in Parasitology*, **55**(3): 189- 194.
- ALVAREZ-GUERRERO, C., Y R. LAMOTHE-ARGUMEDO A. 2000. Larva de *Gnathostoma* sp. en peces estuarinos de Nayarit, México. *Anales del Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Zoología*, **71**(2): 179 - 184.
- AMIN, O. M. 1986. On the species and Populations of the genus *Acanthocephalus* (Acanthocephala: Echinorhynchidae) From North American Freshwater Fishes: A Cladistic Analysis. *Proceedings Biological Society of Washinton*, **99**(4): 574 - 579.
- ANANTAPHURUTI, M., SETASUBUN, P., DAENGSVANG, S. AND VAJRASTHIRA, S. 1982. Electron microscopy of the advanced thrid-stage larvae of *Gnathostoma spinigerum*. *Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health*, **13**: 531 - 540.
- ANDERSON, G. R., AND S. C. BARKER. 1993. Species differentiation in the Didymozoidae (Digenea): Restriction fragment length differences in internal transcribed spacer and 5.8s ribosomal DNA. *International Journal of Parasitology*, **23**(1): 133 - 136.
- ANDO, K., H. TANAKA, AND Y. CHINZEI. 1989. Influence of the temperature on development of eggs and larvae of *Gnathostoma nipponicum* Yamaguti, 1941. *Japanese Journal of Parasitology*, **38**: 31.37.
- ANDREWS, R. H., I. BEVERIDGE., A. ADAMS, AND P. R. BAVERSTOCK. 1988. Identification of life stages of the nematode *Echinocephalus overstreeti* by alloenzyme electrophoresis. *Journal of Parasitology*, **62**: 153- 157.
- ANDREWS, R. H., AND N. B. CHILTON. 1999. Multilocus Enzyme Electrophoresis: a valuable technique for providing answers to problems in parasite systematics. *International Journal for Parasitology*, **29**:213-253.
- ASH, L. R. 1962. Migration and development of *Gnathostoma procyonis* Chandler, 1942, in mammalian hosts. *Journal of Parasitology*, **48**: 306 - 313.
- BAKKE, T. A. 1978. Intraespecific variations of adult *Leucochloridium* sp.(Digenea) from natural and experimental infections. *Canadian Journal of Zoology*, **56**: 94 – 102.
- BALBÁS, P., Y F. BOLIVAR. 1989. Ingeniería genética y biotecnología. Secretaría general de la organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington. D.C. 81pp.
- BLAIR, D., R. A. BRAY, AND S. C. BAKER. 1998. Molecules and Morphology in Phylogenetic Studies of the Hemiuroidea (Digenea: Trematoda: Platyhelminthes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **9** (1): 15-25.
- BOWLES, J., AND D. P. MACMANUS. 1994. Genetic Characterization of the Asian *Taenia*, a Newly described teniid cestode of humans. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, **50**(1): 33-44.

- BRAY, R. A., AND S. A. DES CLERS. 1992. Multivariate analyses of metrical features in *Lepidapedon elogatum* (Lebour, 1908) species-complex (Digenea: Lepocreadiidae) in deep and shallow water gadiform fish of NE Atlantic. *Systematic Parasitology*, **21**: 222- 232.
- BROWN, W. H. 1977. *Parasitología Clínica*. Interamericana, 4a. edición . México.320pp.
- BULLINI, L., G. NASCETTI., S. CIFRÈ., F. RUMORE., E. BIOCCA., G. MONTALENTI AND G. RITA. 1978. Ricerche cariologiche ed elettroforetiche su *Parascaris univalens* e *Parasacaris equorum*. *Atti della Accademia Nazionale dei Lincei Rendiconti Classe di Scienze Fische Matematiche e Naturali*, **65**: 151 - 156.
- CABALLERO Y C. E. 1958. Estudios helmintológicos en la región oncocercosa de México y de la República de Guatemala. Nematoda. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*. México, **9**: 61 – 76.
- CABARET, J. AND H. HOSTE. 1998. Comparative analysis of two methods used to show intraespecific associations in naturally acquired parasite nematode communities from the abomasum of ewes. *Veterinary Parasitology*, **76**: 275 -285.
- CABARET, J., AND E. SCHMIDT. 2001. Species diversity of nematode communities in the digestive tract of domestic ruminants: multivariate versus univariate estimations. *Parasitology Research*, **87**: 311-316.
- CABOT, E. L., AND A. T. BECKENBACH. 1989. Simultaneous editing of multiple nucleic acid and protein sequences with ESEE. *Comparative Applied Biology*, **5**: 233- 234.
- CAMPBELL, J. D., R. B. GASSER, AND N. B. CHILTON. 1995. Differences in a ribosomal DNA sequence of *Strongylus* species allows identification of single eggs. *Journal of Parasitology*, **25**: 359 – 365.
- CASAS, A. G., Y REYNA, T. T. 1990a. Herpetofauna (anfibios y reptiles). *Atlas Nacional de México*. Sección Naturaleza. Hoja IV.8.6. Vol II. Mapa escala 1: 8 000 000. Instituto de Geografía UNAM. México
- CASAS, A. G., Y REYNA, T. T. 1990b. Especies de anfibios y reptiles de importancia económica. *Atlas Nacional de México*. Sección Naturaleza. Hoja IV.8.6. Vol II. Mapa escala 1: 8 000 000. Instituto de Geografía. UNAM. México.
- CASAS, A. G., Y REYNA, T. T. 1990c. Serpientes de Importancia en Salud Pública. Sección Naturaleza. Hoja IV.8.6. Vol II. Mapa escala 1: 8 000 000. Instituto de Geografía. UNAM. México.
- CHABAUD, A. G. 1974. CIH Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates. No. 3 Keys to Genera of the Order Spirurida. In: CIH to the Nematode Parasites of Vertebrates. Anderson, R. C., A. G. Chabaud y S. Willmott (eds). Commonwealth Agricultural Boreaux. P: 1-11.
- CHATIGNY. 2000. The extraction of DNA from formalin- fixed, ethanol- preserved reptile and amphibian tissues. *Herpetological Review*, **31**(2): 86 - 87.
- CHILTON, N. B., R. B. GASSER, AND I. BEVERIDGE. 1995. Differences in a ribosomal sequence of morphological indistinguishable species within the *Hypodontus macropi* (Nematoda: Strongyloidea) complex. *Journal of Parasitology*, **25**: 647 – 651.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

- CHILTON, N. B., R. B. GASSER, AND I. BEVERIDGE.** 1997. Phylogenetic relationships of Australian strongyloid nematodes inferred from ribosomal DNA sequence data. *Journal of Parasitology*, **27** : 1481-1494.
- CONTRERAS, F.** 1985. Las lagunas costeras mexicanas. Centro de Ecodesarrollo. Secretaría de Pesca. México. P:111
- CRITES, J. L.** 1962. Morphology as a basic of identification and classification of parasites. *Journal of Parasitology*, **48**: 652 – 655.
- CRUZ-REYES, A.** 1994. Gnathostomiasis. Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán Rosales, Sinaloa. México. 40pp.
- CUNNINGHAM, C. O., D. M. MCGILLIVRAY, K. MAC KENZIE, AND W. T. MELVIN.** 1995. Discrimination between *Gyrodactylus salaris*, *G. derjavivi* and *G. truttae* (Platyhelminthes: Monogenea) using restriction fragment length polymorphisms and an oligonucleotide probe within the small subunit ribosomal RNA gene. *Parasitology*, **11**: 87-94.
- DAENGSVANG, S. A.** 1980. A monograph of the genus *Gnathostoma* and gnathostomiasis in Thailand. Tokyo: Southeast Asian Medical Information Center SEAMIC, International Medical Foundation of Japan: 85.
- DÍAZ-CAMACHO, S. P., MA DEL C. DE LA CRUZ-OTERO., Y K. WILLMS-MANNING.** 2000. Gnathostomosis. *Revista de la Facultad de Medicina. UNAM*, **43**(5): 192-201.
- DIEGO-PÉREZ, N., Y L. LOZADA-PÉREZ.** 1994. Estudios florísticos en Guerrero. No3. Laguna de Tres Palos. Facultad de Ciencias UNAM. 29pp.
- FITCH, D. H. A., B. BUGAJ- GAWEDA, AND S. W. EMMONS.** 1995. 18S ribosomal RNA gene phylogeny for some rhabditidae related to *Caenorhabditis*. *Molecular Biology and Evolution*, **12**: 346- 358.
- GARCÍA, E.** 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen, para adaptarlo a las condiciones climáticas de la República Mexicana. Instituto de Geografía. UNAM. 252 pp.
- GASSER, R. B., Y H. HOSTE.** 1995. Genetic marker for closely related parasitic nematodes. *Molecular and Cellular Probes*, **9**: 315-32.
- GENBANK.** 2000. [http:// www.ncbi.nlm.gov/Genbank/index.html](http://www.ncbi.nlm.gov/Genbank/index.html)
- GEORGI, J. R., AND C. E. MCCULLOCH.** 1989. Diagnostic morphometry: identification of helminths eggs by discriminant analysis of morphometric data. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, **56**: 44-57.
- GRISSE DE A., AND P. A. A. LOOF.** 1970. Intraspecific variation in some criconematidae (Nematoda). *Mededeligen Fakulteit Landbrouw- Wetenschappen. Genetica*, **35**: 4 -63.
- GIUDICI, C. J., J. CABARET, AND M. C. DURETTE-DESSET.** 1999. Description of *Haemonchus placei* (Place. 1893) (Nematoda. Trichostrongylidae. Hemonchinae). Identification and Intra-Specific Morphological Variability. *Parasite*, **6**: 333 - 342.

- HERNÁNDEZ-ORTÍZ, G., J. NESME KURI., J. FLORES-CATAÑÓN, Y P. E. HERNÁNDEZ-CUESTA.** 1982. Gnathostomiasis humana manifestaciones oculares. *Anales: Sociedad Mexicana de Oftalmología*, **56**: 65-73.
- HILLIS, D. M., B. K. MABLE., A. LARSON., S. K. DAVIS., AND E. A. ZIMMER.** 1996. Sequencing and cloning. In: *Molecular Systematics*. D. M. Hillis, C. Moritz, and B. K. Mable, (eds). Sinauer, Sunderland, MA. P: 321 – 378.
- HOSTE, H., N. B. CHILTON, I. BEVERIDGE, AND R. B. GASSER.** 1998. A comparison of the first internal transcribed spacer of ribosomal DNA in seven species of *Trichostrongylus* (Nematoda: Trichostrongylidae). *Journal of Parasitology*, **28**: 1251 – 1260.
- HOSTE, H., R. B. GASSER, N. B. CHILTON, S. MALLET, AND I. BEVERIDGE.** 1993. Lack of intraespecific variation in the second internal transcribed spacer (ITS-2) of *Trichostrongylus colubriformes* rDNA. *Journal of Parasitology*, **23**: 1069– 1071.
- HOSTE, H., R. B. GASSER, N. B. CHILTON, AND I. BEVERIDGE.** 1995. Differences in the second internal transcribed spacer (rDNA) between five species of *Trichostrongylus* (Nematoda: Trichostrongylidae). *Journal of Parasitology*, **25**: 75– 80.
- HOWELL, S. N., AND S. WEBB.** 1995. *The birds of Mexico and Northern Central America*. Oxford University Press, New York, USA, 851pp.
- JOUSSON, O., AND P. BARTOLI.** 2001. Molecules, morphology and morphometrics of *Cainocreadium labracis* and *Cainocreadium dentecis* n. sp. (Digenea: Opecoelidae) parasitic in marine fishes. *International Journal for Parasitology*, **31**: 706-714.
- JOUSSON, O., P. BARTOLI AND J. PAWLOWSKI.** 1998. Molecular Phylogeny of *Mesometridae* (Trematoda, Digenea) with its relation to Morphological Changes in Parasites. *Parasite*, **5**: 365 - 369.
- KENNEDY, M. J.** 1980. Host-induced variations in *Haematoloechus buttensi* (Trematoda: Haematoloechidae). *Canadian Journal of Zoology*, **58** (3): 427 – 442.
- KOGA, M., AND Y. ISHII.** 1981. Larval gnathostomes found in reptiles in japan and experimental life cycle of *Gnathostoma nipponicum*. *Journal of Parasitology*, **67** (4): 565-570.
- KOGA, M., Y. ISHII., W. C. HUANG, AND B. F. XIA.** 1987. Early thrid-stage larvae of *Gnathostoma hispidium* in cyclops. Surface topography revealed by scanning electron microscopy. *Parasitology Research*, **74**: 69-72.
- LAMOTHE-ARGUMEDO, R.** 1992. Gnathostomiasis. *Anales del Instituto de Biología UNAM. Serie Zoología*, **63**(1): 155-159.
- LAMOTHE-ARGUMEDO, R.** 1997. Hospederos definitivos, intermedarios y paraténicos de *Gnathostoma* en Veracruz y Oaxaca. México. *Cuadernos Mexicanos de Zoología*, **3**(1). 22-28

- LAMOTHE-ARGUMEDO, R.** 1999a. La gnatostomiasis Breve revisión y recomendaciones. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, **46**(2): 86 – 91
- LAMOTHE-ARGUMEDO, R.** 1999b. Es la gnatostomiasis un problema de salud pública en México. *En: Memorias del XIV Congreso Latinoamericano de Parasitología. Del 11 al 16 de Octubre de 1999. Acapulco, Guerrero. México.*
- LAMOTHE-ARGUMEDO, R., H. AKAHANE, D. OSORIO-SARABIA., Y L. GARCÍA-PRIETO.** 1998. Hallazgo de *Gnathostoma turgidum* en *Didelphis virginiana* de Temascal, Oaxaca, México. *Anales del Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Zoología*, **69**(2): 225-229.
- LAMOTHE-ARGUMEDO, R., L. MEDINA-VENCES, S. LÓPEZ-JIMÉNEZ, Y L. GARCÍA-PRIETO.** 1989. Hallazgo de la forma infectiva de *Gnathostoma* sp. en peces de Temascal, Oaxaca, México. *Anales del Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Zoología*, **63**(1): 155-159.
- LAMOTHE-ARGUMEDO, R. Y D. OSORIO- SARABIA.** 1998. Estado actual de la Gnatostomiasis en México. *Anales del Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Zoología*, **69**(1):23-37.
- LEÓN-RÉGAGNON, R. V., D. R. BROOKS AND G. PÉREZ-PONCE DE LEÓN.** 1999. Differentiation of Mexican species of *Haematoleochus* Löss, 1899 (Digenea: Plagiorchiiformes): Molecular and Morphological evidence. *Journal of Parasitology*, **85** (5): 935 –946.
- LEÓN-RÉGAGNON, R. V., L. GARCÍA-PRIETO., D. OSORIO-SARABIA., AND A. JIMÉNEZ-RUIZ.** 2000. Gnathostomosis in Fish from Tres Palos Lagoon, Guerrero, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, **6** (4): 4.
- LITTLEWOOD, D. T., AND D. A. JOHNSTON.** 1995. Molecular phylogenetics of the four *Schistosoma* species groups determined with partial 28s ribosomal RNA gene sequences. *Parasitology*, **111**: 167 - 175.
- LIU, J., R. E BERRY, AND A. F. MOLDANKE.** 1997. Phylogenetic relationships of Entomopathogenic Nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) inferred from partial 18s rRNA gene sequences. *Journal of Invertebrate Pathology*, **69**: 246 – 252.
- LIU, J., R. E. BERRY AND M. S. BLOUIN.** 1999. Molecular Differentiation and Phylogeny of Entomopathogenic Nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae) based on ND4 Gene Sequences of Mitochondrial DNA. *Journal of Parasitology*, **85**: 709 – 715.
- LÓPEZ-JIMÉNEZ S. Y L. GARCÍA-MAGAÑA.** 2000. Estudio de Larvas de *Gnathostoma* sp. entre especies de peces de los pantanos de Centla. Tabasco, México. *Universidad y Ciencia*, **16**(31): 41 –48.
- LUTON, K., D. WALKER, AND D. BLAIR.** 1992. Comparison of ribosomal internal transcribed spacers from two congeneric species of flukes (Platyhelminthes: Trematoda: Digenea). *Molecular and Biochemical Parasitology.*, **56**: 323-328.

- YMBERY, A. J., AND R. C. A. THOMPSON. 1988. Electrophoretic analysis of genetic variation in *Echinococcus granulosus* from domestic hosts in Australia. *International Journal for Parasitology*, **18**: 803-811.
- MACMANUS, D. P., AND J. BOWLES. 1996. Molecular Genetic Approaches to Parasite Identification: their Value in Diagnostic Parasitology and Systematics. *International Journal for Parasitology*, **111**: 609-615.
- MÁRQUEZ, V. L. M. 1990. Familia Troglodytidae: saltaparedes, género *Amazilia*. Atlas Nacional de México. Sección Naturaleza. Hoja IV.8.7. Vol II. Mapa escala 1: 8 000 000. Instituto de Geografía. UNAM. México.
- MÁRQUEZ, V. L. M., Y ORNELAS, R. F. 1990. Familia Trochilidae: colibries, género *Amazilia*. Atlas Nacional de México. Sección Naturaleza. Hoja IV.8.7. Vol II. Mapa escala 1: 8 000 000. Instituto de Geografía. UNAM. México.
- MARTÍNEZ-CRUZ J. M., R. BRAVO Z., A. ARANDA P., Y R. MARTÍNEZ. 1989. La gnathostomiasis en México. *Revista de Salud Pública de México*, **31** (4): 541 – 549.
- MC DONNELL, A., S. LOVE., A. TAIT., J. R. LICHTENFELS, AND J. B. MATTHEWS. 2000. Phylogenetic analysis of partial mitochondrial cytochrome oxidase c subunit I and large ribosomal RNA sequences and nuclear internal transcribed spacer I sequences from species of *Cyathostominae* and *Strongylina* (Nematoda. Order Strongylida), parasites of the horse. *Parasitology*, **121**: 649-659.
- MIYAZAKI, I. 1954. Studies on *Gnathostoma* occurring in Japan (Nematoda: Gnathostomidae). II.- Life history of *Gnathostoma* and morphological comparison of its larval forms. *Kyushu Memories of Medical Sciences*, **5**: 123-139.
- MIYAZAKI, I. 1960. On the genus *Gnathostoma* and human gnathostomiasis with special reference to Japan. *Experimental Parasitology*, **9**: 338-370.
- MIYAZAKI, I. 1966. *Gnathostoma* and gnathostomiasis in Japan. In: Morishita, K., Komiya, Y., and Matsubayashi, H.(Eds.). *Progress of Medical Parasitology in Japan*. Vol. 3. Meguro Parasitological Museum. Tokyo, **3**: 529 – 586 pp.
- MIYAZAKI, I. 1991. An illustrated book of Helminthic zoonoses. Tokyo. International Medical Foundation of Japan. P. 499.
- MO, T. A. 1991 Variations of opisthaptor hard parts of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Monogenea: Gyrodactylidae) on parr of Atlantic *Salmo Salmo salar* L. in laboratory experiments. *Systematic Parasitology*, **20**: 11 - 19.
- MONIS, P. T. 1999. The Importance of Systematics in Parasitology Research. *International Journal for Parasitology*, **29** : 38- 388.

- IOORGAN, J. A., AND D. BLAIR.** 1998. Relative merits of nuclear ribosomal internal transcribed spacer and mitochondrial COI and NDI genes for distinguishing among *Echinostoma* specie (Trematoda). *Parasitology*, **116**: 289-297.
- MÜDESPACHER, Z. C., Y RAMÍREZ, P. J.** 1990a. Mastofauna (Mamíferos). Atlas Nacional de México. Sección Naturaleza. Hoja IV.8.9. Vol II. Mapa escala 1: 6 000 000. Instituto de Geografía. UNAM. México.
- MÜDESPACHER, Z. C., Y RAMÍREZ, P. J.** 1990b. Familias de los órdenes Marsupialia, Primates, Edentata, Actiodactyla, Perissodactyla, Lagomorpha. Atlas Nacional de México. Sección Naturaleza. Hoja IV.8.9. Vol II. Mapa escala 1: 6 000 000. Instituto de Geografía. UNAM. México.
- NADLER, S. A.** 1990. Molecular approaches to studing helminth population genetics and phylogeny. *International Journal for Parasitology*, **20**: 11-29.
- NADLER, S. A.** 1992. Phylogeny of some ascaridoid nematodes, inferred from comparison of 18S and 28S sequences. *Molecular Biology and Evolution*, **9**: 932- 944.
- NADLER, S. A., R. L. LINDQUIST AND T. J. NEAR.** 1995. Genetic structure of midwestern *Ascaris suum* populations: a comparision of isoenzyme and RAPD markers. *Journal of Parasitology*, **81** : 385 – 394.
- NOMURA Y., K. NAGAWARA., N. KAGEII., Y. TSUMI.. K. AKARÍ, AND M. SUGAWARA.** 2000. Gnathostomiasis possibly caused by *Gnathostoma malaysiae*. *Tokai Journal Experimental Clinical Medicine*, **25** (1): 81-86.
- PALUMBI, S.** 1996. The polymerase Chain Reaction. In: *Molecular Systematics*, D. M. Hillis, C. Moritz, and B. K. Mable, (eds). Sinauer, Sunderland, M.A., P: 205-247.
- PELÁEZ, D., Y R. PÉREZ-REYES.** 1970. Gnathostomiasis humana en América. *Revista Ibero Americana de Microbiología*. **12**: 83 – 91.
- PÉREZ- PONCE DE LEÓN, G.** 1995. Host-Induced Morphological Variability in Adult *Posthodiplostomum minimum* (Digenea: Neodiplostomidae). *Journal of Parasitology*, **81**(5): 818- 820.
- PÉREZ, R. E., L. SALDAÑA DE LA R., Y Z. URIBE. P.** 2000. A ckecklist of the reptiles and amphibians of Guerrero, México. *Anales del Instituto de Biología. UNAM. Serie Zoología*, **7**(1): 21-40.
- POWERS, T. O., T. C. TODD., A. M. BURNELL., P. C. B. MURRAY, C. C., FLEMING, A. L.**
- SZALANSKI, B. A. ADAMS Y T. S. HARRIS.** 1997. The rDNA Internal Transcribed spacer region as taxonomic marker for Nematodes. *Journal of Nematology*, **29**(4): 491-450.
- PROMMAS, R. A., AND S. DAENGSVANG.** 1936. Further report of a study on the life cicle of *Gnathostoma spinigerum*. *Journal of Parasitology*, **22**: 180- 186.
- QU, H. L., N. HARDMAN., L. GILL., L. CHAPPEL., M. NICOLOSO, AND J. P. BACHELLERIE.** 1986. Phylogeny of Helminths determined by rRNA sequence comparison. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **29**: 93-99

- MÍREZ, O. J., Y CASTRO, C. A. 1990. Regionalización Mastofaunistica. Atlas Nacional de México. Sección Naturaleza. Hoja IV.8.8. Vol II. Mapa escala 1: 4 000 000. Instituto de Geografía. UNAM. México.
- JEKITTIKHUN, W., AND S. PUBAMPEN. 1988. Morphological Variation and Abnormality of Cephalic Hooklets of *Gnathostoma spinigerum* Hepatic Stage Larvae from Laboratory Infected Mice. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, **29** (1): 118.- 122.
- JAS-MOLINA N., S. PEDRAZA-SÁNCHEZ., B. TORRES-BIBIANO., H. MEZA-MARTÍNEZ., Y A. ESCOBAR-GUTIERREZ. 1999. Gnathostomosis. an emerging foodborne zoonotic disease in Acapulco. México. Emerging Infectious Diseases, **5**: 264 – 266.
- LEGADO-MALDONADO, G., G. CABAÑAS-CARRANZA., E. SOTO-GALERA., J. M. CASPETA-MANDUJANO., R. G. MORENO-NAVARRETE., P. SÁNCHEZ-NAVA., AND R. AGUILAR-AGUILAR. 2001. A Checklist of Helminth Parasites of Freshwater Fishes from the Lerma-Santiago River Basin, México. Comparative Parasitology, **68** (2): 204 -218.
- LANGER, F., S. NICKLEN., AND A. R. COULSON. 1977. DNA Sequencing with Chain Terminating Inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA., **74**: 5463-5468.
- LANTOS, M. J. A., Y Y. HORTELANO. 1997. La variación en mamíferos: una nueva revisión de los enfoques metodológicos actuales. Acta Zoológica Mexicana, **70**: 13 - 34.
- SCHMIDT, G. D., Y L. S. ROBERTS. 1996. Foundations of parasitology. 5th. ed. WMC Brown Publishers. 659pp.
- SETASUBAN, P., S. NUAMTANONG., V. ROJANAKITTIKON., V. YAEMPUT., P. DEKUMYOY., H. AKAHANE, AND S. KOJIMA. 1991. Gnathostomiasis in Thailand: A survey on intermediate hosts of *Gnathostoma* spp. with special reference to a new type of larvae found in *Fluta alba*. In: Cross J. H., ed. Proceeding of the 33rd SEAMEOTROPMED regional seminar. Emerging problems in food-borne parasitic zoonosis: Impact on agriculture and Public Health. Bangkok: SEAMEO Regional Tropical Medicine and Public Health Project: 220-224.
- SHOSTAK, A. W., J. C. THOMPSON, AND T. A. DICK. 1987. The identification and morphological variation of *Diplostomum baberi* from two gull species, using metacercarial infections from least cisco from the Northwest territories. Canadian Journal of Zoology, **65**: 2287 - 2291.
- SPAKULOVÁ, M., AND J. C. CASANOVA. 1998. Chromosome analysis of *Rodentolepis straminea* (Cestoda: Hymenolepididae) parasiting wood mice (*Apodemus* spp.) in Spain. Helminthologica, **35**: 185 - 188.
- STEVENSON, L. A., R. B. GASSER, AND N. B. CHILTON. 1996. The ITS-2 rDNA of *Teladorsagia circumcincta*, *T. trifurcata* and *T. davitiani* (Nematoda: Trichostrongylidae) Indicates that these taxa are one species. International Journal for Parasitology, **26** (10): 1123-1126.
- SWOFFORD, D. L. 1998. PAUP. Phylogenetic analysis using parsimony and other methods. Ver. 4.0b8. Sinauer, Associates Sunderland, Massachusetts.

- HOMPSON, J. D., D. G. HIGGINS, AND T. J. GIBSON.** 1994. Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequences weighting, position-specifying gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**: 4673 – 4680.
- JNNASCH, T., AND P.A ZIMMERMAN.** 1995. Systematics; questions and approaches for the Molecular Parasitologist. In: *Molecular Approaches to parasitology*, Boothroyd, J. C and K. M. Komunieck (eds). Wiley-Liss Inc. New York. P:5-20.
- JPARANUKRAWL, N., T. MORAKOTE., T. HARNNOI, AND A. DANTRAKOO.** 2001. Molecular cloning of a gene encoding matrix metalloproteinase-like protein from *Gnathostoma spinigerum*. *Parasitology Research*. Spring - Verlag. DOI10.1007/S004360100440
- VARGAS-OCAMPO, F., E. ALARCÓN-RIVERA Y F. J. ALVARADO-ALEMÁN.** 1998. Human Gnathostomiasis in Mexico. *International Journal of Dermatology*, **37**: 441 – 444.
- VERNEAU, O., F. RENAUD AND F. CATZEFLIS.** 1997. Evolutionary Relationships of Sibling Tapeworm Spe. (Cestoda) Parasitizing Teleost Fishes. *Molecular Biology and Evolution*, **14** (6): 630 - 636
- VIDAL-MARTINEZ, V. M., M. L. AGUIRRE-MACEDO, T. SHOLZ., D. GONZÁLEZ-SOLÍS, AND E. F. MENDOZA-FRANCO.** 2001. Atlas of the helminth of cichlid fish of México. Academia of Science of the Czech Republic, 165pp.
- WONGKHAM, C., W. MALEEWONG., K. LEAMVITEEVANICH., P. M. INTAPAN, AND N. MORAKOTE.** 2000. *Gnathostoma spinigerum*: Analysis on protein patterns by two dimensional gel electrophoresis. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **31**(1): 138-140.
- YAMAGUTI, S.** 1961. *Systema Helminthum*. Volumen III. The Nematodes of Vertebrates. Part I. Interscience Publishers, INC., New York. 679pp.
- YÁÑEZ-ARANCIBIA, A.** 1978. Taxonomía, ecología y estructura de las comunidades de peces en lagunas costeras con bocas efímeras del Pacífico de México. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología*. Universidad Nacional Autónoma de México, **18**: 137- 155.
- ZHU, X., S. D'AMELIO., L. PAGGI, AND R. B. GASSER.** 2000. Assessing sequence variation in the internal transcribed spacers of ribosomal DNA within and among members of the *Contraecaecum oculatum* complex (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae). *Parasitology Research*, **86**: 677- 683
- ZARALEGA, D. S., F. STRINGFELLOW., M. NOBARY, AND J. R. LICHTENFELS.** 1994. Cloning and Characterization of ribosomal RNA genes from three species of *Haemonchus* (Nematoda: Trichostrongyloidea). *Experimental Parasitology*, **78**: 28-36.