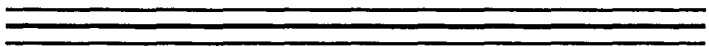


155



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

DETERMINACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LARVAS DE *Gnathostoma sp.* (Nematoda: Gnathostomatidae) DE PECES DE CONSUMO HUMANO DE DIVERSAS LOCALIDADES DE MÉXICO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

ALEJANDRO FRANCISCO OCEGUERA FIGUEROA



DIRECTOR DE TESIS:
DR. RAFAEL LAMOTHE ARGUMEDO

2002



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

Comunico a usted que hemos revisado el trabajo escrito: Determinación morfológica y molecular de larvas de Gnathostoma sp. (Nematoda: Gnathostomatidae) de peces de consumo humano de diversas localidades de México. realizado por Alejandro Francisco Ocegüera Figueroa.

con número de cuenta 9319995-1 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. Rafael Lamothe Argumedo.

Propietario Dra. Virginia León Rêgagnon.

Propietario M. en C. David Osorio Sarabia.

Suplente M. en C. Luis García Prieto.

Suplente M. en C. Maria Berenit Mendoza Garfias.

Rafael Lamothe Argumedo
Virginia León Rêgagnon
David Osorio Sarabia
Luis García Prieto
Maria Berenit Mendoza Garfias

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.

Consejo Departamental de Biología.

pa. E. Ramos

Dra. Patricia Ramos Morales.



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

DETERMINACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE
LARVAS DE *Gnathostoma* sp. (Nematoda: Gnathostomatidae) DE
PECES DE CONSUMO HUMANO DE DIVERSAS
LOCALIDADES DE MÉXICO.

INDICE

	Página
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.	1
a) Composición del género	1
b) Ciclo de vida	3
c) Registros de <i>Gnathostoma</i> en animales de México	5
d) Gnatostomosis humana	16
e) Estudio molecular	18
OBJETIVOS	19
MÉTODO	19
a) Recolecta de material	19
b) Área de estudio	20
c) Examen helmintológico	21
d) Examen morfométrico y molecular de <i>Gnathostoma</i> sp.	21
RESULTADOS	24
a) Registro de hospederos	24
b) Caracterización morfológica de los ejemplares	29
L3A de <i>Gnathostoma binucleatum</i>	29
Discusión	30
Adulto inmaduro de <i>Gnathostoma turgidum</i>	43
Discusión	44
DISCUSIÓN GENERAL	50
CONCLUSIONES	60
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a todos los hombres que han dedicado su vida a la docencia, a la investigación y a la difusión de la cultura ya que gracias a ellos sabemos que la educación es la clave para el desarrollo del país.

Agradezco también a todos los mexicanos que con su esfuerzo diario colaboran para que esta universidad siga siendo en lo esencial: pública, laica y gratuita.

Al Dr. Eduardo Caballero y Caballero y a la Maestra Margarita Bravo Hollis por ser parte fundamental de la helmintología mexicana.

A todos los maestros que han contribuido en mi enseñanza y formación personal.

Al Dr. Rafael Lamothe Argumedo por haber dirigido este trabajo, por ser mi profesor en varios cursos de la Facultad de Ciencias, por transmitirme la pasión por el estudio de los invertebrados y por permitirme hacer uso del laboratorio de Helmintología brindándome todas las facilidades para realizar este trabajo.

A Luis García Prieto por la inconmensurable paciencia y enorme disposición a lo largo de estos largos años de trabajo.

A David Osorio por estar siempre listo para emprender cualquier tipo de trabajo y por su loable dedicación al estudio de los nematodos.

A Virginia León por permitirme hacer uso del laboratorio de biología molecular y resolverme todas mis dudas al respecto.

A Berenit Mendoza por las fotografías de Microscopía Electrónica de Barrido.

A Virginia y Gerardo por el ejemplo y la disposición.

A Laura Márquez por la ayuda en biología molecular.

A todo el personal del Instituto de Biología.

Al Dr. Héctor Hernández Macías, Director del Instituto de Biología y al Dr. Fernando Álvarez, Jefe del departamento de Zoología por permitirme hacer uso de las instalaciones.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Helmintología "Eduardo Caballero y Caballero" con los que pasé alguno o varios momentos de trabajo conjunto: Agustín, Anne, Berenit, Cristina Cañeda, Elisa, Elizabeth, Florencia, Georgina, Hugo, Irma, Jorge, Laura, Lorena, Luis Fernando, Ramón, Rosario, Rogelio, Sol, Tony y Ulises.

Al proyecto "Aspectos Biológicos de la Gnathostomiasis en la cuenca del Pacífico, México" financiado por PAPIIT IN 204600.

A Dr. Scott L. Gardner y sus proyectos BSR8612329, BSR9024861, DEB9496263, DEB9631295 y DBI0097019 de la U.S. National Science Foundation.

A Agustín Jiménez por su enorme disposición y por el trabajo de campo.

A Serapio López Jiménez y Leticia Magaña por permitirnos utilizar las instalaciones de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, así como a todos sus alumnos que colaboraron con este trabajo.

DEDICATORIA

A mi papá Alejandro Gabriel Ocegüera Hernández.

A mi abuelo Martín Figueroa Guerrero.

A mi mamá Blanca E. Figueroa Torres, a mi hermana Estigia y mi hermano Leopoldo.
A Salvador Díaz Cuevas.

A toda mi gran familia: Abuelita y Nina, a mis tíos Paco, Mari, Ana, Lupita, Martín, Gabriel, Roberto y Sofía.

A todos mis primos: Ernesto, Aymara, Suny, Roberto, Andrea, Anita, Emiliano, Syanya, Martín, Jerónimo, Carolina, Arturo y José Francisco.

A toda mi familia paterna y en particular a Javier Ruiz.

A Maru con muchísimo cariño...

A Jean Paul, Dulce y familia.

A Carlitos, Rodrigo y Mauricio.

A mis compañeros de la Facultad de Ciencias: Maru, Mariana, Ricardo, Verónica, Jessica, Cinthya, Laura, Pedro, Alfonso, Silvia, a todos y cada uno de los "evodevos", Betsabé, Yssel, Ulises Iturbe y a todas las demás personalidades con las que conviví durante estos últimos años.

A Indira y Juanito.

Determinación morfológica y molecular de larvas de *Gnathostoma* sp. (Nematoda: Gnathostomatidae) de peces de consumo humano en diversas localidades de México.

INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

a) Composición del género

En el primer tercio del siglo XIX, Owen (1836) al estudiar una porción del estómago de un tigre de Bengala joven (*Felis tigris*) que había muerto de la ruptura de la aorta; descubrió 5 ó 6 tumores escrufulosos con pequeños orificios que conducían a un "nido" donde encontró ejemplares de nematodos, con base en los cuales propuso el género *Gnathostoma*, designando como especie tipo a *G. spinigerum* Owen, 1836. A partir de entonces y hasta 1960 se describieron 19 especies para el género, de las cuales solo siete fueron reconocidas como válidas por Miyazaki (1960), *Gnathostoma spinigerum*; *G. hispidum* Fedchenko, 1872, localizado en la pared estomacal de cerdos salvajes *Sus scrofa ferus* y cerdos domésticos *S. scrofa domesticus* en Turkestan y Hungría; *G. turgidum* Stossich, 1902, en la pared estomacal de un tlacuache *Didelphis azarae* en Argentina; *G. americanum* Travassos, 1925, en el mismo órgano del tigrillo *Felis tigrina* en Brasil; *G. doloresi* Tubangui, 1925, en la pared estomacal de *S. scrofa domesticus* en Filipinas; *G. nipponicum* Yamaguti, 1941, en la pared del esófago de la comadreja *Mustela sibirica italisi* en Japón y *G. procyonis* Chandler, 1942, en la pared estomacal de un mapache *Procyon lotor lotor* de E.U.A.

Mas adelante, Daengsvang (1980; 1982), realizó un estudio sobre el género *Gnathostoma*, en el que reconoció las especies señaladas por Miyazaki (1960) e incluye tres especies más descritas entre 1964 y 1965: *G. miyazakii* Anderson, 1964, en el tejido fibroso de una nutria *Lutra canadensis canadensis* en Canadá; *G. malaysiae* Miyazaki y Dunn, 1965, en la pared estomacal del roedor *Rattus surifer* y *R. tiomanicus* de Malasia y *G. vietnicum* Le Van Hoa, 1965, localizado en el riñón, ureter y vejiga urinaria de las nutrias *Lutra elioti* y *Aonyx cinerea* en Vietnam, además de reestablecer la validez de *G. brasilense* Ruiz, 1952, localizado en el hígado del marsupial *Lutreolina crassicaudata* en Brasil y de *G. didelphis* Chandler, 1932, en la pared estomacal de los tlacuaches *Didelphis virginiana* y *Philander laniger pallidus* en E.U.A. y Panamá, las cuales habían sido consideradas sinónimo de *G. turgidum* por Miyazaki (1960), debido a que su descripción fue realizada basándose en individuos sexualmente inmaduros.

La última especie descrita hasta ahora para el género, *Gnathostoma binucleatum*, fue establecida por Almeyda-Artigas (1991), con base en los gusanos localizados en nódulos gástricos de un ocelote *Felis pardalis pardalis* en Oaxaca, México, considerando a este nematodo endémico y

como el único responsable de la gnathostomosis humana en este país. Posteriormente, Almeyda-Artigas *et al.* (2000) sugirieron que la especie responsable de la infección humana en México era la misma que en Ecuador, por lo que *G. binucleatum* sería endémica de América.

Aunque desde 1958 se tiene conocimiento de la presencia de *Gnathostoma* en vertebrados silvestres de México (Caballero y Caballero 1958) y desde 1970 se le registró como parásito del hombre en el país (Peláez y Pérez-Reyes 1970), no es sino hasta la segunda mitad de la década de 1980 cuando el estudio de este nematodo alcanza gran importancia desde el punto de vista biológico y médico debido principalmente a dos acontecimientos:

-La noticia de numerosos casos humanos de gnathostomosis publicada en la prensa (El Dictamen y Novedades de Veracruz del 28 de marzo de 1986) y el anuncio de aproximadamente 70 casos humanos en la cuenca del río Papaloapan en los estados de Veracruz y Oaxaca (Martínez-Cruz *et al.*, 1989).

-El hallazgo de la forma infectiva para el hombre (L₃A) de *Gnathostoma*, en peces de la Presa Miguel Alemán de Temascal, Oaxaca (Lamothe-Argumedo *et al.*, 1989) quienes señalan cierta semejanza de éstas con *G. spinigerum* pero considerando la posibilidad de que pudiera tratarse de una forma diferente y endémica de México.

A partir de lo anterior, diversas instituciones educativas (UNAM, UAM, UAS, UJAT) y de salud han desarrollado individual o colectivamente proyectos de investigación relacionados con esta parasitosis, abordando el problema desde distintas perspectivas.

En la revisión del género efectuada por Miyazaki (1960), el autor sugiere que la única especie del género capaz de infectar al hombre es *G. spinigerum*, negando la posibilidad de que otras especies estén relacionadas con la enfermedad; este criterio fue dominante y se difundió por médicos y biólogos por más de 30 años, por lo que la mayoría de los casos humanos registrados se han atribuido a *G. spinigerum*, aun cuando el agente etiológico no se hubiera recuperado ni sometido a un examen taxonómico serio. Sin embargo, posteriores estudios han demostrado que al menos otras cinco especies del género: *G. hispidum*, *G. malasyae*, *G. doloresi* y *G. nipponicum* en Asia (Sato *et al.*, 1992) y *G. binucleatum* en América (Almeyda-Artigas, 1991; Almeyda-Artigas *et al.*, 2000) parasitan al hombre.

La validez de la afirmación realizada por Almeyda-Artigas (1991) y Almeyda-Artigas *et al.* (2000) sobre la atribución a *G. binucleatum* como el agente causal de todos los casos humanos en México ha sido cuestionada sobre la base de diversas consideraciones (Lamothe-Argumedo y Osorio-Sarabia, 1988)

b) Ciclo de vida

El ciclo biológico de las especies del género *Gnathostoma* (Ver figura 1) es de tipo indirecto e intervienen en él dos hospederos intermediarios; los hospederos definitivos son diversas especies de mamíferos que se alimentan de peces de agua dulce u otros vertebrados acuáticos que pueden actuar como hospederos paraténicos. No obstante, se ha registrado que *G. hispidum* puede infectar al hospedero definitivo si éste bebe agua con copépodos que actúan como primer hospedero intermediario infectados con larvas del tercer estadio temprano (L_3T) (Miyazaki, 1991). Los gusanos adultos viven formando nódulos en la pared del estómago o esófago de los hospederos definitivos en donde copulan. Los huevos salen al medio con las heces del hospedero, se caracterizan por ser ovalados y presentar uno o dos tapones polares con una o dos células embrionarias, continúan su segmentación al entrar al agua; en ellos se desarrolla una primera larva (L_1), la cual muda y eclosiona, transformándose en larva 2 (L_2), ésta muere si no es ingerida por un copépodo que funciona como primer hospedero intermediario. Dentro del crustáceo, el desarrollo larvario continúa, se introduce al hemocele atravesando la pared intestinal y muda transformándose en una L_3T . Cuando el crustáceo es ingerido por el segundo hospedero intermediario, generalmente un pez, la larva atraviesa la pared gástrica del hospedero y se aloja en su musculatura, transformándose un mes después en una larva 3 avanzada (L_3A). Las larvas se localizan enquistadas entre los paquetes musculares. La cubierta de los quistes es delgada y resistente, en ocasiones se percibe la presencia de una doble pared, la interna de origen parasitario y la externa producida por el hospedero, consistente en una capa de tejido conectivo fibroso, constituyendo ésta la forma infectiva para el hospedero definitivo y el denominado tipo primario de infección. En la infección de tipo secundario, intervienen uno o varios hospederos paraténicos pertenecientes a distintos grupos de cordados, siendo éste el ciclo que parece prevalecer en la naturaleza (Miyazaki, 1960). La misma larva puede infectar a uno o varios hospederos paraténicos sin presentar cambios morfológicos a no ser un pequeño aumento en el tamaño.

El ciclo se completa cuando un mamífero, normalmente perros, gatos, tlacuaches, nutrias o cerdos ingiere al segundo hospedero intermediario o paraténico infectado con L_3A , la cual penetra la pared gástrica o intestinal del hospedero definitivo, migra por el hígado y a través del tejido conjuntivo donde crece y desarrolla hasta madurar. Después atraviesa la pared gástrica desde el exterior; una vez en el estómago o esófago, forma la cripta característica, la cual presenta una caverna que se comunica con la luz gástrica a través de una pequeña apertura. El número de nematodos adultos por cripta es normalmente de uno, pero pueden ser dos o más; éstos se encuentran en el interior de la caverna, adheridos a la pared. Una vez establecida la cripta, los

gusanos no pueden verse desde afuera. Los huevos abandonan la caverna a través de la apertura hacia la luz gástrica apareciendo en las heces del hospedero aproximadamente 100 días o más después de la infección (Miyazaki, 1960; Lamothe-Argumedo, 1997).

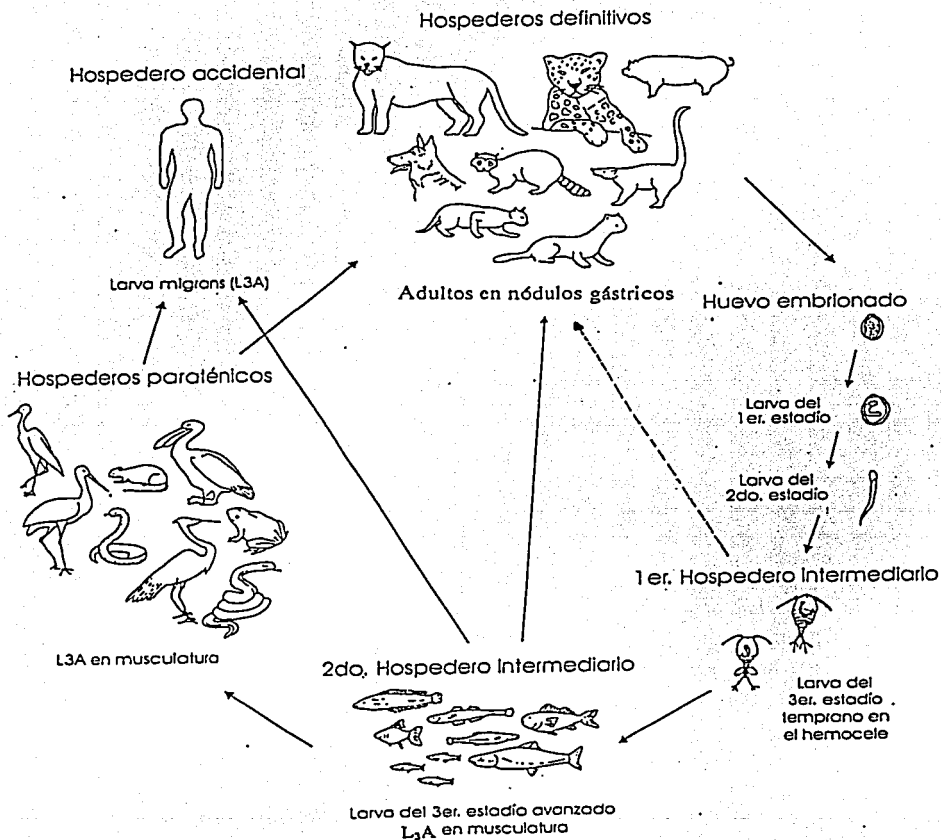


Figura 1. Ciclo de Vida de *Gnathostoma* spp. (Modificado de Martínez-Salazar 2001¹⁷)

c) Registros de *Gnathostoma* en animales de México.

El primer registro sobre la presencia de especies del género *Gnathostoma* en vertebrados de México fue realizado por Caballero y Caballero (1958) al recolectar en 1944 tres ejemplares adultos, dos machos y una hembra de la pared estomacal de un tlacuache *Didelphis marsupialis tabascensis* en La Finca Cafetalera "Prusia" en Jaltenango, Chiapas, los que fueron determinados como *G. spinigerum*; sin embargo, la validez de esta determinación fue puesta en duda por Peláez y Pérez-Reyes (1970), debido a que difiere en varios aspectos importantes de la redescrición de la especie realizada para ésta especie por Miyazaki (1960). Posteriormente Almeyda-Artigas *et al.* (1991)¹, señalaron que este material podría pertenecer a *G. turgidum*, lo cual fue confirmado por Lamothe-Argumedo *et al.* (1998), considerándose éste como el primer registro del género en México.

Mas adelante, Bravo-Hollis y Caballero-Deloya (1979) recolectaron del hígado de un *Didelphis marsupialis californica* en Chamela, Jalisco, dos ejemplares adultos, un macho y una hembra, a los que identificaron como *G. spinigerum*, sin embargo, es status específico de estos ejemplares no es claro, Lamothe-Arguedo (1997) se refiere a ellos como *G. procyonis*.

Acevedo-Hernández *et al.* (1988) encontraron en heces de perros y cerdos de Temascal, Oaxaca, huevos de una especie no determinada de *Gnathostoma*, señalando que los huevos encontrados en las heces de cerdo podrían corresponder a *G. hispidum*, sin embargo hasta la fecha no se han registrado nuevas evidencias que lo confirmen. En la misma zona, Lamothe-Argumedo *et al.* (1989) describieron larvas L₃A aisladas de cuatro especies de peces de agua dulce, encontrándose la prevalencia mas alta (21.9%) en la mojarra "Tenguayaca" *Petenia splendida*. El análisis taxonómico de las L₃A y su comparación con las larvas de *G. spinigerum*, *G. doloresi* y *G. nipponicum* mostró algunas diferencias, por lo cual indicaron que podría corresponder a una especie nueva y endémica de México.

Ortiz-Villaseñor *et al.* (1990)², refirieron la presencia de *G. procyonis* como parásita de *Didelphis virginiana*, procedente de Tepoztlán y Cuernavaca en el Estado de Morelos. Un año después, Almeyda-Artigas (1991) describió una nueva especie para el género, la cual denominó *G. binucleatum*, parásita de *Felis pardalis* y *Felis catus* en estadio adulto y de peces ciclidos de agua dulce de la Presa Miguel Alemán en Temascal, Oaxaca y de un pez del Río Papaloapan, Veracruz, en sus formas larvarias.

¹ Almeyda-Artigas R. J., M. A. Mosqueda-Cabrera. & E. Sanchez-Núñez. 1991. Ciclo de vida natural y experimental de *Gnathostoma turgidum*, Stossich, 1902 (Nematoda:Spiruridae) parásito de marsupiales en Temascal, Oaxaca. *Res.XI Congr. Nal. de Zool.*, 28-31 de octubre, Mérida, Yucatán, México.

² Ortiz-Villaseñor A. L., A. Sanchez-Albarran & S. Santillana-Alarcon. 1990. Helmintofauna del tlacuache *Didelphis virginiana* en los municipios de Cuernavaca y Tepoztlan, Morelos. Mem.III Cong. Latin-Amer. de Medicina Tropical. 9º Congreso Nacional de Parasitología. México, D.F.

Rangel *et al.* (1994) (en: Lamothe-Argumedo, 1997), recolectaron del intestino de un *Didelphis virginiana* una especie de *Gnathostoma* no determinada procedente de los alrededores de la Ciudad de Villahermosa, Tabasco. El mismo año, Almeyda-Artigas *et al.* (1994) señalaron la presencia de *G. procyonis* en un mapache *Procyon lotor hernandesi* capturado en los alrededores de Tlacotalpan en el Estado de Veracruz.

Lamothe-Argumedo *et al.* (1998) encontraron dos ejemplares adultos, un macho y una hembra de *G. turgidum* en la pared gástrica de un tlacuache *D. virginiana* procedente de Temascal, Oaxaca. Un año más tarde, Almeyda-Artigas *et al.* (2000) señalaron la presencia de larvas en peces *Gobiomorus dormitor* de Tampico, Tamaulipas y tres especies nuevas del género (parásitos de mapaches y tlacuaches) basándose en caracteres moleculares. El mismo año, López-Jiménez y García-Magaña (2000) registraron a *Belonesox belizanus*, *Cichlasoma managuense* y *Rhamdia guatemalensis* de los Pantanos de Centla, Tabasco como hospedero y Vidal-Martínez y Kennedy (2000) señalaron la presencia de éste nematodo en el estado de Yucatán sin especificar el hospedero. Al año siguiente, Salgado-Maldonado *et al.* (2001) registraron a *Allophorus robustus* en Pátzcuaro, Michoacán como hospedero de *Gnathostoma* sp.

Como se señaló anteriormente, en el ciclo de vida de las distintas especies del género *Gnathostoma* están involucrados una gran cantidad de hospederos tanto intermediarios y paraténicos como definitivos. Miyazaki (1960) señaló que *G. spinigerum* se ha registrado infectando diversas especies animales, 3 crustáceos, 8 peces, 8 anfibios, 5 reptiles, 3 aves y 6 mamíferos. En México se han registrado una gran cantidad de hospederos intermediarios, paraténicos y definitivos. Lamothe-Argumedo (1997) realizó un recuento de estos hospederos para los estados de Veracruz y Oaxaca, en donde señaló cuatro especies de copépodos como primeros hospederos intermediarios, 14 especies de peces como segundos hospederos intermediarios, cuatro especies de anfibios como hospederos paraténicos, seis especies de reptiles, nueve de aves y dos mamíferos como hospederos definitivos. Hasta el día de hoy se han registrado en nuestro país diversos organismos parasitados con nematodos del género *Gnathostoma* en alguno de sus estadios de desarrollo. Como se muestra en los cuadros 1-6, las especies de este grupo se encuentran parasitando un amplio espectro de hospederos en diversas localidades del país.

Cuadro 1. Especies de copépodos registrados como primer hospedero intermediario.

Copépodo	Especie de nematodo	Autor.
<i>Cyclops bicuspidatus</i>	<i>Gnathostoma binucleatum</i> *	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> 1995.
<i>Eucyclops agilis</i>	<i>Gnathostoma binucleatum</i> *	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> 1995.
<i>E. macrurus</i>	<i>Gnathostoma binucleatum</i> *	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> 1995.
<i>E. prisinus</i>	<i>Gnathostoma binucleatum</i> *	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> 1995.
<i>Mesocyclops. edax</i>	<i>Gnathostoma binucleatum</i> *	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> 1995.
<i>M. leuckarti</i>	<i>Gnathostoma binucleatum</i> *	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> 1995.
<i>M. tenuis</i>	<i>Gnathostoma binucleatum</i> *	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> 1995.
<i>Macrocyclops albidus</i>	<i>Gnathostoma binucleatum</i> *	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> 1995.

* Obtenidos mediante infecciones experimentales.

Cuadro 2. Especies de peces registradas como segundo hospedero intermediario de *Gnathostoma* spp. en México.

Peces	Especie nematodo	Localidad	Autor
<i>Allophorops robustus</i>	<i>Gnathostoma</i> sp.	Pátzcuaro, Michoacan.	Salgado-Maldonado <i>et al.</i> 2001.
<i>Ariopsis guatemalensis</i>	<i>Gnathostoma</i> sp.	Tres Palos, Guerrero.	León-Régagnon <i>et al.</i> 2000.
	<i>Gnathostoma binucleatum</i>	Nayarit.	Almeyda-Artigas 2001. ⁴
<i>Arius</i> sp.	<i>Gnathostoma</i> sp.	Sinaloa.	Díaz-Camacho <i>et al.</i> 2001. ³
<i>Atractosteus tropicus</i>	<i>Gnathostoma binucleatum</i>	Centla, Tabasco.	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> 2001. ⁶
<i>Belonesox belizanus</i>	<i>Gnathostoma</i> sp.	Centla, Tabasco.	López-Jimenez y García-Magaña 2000.
<i>Cathorops fuerthii</i>	<i>Gnathostoma</i> sp.	Agua Brava, Nayarit.	Alvarez-Guerrero 2000. ⁵
<i>Cathorops melanopus</i>	<i>Gnathostoma binucleatum</i>	Rio Papaloapan, Veracruz.	Pérez-Ponce de León <i>et al.</i> 1996.
<i>Centropomus parallelus</i>	<i>Gnathostoma</i> sp.	Alvarado, Veracruz.	Pérez-Ponce de León <i>et al.</i> 1996.
<i>Cichlasoma beani</i>	<i>Gnathostoma</i> sp.	Sinaloa.	Díaz-Camacho <i>et al.</i> 2001. ³
<i>C. ellioti</i>	<i>Gnathostoma</i> sp.	Cosamaloapan, Veracruz.	Pérez-Ponce de León <i>et al.</i> 1996.
<i>C. fenestratum</i>	<i>Gnathostoma binucleatum</i>	Temascal, Oaxaca.	Almeyda-Artigas 1991.
	<i>Gnathostoma</i> sp.	Cerro de Oro, Oaxaca.	Pérez-Ponce de León <i>et al.</i> 1996.
<i>C. gadovii</i>	<i>Gnathostoma</i> sp.	Temascal, Oaxaca.	Lamothe-Argumedo <i>et al.</i> 1989.
<i>C. managuense</i>	<i>Gnathostoma</i> sp.	Centla, Tabasco.	López-Jimenez y García-Magaña 2000.
	<i>Gnathostoma</i> sp.	Centla, Tabasco.	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> ⁶
<i>C. nigriscens</i>	<i>Gnathostoma</i> sp.	Tres Palos, Guerrero.	Bertoni-Ruiz 2001. ¹¹
<i>C. salvini</i>	<i>Gnathostoma</i> sp.	Cerro de oro, Oaxaca.	Lamothe-Argumedo 1997.
<i>C. trimaculatum</i>	<i>Gnathostoma</i> sp.	Tres Palos, Guerrero.	León-Regagnon <i>et al.</i> 2000.
<i>C. urophthalmus</i>	<i>Gnathostoma</i> sp.	Temascal, Oaxaca.	Lamothe-Argumedo <i>et al.</i> 1989.
	<i>Gnathostoma binucleatum</i>	Temascal, Oaxaca.	Almeyda-Artigas 1991.

Cuadro 2. Continuación.

<i>Dormitor latifrons</i>	<i>Gnathostoma</i> sp.	Sinaloa.	Díaz-Camacho <i>et al.</i> 2001. ³
	<i>Gnathostoma</i> sp.	Tres Palos, Guerrero.	León-Régagnon <i>et al.</i> 2000.
	<i>Gnathostoma</i> sp.	Agua Brava, Nayarit.	Alvarez-Guerrero 2000. ⁵
	<i>Gnathostoma binucleatum</i> .	Tres Palos, Guerrero.	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> 2001. ⁴
<i>Elotris picta</i>	<i>Gnathostoma</i> sp.	Sinaloa.	Díaz-Camacho <i>et al.</i> 2001. ³
	<i>Gnathostoma</i> sp.	Tres Palos, Guerrero.	León-Régagnon <i>et al.</i> 2000.
<i>Gobiomorus dormitor</i>	<i>Gnathostoma binucleatum</i>	Tlacotalpan, Veracruz.	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> 2001. ⁴
	<i>Gnathostoma</i> sp.	Laguna de Alvarado, Veracruz.	Pérez-Ponce de León <i>et al.</i> 1996.
	<i>Gnathostoma binucleatum</i>	Temascal, Oaxaca.	Almeyda-Artigas 1991.
	<i>Gnathostoma binucleatum</i>	Centla, Tabasco.	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> 2001. ⁶
	<i>Gnathostoma binucleatum</i>	Tamaulipas.	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> 2000.
<i>G. maculatus</i>	<i>Gnathostoma</i> sp.	Tres Palos, Guerrero.	León-Régagnon <i>et al.</i> 2000.
	<i>Gnathostoma</i> sp.	Sinaloa.	Díaz-Camacho <i>et al.</i> 2001. ³
<i>Guavina guavina</i>	<i>Gnathostoma</i> sp.	Laguna de Alvarado, Veracruz.	Pérez-Ponce de León <i>et al.</i> 1996.
<i>Ictalurus meridionalis</i>	<i>Gnathostoma</i> sp.	Cerro de Oro, Oaxaca.	Pérez-Ponce de León <i>et al.</i> 1996.
<i>Oreochromis</i> sp.	<i>Gnathostoma</i> sp.	Sinaloa.	Díaz-Camacho <i>et al.</i> 2001. ³
	<i>Gnathostoma</i> sp.	Temascal, Oaxaca.	Lamothe-Argumedo <i>et al.</i> 1989.
<i>Oreochromis aureus</i>	<i>Gnathostoma binucleatum</i>	Temascal, Oaxaca.	Almeyda-Artigas 1991.
	<i>Gnathostoma</i> sp.	Temascal, Oaxaca.	Lamothe-Argumedo 1997.
<i>O. mossambicus</i>	<i>Gnathostoma binucleatum</i>	Temascal, Oaxaca.	Almeyda-Artigas 1991.
	<i>Gnathostoma</i> sp.	Temascal, Oaxaca.	Pérez-Ponce de León <i>et al.</i> 1996.
<i>O. niloticus</i>	<i>Gnathostoma binucleatum</i>	Temascal, Oaxaca.	Almeyda-Artigas 1991.
	<i>Gnathostoma</i> sp.	Temascal, Oaxaca.	Pérez-Ponce de León <i>et al.</i> 1996.

Cuadro 2. Continuación.

<i>Petenia splendida</i>	<i>Gnathostoma binucleatum</i>	Temascal, Oaxaca.	Almeyda-Artigas 1991.
	<i>Gnathostoma binucleatum</i>	Temascal, Oaxaca.	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> 1992. ⁸
	<i>Gnathostoma</i> sp.	La Concha, Veracruz.	Pérez-Ponce de León <i>et al.</i> 1996.
	<i>Gnathostoma</i> sp.	Temascal, Oaxaca.	Lamothe-Argumedo <i>et al.</i> 1989.
<i>Poecila mexicana</i>	<i>Gnathostoma binucleatum</i> *		Almeyda-Artigas <i>et al.</i> 2001. ¹³
<i>Pocilopsis gracilis</i>	<i>Gnathostoma procyonis</i> *		Almeyda-Artigas <i>et al.</i> 1995. ¹²
<i>Rhandia guatemalensis</i>	<i>Gnathostoma</i> sp.	Centla, Tabasco.	López-Jimenez y García-Magaña 2000

* Obtenidos mediante infecciones experimentales.

Cuadro 3. Especies de anfibios registradas como hospederos de *Gnathostoma* spp. en México.

Anfibios	Especie nematodo	Localidad	Autor
<i>Rana berlandieri</i>	<i>Gnathostoma</i> sp.	Cosamaloapan, Veracruz.	Lamothe-Argumedo 1997
<i>R. forreri</i>	<i>Gnathostoma</i> sp.	Tres Palos, Guerrero.	Bertoni-Ruiz 2001. ¹¹
<i>R. montezumae</i>	<i>Gnathostoma</i> sp.	Río Usila, Oaxaca.	Lamothe-Argumedo 1997
<i>R. pipiens</i>	<i>Gnathostoma turgidum</i> *		Sánchez Miranda <i>et al.</i> 2001. ¹⁰
<i>R. temporaria</i>	<i>Gnathostoma</i> sp.	Cerro de Oro, Oaxaca.	Lamothe-Argumedo 1997
<i>Smilisca baudini</i>	<i>Gnathostoma</i> sp.	Temascal, Oaxaca.	Lamothe-Argumedo 1997

* Obtenidos mediante infecciones experimentales.

Cuadro 4. Especies de reptiles registradas como hospederos de *Gnathostoma* spp. en México.

Reptiles	Especie nematodo	Localidad	Autor
<i>Boa constrictor</i>	<i>Gnathostoma</i> sp.	Temascal, Oaxaca.	Lamothe-Argumedo 1997.
<i>Crocodylus moreletii</i>	<i>Gnathostoma</i> sp.	Cerro de Oro, Oaxaca	Lamothe-Argumedo 1997.
<i>Kinosternon integrum</i>	<i>Gnathostoma binucleatum</i>	Tres Palos, Guerrero.	Sánchez Miranda <i>et al.</i> 2001. ¹⁰
	<i>Gnathostoma turgidum</i>	Tres Palos, Guerrero.	Sánchez Miranda <i>et al.</i> 2001. ¹⁰
<i>Nerodia rhombifera</i>	<i>Gnathostoma</i> sp.	Tlacotalpan, Veracruz.	Moreno-Sánchez <i>et al.</i> 1996. ⁹
<i>Sturotypus salvinii</i>	<i>Gnathostoma</i> sp.	Cerro de Oro, Oaxaca.	Lamothe-Argumedo 1997.
<i>S. triporcatus</i>	<i>Gnathostoma binucleatum</i>	Temascal, Oaxaca.	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> 1992. ⁸
	<i>Gnathostoma</i> sp.	Cerro de Oro, Oaxaca.	Lamothe-Argumedo 1997.
<i>Tamnopis valida</i>	<i>Gnathostoma binucleatum</i>	Tres Palos, Guerrero.	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> 2001. ⁴
<i>Trachemys scripta</i>	<i>Gnathostoma binucleatum</i>	Temascal, Oaxaca.	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> 1992. ⁸
	<i>Gnathostoma</i> sp.		Lamothe-Argumedo 1997.

Cadro 5. Especies de aves registradas como hospederos de *Gnathostoma* spp. en México.

Aves	Especie nematodo	Localidad	Autor
<i>Anhinga anhinga</i>	<i>Gnathostoma</i> sp	Sinaloa.	Díaz-Camacho <i>et al.</i> 2001 ³
<i>Ardea herodias</i>	<i>Gnathostoma</i> sp	Sinaloa.	Díaz-Camacho <i>et al.</i> 2001 ³
	<i>Gnathostoma</i> sp	La Pesca, Rosamorada, Nayarit.	Alvarez-Guerrero 2000. ⁵
	<i>Gnathostoma</i> sp.	Temascal, Oaxaca.	Lamothe-Argumedo 1997.
<i>Bubo virginianus</i>	<i>Gnathostoma binucleatum</i>	Centla, Tabasco.	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> 2001. ⁶

Cuadro 5. Continuación.

<i>Casmerodius albus</i>	<i>Gnathostoma binucleatum</i>	Centla, Tabasco.	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> 2001. ⁶
	<i>Gnathostoma binucleatum</i>	Nayarit.	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> 2001. ⁴
	<i>Gnathostoma binucleatum</i>	Tres Palos, Guerrero.	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> 2001. ⁴
<i>Coragyps atratus</i>	<i>Gnathostoma binucleatum</i>	Temascal, Oaxaca.	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> 1992. ⁸
	<i>Gnathostoma binucleatum</i>	Centla, Tabasco.	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> 2001. ⁶
<i>Egretta alba</i>	<i>Gnathostoma</i> sp.	Cerro de Oro, Oaxaca.	Lamothe-Argumedo 1997.
	<i>Gnathostoma</i> sp.	Sinaloa.	Díaz-Camacho <i>et al.</i> 2001. ³
<i>E. thula</i>	<i>Gnathostoma</i> sp.	Cerro de Oro, Oaxaca.	Lamothe-Argumedo 1997.
	<i>Gnathostoma</i> sp.	Temascal, Oaxaca.	Lamothe-Argumedo 1997.
	<i>Gnathostoma</i> sp.	Tres Palos, Guerrero.	Bertoni-Ruiz 2001. ¹¹
	<i>Gnathostoma</i> sp.	Sinaloa.	Díaz-Camacho <i>et al.</i> 2001. ³
<i>Nycticorax nycticorax</i>	<i>Gnathostoma</i> sp.	Cerro de Oro, Oaxaca.	Lamothe-Argumedo 1997.
	<i>Gnathostoma</i> sp.	Sinaloa.	Díaz-Camacho <i>et al.</i> 2001. ³
<i>Pelecanus</i> sp.	<i>Gnathostoma</i> sp.	Temascal, Oaxaca.	Akahane <i>et al.</i> 1994.
<i>Pelecanus erythrorhynchus</i>	<i>Gnathostoma binucleatum</i>	Temascal, Oaxaca.	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> 1992. ⁸
	<i>Gnathostoma</i> sp.	Temascal, Oaxaca.	Lamothe-Argumedo 1997.
	<i>Gnathostoma</i> sp.	La Pesca, Rosamorada, Nayarit.	Alvarez-Guerrero 2000. ⁵
	<i>Gnathostoma</i> sp.	Sinaloa.	Díaz-Camacho <i>et al.</i> 2001. ³
<i>P. occidentalis</i>	<i>Gnathostoma</i> sp.	Sinaloa.	Díaz-Camacho <i>et al.</i> 2001. ³
<i>Phalacrocorax auritus</i>	<i>Gnathostoma binucleatum</i>	Nayarit.	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> 2001. ⁴
<i>P. olivaceus</i>	<i>Gnathostoma</i> sp.	Temascal, Oaxaca.	Lamothe-Argumedo 1997.
	<i>Gnathostoma</i> sp.	Agua Brava, Nayarit.	Alvarez-Guerrero 2000. ⁵
	<i>Gnathostoma</i> sp.	Sinaloa	Díaz-Camacho <i>et al.</i> 2001. ³

Cuadro 5. Continuación.

<i>Polyborus plancus</i>	<i>Gnathostoma binucleatum</i>	Tlacotalpan, Veracruz.	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> 2001. ⁴
<i>Pandion haliaetus</i>	<i>Gnathostoma</i> sp.	Cerro de Oro, Oaxaca.	Lamothe-Argumedo 1997.
<i>Tigrisoma lineatum</i>	<i>Gnathostoma</i> sp.	Cerro de Oro, Oaxaca.	Lamothe-Argumedo 1997.

Cuadro 6. Especies de mamíferos registradas como hospederos de *Gnathostoma* spp. en México.

Mamíferos	Especie de nematodo	Localidad	Autor
<i>Canis familiaris</i>	<i>Gnathostoma binucleatum</i>	Centla, Tabasco.	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> 2001. ⁶
	<i>Gnathostoma</i> cf. <i>binucleatum</i> *		Koga <i>et al.</i> 1999.
	<i>Gnathostoma</i> sp. (huevos)	Temascal, Oaxaca.	Acevedo-Hernández <i>et al.</i> 1988.
<i>Didelphis</i> sp.	<i>Gnathostoma turgidum</i> .	Temascal, Oaxaca.	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> 1991. ¹⁴
<i>D. marsupialis</i>	<i>Gnathostoma spinigerum</i> **	Jaltenango, Chiapas.	Caballero y Caballero 1958.
	<i>Gnathostoma spinigerum</i> ***	Chamela, Jalisco.	Bravo-Hollis & Caballero-Deloya 1979
	<i>Gnathostoma</i> sp. III.	Temascal, Oaxaca.	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> 2000.
<i>D. virginiana</i>	<i>Gnathostoma</i> sp.	Colima, Colima.	Cruz-Reyes <i>et al.</i> 1997.
	<i>Gnathostoma</i> sp.	Tres Palos, Guerrero.	Bertoni-Ruiz 2001. ¹¹
	<i>Gnathostoma</i> sp.	Villahermosa, Tabasco.	Rangel <i>et al.</i> 1994 (en Lamothe-Argumedo 1997)
	<i>Gnathostoma turgidum</i>	Temascal, Oaxaca.	Lamothe-Argumedo <i>et al.</i> 1998.
	<i>Gnathostoma procyonis</i> ***	Morelos.	Ortiz-Villaseñor <i>et al.</i> 1990. ²
	<i>Gnathostoma turgidum</i>	Tres Palos, Guerrero,	Sánchez Miranda <i>et al.</i> 2001. ¹⁰
	<i>Gnathostoma turgidum</i>	Temascal, Oaxaca.	Akahane <i>et al.</i> 1999.

<i>Felis catus</i>	<i>Gnathostoma</i> sp.*		Medina-Veneces 1988 ¹⁵
	<i>Gnathostoma binucleatum</i>	Temascal, Oaxaca..	Almeyda-Artigas 1991.
	<i>Gnathostoma binucleatum</i>	Temascal, Oaxaca..	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> 1995.
	<i>Gnathostoma</i> sp.*	Nayarit.	Alvarez-Guerrero 2000. ⁵
<i>Leopardus pardalis</i>	<i>Gnathostoma binucleatum</i>	Temascal, Oaxaca.	Almeyda-Artigas 1991.
<i>Philander opossum</i>	<i>Gnathostoma</i> sp. (larva)	Cerro de Oro, Oaxaca.	Lamothe-Argumedo 1997.
	<i>Gnathostoma turgidum</i>	Cuenca del Río Papaloapan Ver.	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> 1991. ¹⁴
	<i>Gnathostoma</i> sp. II.	Tlacotalpan, Veracruz.	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> 2000.
<i>Procyon lotor</i>	<i>Gnathostoma procyonis</i>	Tlacotalpan, Veracruz.	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> 1994.
	<i>Gnathostoma binucleatum</i>	Tlacotalpan, Veracruz.	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> 1994.
	(larva)		
	<i>Gnathostoma</i> sp. I.	Tlacotalpan, Veracruz.	Almeyda-Artigas <i>et al.</i> 2000.
<i>Sus scrofa domesticus</i>	<i>Gnathostoma</i> sp.(huevos)	Temascal, Oaxaca.	Acevedo-Hernández <i>et al.</i> 1988.

*. Ejemplares obtenidos mediante infecciones experimentales.

**. La revisión de este ejemplar lo reasigna como *G. turgidum*. (Lamothe-Argumedo *et al.*, 1998)

***. Es necesaria la revisión de los ejemplares ya que el registro es dudoso.

¹ Díaz-Camacho S. P., Hilario E., S. Sánchez, J. Ríos, C. De la Cruz, M. Zazueta, S. Bayliss & H. Akahane. 2001. Investigación de hospederos naturales de *Gnathostoma* spp. en Sinaloa, México. Mem. III Encuentro Nacional sobre Gnathostomiasis. Tepic, Nayarit, México.

⁴ Almeyda-Artigas R. J., M. A. Mosqueda-Cabrera, L. Carranza-Calderón, E. Sánchez-Miranda & H. E. Ortiz-Najera. 2001. Análisis comparativo de larvas de tercer estadio avanzado de *Gnathostoma binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991 (Nematoda: Spirurida) aislada de vertebrados de las costas del Golfo de México y del Océano Pacífico. Mem. III Encuentro Nacional sobre Gnathostomiasis. Tepic, Nayarit, México.

⁵ Álvarez-Guerrero C. 2000. Estudio de la gnathostomiasis en el Estado de Nayarit. Tesis de Maestría, Universidad de Colima, México. 73 pp.

⁶ Almeyda-Artigas R. J., M. A. Mosqueda-Cabrera, L. Carranza-Calderón & H. Ortiz-Najera. 2001. Hallazgo de *Gnathostoma binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991 (Nematoda: Spirurida) en vertebrados de la Reserva de la Biosfera "Pantanos de Centla", Tabasco, México. Mem. III Encuentro Nacional sobre Gnathostomiasis. Tepic, Nayarit, México.

⁷ Cruz-Reyes A., A. Zepeda, A. Pérez & J. Baquera. 1997. Hallazgo de un adulto hembra de *Gnathostoma* sp. (Nematoda: Spirurida) en el estómago de *Didelphis virginiana* (Marsupiala: Didelphidae) en el Municipio de Colima, Colima, México. Mem. I y II Encuentro Nacional sobre Gnathostomosis, Culiacán, Sinaloa, México.

- ⁸ Almeyda-Artigas R. J., M. E. Hernández-Viciconti & G. Saldaña-Martínez. 1992. El papel de los vertebrados como hospederos de la larva de tercer estadio avanzado de *Gnathostoma binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991 (Nematoda: Spirurida) en la presa "Presidente Miguel Alemán", Temascal, Oaxaca. Mem. CONAPAR, Cuernavaca, Morelos, México.
- ⁹ Moreno-Sánchez A. D., S. Moreno-Flores, R. J. Almeyda-Artigas, M. A. Mosqueda-Cabrera & E. Sánchez-Núñez. 1996. Nuevos hospederos paraténicos de *Gnathostoma* spp. (Nematoda: Spirurida) en Tlacotalpan, Veracruz. II.-Reptilia: *Gnathostoma* sp en *Nerodia rhombifera werleri* Conant, 1953 (Squamata: Colubridae). Mem. XII CONAPAR, México.
- ¹⁰ Sánchez-Miranda E., M. A. Mosqueda-Cabrera, L. Carranza-Calderón & R. J. Almeyda-Artigas. 2001. Primera descripción de la larva de tercer estadio avanzado de *Gnathostoma turgidum* Stessich, 1902 (Nematoda: Spirurida) a partir de formas naturales y experimentales. Memorias XVI Congreso Nacional de Zoología, Zacatecas, México.
- ¹¹ Bertoni-Ruiz F. 2001. Gnatostomiasis en vertebrados silvestres de la laguna de Tres Palos, Acapulco, Guerrero. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 62 pp.
- ¹² Almeyda-Artigas R. J., M. A. Mosqueda-Cabrera, V. A. Acosta-Hernández, L. Alonzo-Díaz, M. Castañeda-Sánchez & V. Zárate-Ramírez. 1995. Desarrollo larvario experimental de *Gnathostoma procyonis* Chandler, 1942 (Nematoda: Spirurida) de las inmediaciones de Tlacotalpan, Veracruz. XII Congreso Nacional de Zoología, Morelia, Michoacán, México.
- ¹³ Almeyda-Artigas R. J., M. A. Mosqueda-Cabrera, I. H. González-Santana, D. Cárdenas-González, J. F. Olguín-Islas & F. Balbuena-Medina. 2001. Comparación morfológica entre larvas de tercer estadio avanzado de *Gnathostoma binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991 (Nematoda) experimentales y naturales aisladas de Peces de los Pantanos de Centla. Mem. III Encuentro Nacional sobre Gnatostomiasis. Tepic, Nayarit, México.
- ¹⁴ Almeyda-Artigas R. J., V. Acosta-Hernández, L. Alonzo-Díaz, M. Castañeda-Sánchez & R. V. Zárate. 1991. Nuevos registros helmintológicos en vertebrados de la parte baja de la Cuenca del Papaloapan, Veracruz. III. Mamalia. Memorias CONAPAR. Universidad Autónoma de Querétaro. 22-27 Agosto 1994.
- ¹⁵ Medina Venegas R. 1988. Estudio de la Larva de Tercer Estadio de *Gnathostoma* sp. En Peces Dulceacuícolas de Temascal Oaxaca, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 53 pp.

d) Gnatostomosis humana

Gnathostoma spinigerum es la especie de mayor importancia médica de entre las especies del género ya que es considerada como la responsable de la mayoría de los casos de gnatostomosis humana en países como Japón hasta antes de 1970 (Nawa 1999)¹⁶, así como en la India, Sri Lanka, Burma, Tailandia, Malasia, Indonesia, Filipinas, China, Vietnam, Australia e Israel (Lamothe-Argumedo, 1992; Lamothe-Argumedo y Osorio-Sarabia, 1998). Sin embargo otras cinco especies del género han sido registradas como parásitas del hombre: *G. doloresi* (Ogata *et al.*, 1988), *G. nipponicum* (Ando *et al.*, 1988; Sato *et al.*, 1992), *G. hispidum* (Akahane *et al.*, 1982), *G. binucleatum* (Almeyda-Artigas, 1991) y posiblemente *G. malaysiae* (Nomura *et al.*, 2000) Estos resultados sugieren que cualquier especie de *Gnathostoma* pueda causar la enfermedad en humanos (Nawa 1999¹⁶; Ogata *et al.*, 1998)

Levinsen 1889 (in Miyazaki 1960), registró el primer caso de esta helmintiasis en humanos en una mujer de la raza Tai de Bangkok, Tailandia. El agente causal fue un nemátodo denominado *Cheiracanthus stamensis*. Tiempo después, esta designación devino en sinonimia al comprobarse que 53 años antes Owen ya había descrito la especie como *G. spinigerum*. Desde ese momento, registros de esta helmintiasis se han presentado en distintos países de Asia, Europa, América y Oceanía.

Los primeros casos de gnatostomosis humana en América fueron registrados en México por Peláez y Pérez-Reyes (1970) al estudiar los parásitos obtenidos de dos pacientes mexicanos que nunca habían salido del país, por lo que se consideraron como casos autóctonos. El primero correspondió a un hombre de 25 años de edad, radicado en el Distrito Federal desde la edad de un año, el parásito se encontraba formando un lipoma subcutáneo en la pared abdominal; el segundo caso fue el de un hombre de 27 años de edad, radicado en Culiacán, Sinaloa, que en los seis meses anteriores a la intervención quirúrgica, había recorrido varios estados del centro del país, con algún tiempo de residencia en Guadalajara, Jalisco y a quien se le extrajo una larva completa de la cámara anterior del ojo izquierdo. Los autores señalaron la similitud de las larvas encontradas con la descripción de *G. spinigerum*, pero prefirieron no definir la especie debido a la gran semejanza entre *G. spinigerum* y otras especies parásitas de animales silvestres del norte y sur de América.

Posteriormente, Martínez-Cruz *et al.* (1989) informó de aproximadamente 70 infecciones humanas en la Cuenca del Río Papaloapan, registradas a partir de 1977, donde señalan el papel que representa en la parasitosis la ingesta de pescados infectados preparados a manera de ceviche Tilapia.

¹⁶ Nawa Y. 1999. Estudios clínicos e inmunodiagnósticos de *Gnathostomosis* en Japón. Mem. II. Encuentro sobre *Gnathostomosis*. 17 y 18 de Septiembre de 1999. Culiacán Sinaloa, México.

A partir de estos primeros registros, el número de pacientes se ha incrementado drásticamente; en la actualidad, las zonas endémicas incluyen siete áreas. Tres en la costa del Pacífico: Acapulco, Guerrero, Tepic, Nayarit y Culiacán, Sinaloa. Las otras áreas son: Temascal, Tuxtepec y Cerro de Oro en Oaxaca; Tierra Blanca, Veracruz; Reserva de la Biosfera "Pantanos de Centla", Tabasco y Tampico, Tamaulipas, también se han registrado casos aislados en Jalisco, Aguascalientes y Baja California (Lamothe-Argumedo *et al.*, 2001). De estas, la zona de mayor prevalencia es Nayarit en donde se han registrado casos ininterrumpidamente desde 1988, ascendiendo un número aproximado de 3600 (Alvarez-Guerrero 1999)⁵. En la actualidad se estima que han ocurrido más de 8000 casos en el país (Lamothe-Argumedo *et al.*, 2001).

El diagnóstico más frecuente es el clínico, cuando la L₃A es ingerida por el humano, ésta perfora la pared intestinal y migra al hígado, durante éste acontecimiento los pacientes pueden presentar fiebre, dolor epigástrico, náuseas y vómito. Posteriormente, la larva puede dirigirse a cualquier parte del cuerpo y la sintomatología dependerá del área afectada, éste proceso ocasiona un síndrome de larva migrans y las manifestaciones pueden ser cutáneas, oculares, neurológicas, viscerales o una combinación de ellas (Díaz-Camacho *et al.* 2000). Es además, de importancia conocer los hábitos alimenticios y residencia en zonas endémicas de los pacientes. Colateralmente se realiza conteo de eosinófilos en sangre. El estudio histopatológico y cirugía de la piel para la extracción y determinación de larvas es poco frecuente, siendo este el único método de diagnóstico certero.

La gnatostomosis subcutánea es la forma más frecuente en que se presenta la helmintiasis, pero también se ha registrado la gnatostomosis ocular. En México no se ha notificado ningún caso de invasión al sistema nervioso central como en Tailandia y Malasia (Lamothe-Argumedo, 1999).

En resumen, de los 16 estados del país de los que se tiene algún tipo de referencia de la presencia de *Gnathostoma* spp, en 10 de ellos se tienen registrados casos de gnatostomosis humana y en 14 se conoce la parasitosis en animales silvestres (Ver cuadro 7).

Cuadro 7. Presencia de *Gnathostoma* spp. en humanos y en animales silvestres en el territorio mexicano.

Estado	Humana*	Silvestre
Aguascalientes		
Baja California Norte		
Chiapas		
Colima		
Guerrero		
Jalisco		
Michoacán		
Morelos		
Nayarit		
Oaxaca		
Quintana Roo		
Sinaloa		
Tabasco		
Tamaulipas		
Veracruz		
Yucatán		

=presente. *Basados en Lamothe-Argumedo *et al.* 2001.

e) Estudio molecular

El uso de caracteres moleculares aplicados al estudio taxonómico de los nematodos es relativamente reciente y ha permitido resolver problemas taxonómicos concretos, particularmente en los casos en los que el estudio morfométrico ha sido complicado (Chilton *et al.*, 1995; Stevenson *et al.*, 1995). Asimismo, se han utilizado este tipo de herramientas al describir especies y para realizar estudios filogenéticos (Stock *et al.*, 2001). Particularmente en el caso del género *Gnathostoma* en México se han realizado pocos trabajos de este tipo (Almeyda-Artigas *et al.*, 2000; Martínez-Salazar 2001¹⁷, León-Régagnon *et al.* 2002; 2002¹⁸; Kifune *et al.*, 2002). En términos generales se ha concluido que el segundo espaciador interno (ITS-2) ha mostrado buenos resultados para diferenciar especies, ya que muestra poca variación intraespecífica contrariamente a la alta variación interespecífica; sin embargo, a la fecha no se han propuesto marcadores moleculares que puedan servir para estudios filogenéticos.

¹⁷ Martínez-Salazar E. A. 2001. 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. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 76 pp.

¹⁸ León-Régagnon V., E. Martínez-Salazar, A. Ocegüera-Figueroa. 2002. Sistemática molecular del género *Gnathostoma*. Proceedings of the first international meeting on Gnathostomosis. 14-16 marzo. Culiacán, Sinaloa, México.

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Determinar la o las especies de *Gnathostoma* presentes en peces de consumo humano y su posible papel como agente causal de la gnatostomosis humana en México.

Objetivos particulares:

-Analizar y caracterizar morfométricamente larvas del tercer estadio de nemátodos del género *Gnathostoma* de diversas localidades de México.

-Obtener secuencias del ADN ribosomal de larvas representativas de cada localidad.

-Comparar los resultados morfológicos y moleculares obtenidos en este trabajo con los datos previamente publicados.

METODO

a) Recolección de Material

Se realizaron siete salidas al campo entre el 6 de noviembre de 2000 y el 9 de septiembre de 2001 a los estados de Chiapas*, Colima*, Guerrero, Nayarit, Oaxaca, Tabasco y Veracruz. (Ver figura 2).

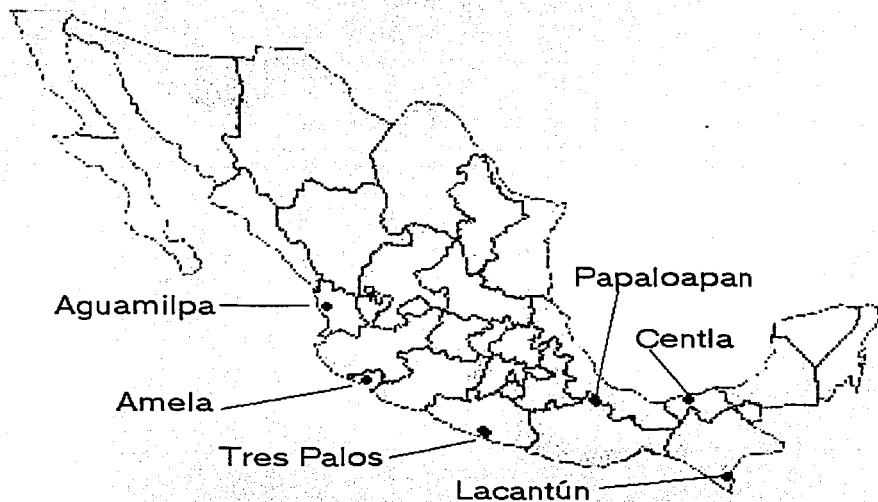


Figura 2. Los puntos negros muestran las localidades de donde se muestreo en búsqueda de *Gnathostoma* spp.

* En estas localidades todos los exámenes de hospederos resultaron negativos, por lo tanto no se describen.

b) Area de estudio

Las localidades estudiadas en este trabajo, ya sea por recolecta en el campo o por compra en centros urbanos, se han organizado por regiones y lugar de compra de la siguiente manera:

Cuenca del Papaloapan: Peces adquiridos directamente en la Presa de Temascal "Miguel Alemán Valdéz", en la Presa Cerro de Oro "Miguel de la Madrid" y en San Pedro Ixcatlán, así como los comprados en Tuxtepec, Oaxaca y en Tierra Blanca, Veracruz, que proceden de los embalses antes señalados y del río Papaloapan, en el estado de Veracruz.

Nayarit: Presa de Aguamilpa, Nayarit.

Guerrero: Laguna de Tres Palos

Tabasco: Peces adquiridos directamente en la "Reserva de la Biosfera Pantanos de Centla", Tabasco.

Procedencia Tabasco: Peces adquiridos en Temascal, Oaxaca capturados en el estado de Tabasco.

Descripción de las localidades

La cuenca alta del Papaloapan se localiza al noreste del estado de Oaxaca. Esta representada por los vasos de las presas de Temascal y de Cerro de Oro. Se localiza entre los 18° 11' y 18° 25' N y entre los 96° 21' y 96° 45' W. Su principal afluente es el río "Tonto". La temperatura media anual es de 25.5 °C, con una precipitación anual promedio de 2790.6 mm. El clima general es cálido húmedo con lluvias durante el verano (Tomado de: Medina-Vences 1988.¹⁵)

Nayarit: Presa de Aguamilpa. Se localiza entre las coordenadas geográficas 21° 50'32''N y 104° 46'20''W, en el municipio de Tepic, región central del estado de Nayarit, en la Sierra Madre Occidental. Rodeada por la sierra del Nayar al oriente y las sierras de San Pedro y San Juan al sur, la sierra de Huanacaxtle al norte y la planicie costera al occidente. La temperatura media anual fluctúa alrededor de los 27 °C y la precipitación promedio anual es de 893 mm. El régimen climático que domina la zona es cálido subhúmedo Awo (w), con lluvias en verano y un porcentaje de lluvia invernal entre 5 y 10.2 mm. (García y Falcón, 1974; C.F.E., 1992).

Guerrero: Laguna de Tres Palos. Se ubica en la planicie costera del estado de Guerrero, entre las coordenadas 16°43' a 16° 48' N y 99° 38' a 99° 47' W en el Municipio de Acapulco de Juárez. El clima de la región es tropical subhúmedo AW con lluvias en Verano. La temperatura media anual fluctúa alrededor de los 22 °C y una precipitación anual promedio de 1200 mm. Es una laguna predominantemente oligohalina que pertenece a la región hidrológica Costa Grande; Su principal afluente es el río Sabanas que penetra a ella por el oeste (Diego y Fonseca, 1994)).

Tabasco: Laguna de San Pedrito se localiza dentro de la Reserva de la Biósfera, Pantanos de Centla, en la llanura aluvial del delta de los ríos Grijalva-Usumacinta entre las coordenadas 18°21'N y 92° 43'O, en el Municipio de Centla, Tabasco. Presenta tres tipos de clima del grupo de los climas subhúmedos con abundantes lluvias en verano, con una época marcada seca en el invierno y una corta durante el verano. La temperatura media anual es de 25°C y la precipitación media anual es de 1601.3 mm. (López-Hernández y Pérez-López 1993).

c) Examen helmintológico

Peces

Fueron adquiridos directamente con los pescadores, a pie de playa o en mercados de centros urbanos en donde se concentra la captura de las cooperativas de pescadores circundantes. Cada uno de los hospederos fue determinado, pesado, medido, sexado y etiquetado. Con el uso de un cuchillo se separó todo el músculo tanto del esqueleto como de la piel haciendo cortes a manera de filete; el músculo fue macerado individualmente con un molino manual para carne con el fin de ser revisado en pequeñas porciones, cada una de las cuales fue presionada entre dos vidrios de 15 por 10 cm por 1 cm de ancho y se revisó a contraluz con el uso de lámparas con focos de 60 Watts. El esqueleto y la piel se analizaron directamente a contraluz.

Mamíferos

Se recolectaron utilizando trampas con cebo a base de sardina enlatada, vainilla, plátano y granola. Se sacrificaron con sobredosis de éter, registrándose sus principales datos merísticos. El estómago y el esófago se extrajeron mediante un corte longitudinal en la superficie ventral y fueron examinados externamente buscando posibles lesiones; a continuación se procedió a abrir cada uno de ellos buscando las criptas características. También se revisó el hígado, ya que es el órgano donde el parásito madura para después alojarse en el estómago o esófago.

d) Examen morfométrico y molecular de *Gnathostoma* sp.

Las larvas de tercer estadio avanzado fueron fijadas en alcohol al 70% caliente y conservadas en el mismo líquido; se estudiaron utilizando diversas herramientas: 47 ejemplares fueron estudiados morfométricamente de acuerdo con los caracteres utilizados por Lamothe-Argumedo *et al.* (1989) bajo el microscopio óptico, usando en la mayoría de los casos lactofenol de Amman como aclarante. De ellos, dos ejemplares fueron deshidratados por medio de inmersión en alcoholes graduales, secados con CO₂ a punto crítico y finalmente cubiertos por una mezcla de Oro-Paladio

(60-40). Se colocaron sobre portamuestras para obtener fotografías de microscopía electrónica de barrido con el equipo Hitachi S-2460N en el Instituto de Biología, UNAM. Seis ejemplares no aclarados en lactofenol, fueron sometidos a extracción de ADN mediante el método estándar de extracción fenol/cloroformo (Hillis *et al.*, 1996) que se muestra a continuación:

Metodo de extracción Fenol-Cloroformo.

- 1.- Fragmentar el tejido y colocarlo en un tubo eppendorf de 2.0 ml.
- 2.-Adicionar al tubo:
 - 500 ml de Amortiguador Sodio cloro-Tris, Etileno diamino tetra-acetato (STE.)
 - 25 ml de 10 mg/ml de Proteinasa K.
 - 75 ml de Sodio dodecyl sulfato (SDS) 10%
- 3.-Incubar por 24 h. a 50 °C . Agitar ocasionalmente durante la incubación.
- 4.-Agregar 600 µl de Fenol. Mezclar suavemente e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Mezclar cada vez que las fases se separen.
- 5.-Centrifugar a máxima velocidad (7000 g) por 5 minutos.
- 6.-Remover cuidadosamente la capa acuosa superior con una micropipeta y transferirla a un tubo limpio.
- 7.-Repetir los pasos 4-6.
- 8.-Agregar 600µl de Cloroformo isoamyl alcohol (CI), mezclar suavemente e incubar a temperatura ambiente por 2 minutos. Evitar que las fases se separen.
- 9.-Centrifugar a máxima velocidad por 3 minutos.
- 10.-Remover la capa superior acuosa con una micropipeta y transferirla a un tubo limpio sin alterar las fases.
- 11.-Agregar 1/10 de la muestra (aproximadamente 45µl) de 2M de NaCl y 2.5 veces el volumen de la muestra de alcohol 96% frío.
- 12.-Precipitar el ADN a -20°C por 2 horas como mínimo.
- 13.-Centrifugar el precipitado por 10 minutos a velocidad alta. Lavar el botón de ADN en alcohol al 70% y secar en una centrifuga con vacío.
- 14.-Suspender en 100µl de agua bi-distilada (ddH2O).

PCR (Reacción de la cadena de la polimerasa)

Preparar una mezcla maestra con las siguientes proporciones:

Primer 1	1 µl	X	(# muestras + control)
Primer 2	1 µl	X	(# muestras + control)
Buffer	2.5 µl	X	(# muestras + control)
dNTPs	2.5 µl	X	(# muestras + control)
MgCl2	0.8 µl	X	(# muestras + control)
Taq Polimerasa	0.4 µl	X	(# muestras + control)

Dividir el volumen resultante entre el número de muestras más el control, y repartirlo en los tubos de 0.2 ml.

Agregar a cada tubo 1.0 µl del templado de ADN (excepto al control)

Agregar a cada tubo:

Agua destilada para completar un volumen total de 25 µl.

Se utilizaron los iniciadores NEWS2 (delantero) 5'TGTGTCGATGAAGAACGCAG e ITS2-RIXO (reversa) 5'TTCTATGCTTAAATTCAGGGG (Gasser y Hoste 1995). El programa de amplificación fue el siguiente: 1 min a 94 °C; 35 ciclos de 30 s a 92 °C, 30 s a 45 °C y 1 min a 72 °C; elongación final de 4 min a 72 °C. Los productos de la PCR se secuenciaron directamente con un secuenciador automático ABI Prism 310 y se alinearon con las secuencias de *G. binucleatum* (Genbank Z97072) y *G. turgidum* (Genbank Z97175).

Un ejemplar adulto inmaduro fue fijado y conservado en alcohol 70%. Se midió para su estudio morfométrico en el microscopio óptico usando un ocular graduado, posteriormente fue seccionado en tres partes: la región anterior (bulbo, cuello y una pequeña porción de cuerpo), la región media del cuerpo y la porción caudal. La primera y la última fueron aclaradas con lactofenol de Amman, dibujadas y medidas. La porción media del cuerpo fue disectada sustrayéndole los órganos internos, que fueron procesados según las técnicas de extracción de ADN descrito con anterioridad. La cutícula fue observada bajo microscopio óptico.

El material de referencia fue depositado en la Colección Nacional de Helmintos (CNHE), Instituto de Biología, UNAM.

RESULTADOS

a) Registro de hospederos.

En los cuadros 8 y 9 se muestran las especies de vertebrados colectadas durante la realización de este trabajo, así como las especies que resultaron positivas a la presencia de parásitos del género *Gnathostoma*.

En total se revisaron 784 ejemplares pertenecientes a 23 especies de peces de agua dulce y salobre, de las cuales solo cinco resultaron positivas a *Gnathostoma*; tres ciclidos: *Petenia splendida*, *Cichlasoma managuensis* y *C. beani*; un eleotrído: *G. dormitor* y un árido: *Ariopsis guatemalensis*. Las larvas se obtuvieron de peces de cuatro regiones: Cuenca del Papaloapan, Tabasco, Nayarit y Guerrero. Así mismo se detectó la infección en peces comprados en Oaxaca procedentes de Tabasco. Se revisaron ocho ejemplares de mamíferos pertenecientes a cinco taxa de mamíferos, obteniéndose únicamente un ejemplar inmaduro de *G. turgidum* macho en el hígado de un tlacuache *Didelphis marsupialis*, de las inmediaciones de la presa de Temascal, Oaxaca.

En este trabajo se establece a la presa de Aguamilpa, Nayarit como una nueva localidad de colecta para el nematodo y por lo tanto a *Cichlasoma beani* como nuevo registro de hospedero en la misma. Así también, se registra a *Petenia splendida* de la reserva de la Biósfera Pantanos de Centla, Tabasco como nuevo hospedero en la localidad.

A pesar de que el tamaño de muestra de los hospederos no es homogénea tanto en número de ejemplares como en las fechas de recolecta, vale la pena señalar que los ejemplares positivos pertenecen a las tres familias que han sido registradas por diversos autores en estudios previos como hospederos de *Gnathostoma*; Cichlidae, Ariidae y Eleotridae (Lamothe-Argumedo *et al.*, 1989; Almeyda-Artigas 1991; León-Régagnon *et al.*, 2000, 2002¹⁸; Alvarez-Guerrero y Lamothe-Argumedo, 2000). El mayor número de larvas fue registrado para *P. splendida* (Cichlidae) con 33 larvas de Temascal y Tabasco y para *G. dormitor* (Eleotridae) con 17 larvas de Temascal en las mismas localidades.

Cuadro 8. Especies de peces revisados y datos de colecta.

Especie	Nombre común	Lugar de compra	Localidad de origen	Fecha de colecta	revisados/positivos/larvas
<i>Ariopsis guatemalensis</i>	Cuatete	Tres Palos, Guerrero.	L. Tres Palos, Guerrero.	19/07/01	36/1/4
<i>A. planiceps</i>	Bagre	Mercado Tecomán, Colima	Mercado Tecomán, Colima	23/09/01	1/0/0
<i>A. seemani</i>	Bagre	L. de Amela Colima	L. Amela Colima	24/09/01	4/0/0
<i>Bagre panamensis</i>	Bagre	Mercado Tecomán, Colima	Mercado Tecomán, Colima	23/09/01	10/0/0
<i>Brycon guatemalensis</i>	Macabil	Rio Lacantun, Chiapas.	Rio Lacantun, Chiapas.	19/12/00	1/0/0
<i>Cichlasoma</i> sp.	Mojarra	Temascal, Oaxaca.	Temascal, Oaxaca.	9/09/01	4/0/0
<i>Cichlasoma trimaculatum</i>	Charra	L. Tres Palos, Guerrero.	L. Tres Palos, Guerrero.	19/07/01	11/0/0
<i>C. beani</i>	Criolla	Aguamilpa, Nayarit.	P. Aguamilpa, Nayarit.	23/09/01	15/1/1
<i>C. managuensis</i>	Pinta	Centla, Tabasco.	Centla, Tabasco.	19/03/01	35/3/3
<i>Cathorops aguadulce</i>	Bocachica	Temascal, Oaxaca	Temascal, Oaxaca	9/09/01	26/0/0
<i>Diapterus peruvianus</i>	Mojarra	L. Cuyutlán, Colima.	L. Cuyutlán, Colima.	23/09/01	12/0/0
<i>Dormitator latifrons</i>	Popoyote	L. Tres Palos, Guerrero.	L. Tres Palos, Guerrero.	19/07/01	21/0/0
	Chococo	L. Cuyutlán, Colima	L. Cuyutlán, Colima	23/09/01	5/0/0
		L. Amela, Colima.	L. Amela, Colima.	24/09/01	245/0/0
<i>Gobiomorus dormitor</i>	Guavina	Tierra Blanca, Veracruz.	Temascal, Oaxaca.	9/11/00	2/0/0
		Tuxtepec, Oaxaca.	Tabasco	13/11/00	34/3/3
		Centla, Tabasco.	Centla, Tabasco.	19/03/01	9/2/3

Cuadro 8. Continuación.

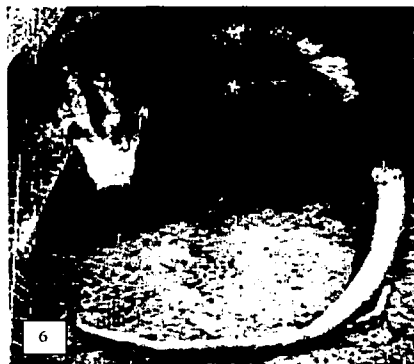
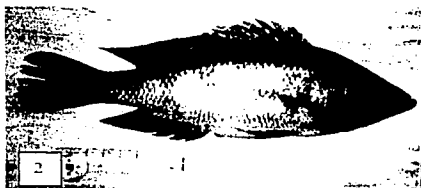
<i>G. dormitor</i>	Guavina	Tuxtepec, Oaxaca.	Tlacotalpan Veracruz.	25/05/01	15/1/1
		Tuxtepec, Oaxaca.	Tabasco	25/05/01	8/3/4
		Temascal, Oaxaca.	Temascal, Oaxaca. Y Tabasco	9/09/01	38/5/6
<i>G. maculatus</i>	Guavina	L. Tres Palos, Guerrero.	L. Tres Palos, Guerrero.	19/07/01	20/0/0
<i>Ictalurus furcatus</i>	Jolote	Temascal, Oaxaca.	Temascal, Oaxaca.	9/09/01	20/0/0
<i>Lutjanis. inermis</i>	Parga	Mercado Tecomán, Colima.	Mercado Tecomán, Colima.	23/09/01	2/0/0
<i>Micropterus salmoides</i>	Lobina	L. Aguamilpa, Nayarit.	L. Aguamilpa, Nayarit.	23/09/01	1/0/0
<i>Mugil cephalus</i>	Lisa	L. Cuyutlán, Colima.	L. Cuyutlán, Colima.	23/09/01	21/0/0
<i>Oligoplites altus</i>	Jurel	L. Cuyutlán, Colima.	L. Cuyutlán, Colima.	23/09/01	1/0/0
<i>Oreochromis sp.</i>	Tilapia	L. Aguamilpa, Nayarit.	L. Aguamilpa, Nayarit.	23/09/01	13/0/0
<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilapia	L. Cuyutlán, Colima.	L. Cuyutlán, Colima.	23/09/01	5/0/0
<i>Petenia splendida</i>	Tenguayaca	Cerro de Oro, Oaxaca.	Cerro de Oro, Oaxaca.	6/11/00	7/0/0
		Tierra Blanca, Veracruz.	Cerro de Oro, Oaxaca.	9/11/00	7/0/0
		Tierra Blanca, Veracruz.	Temascal, Oaxaca.	9/11/00	10/1/1
		Río Lacantun, Chiapas.	Río Lacantun. Chiapas.	19/12/00	4/0/0
		Tuxtepec Oaxaca.	Temascal Oaxac.	22/12/00	12/6/8
		Centla, Tabasco.	Centla, Tabasco.	18/03/01	58/9/9
		Ixcatlán, Oaxaca.	Ixcatlán, Oaxaca	23/05/01	1/0/0
		Temascal, Oaxaca.	Temascal, Oaxaca.	23/05/01	14/3/3
		Tuxtepec, Oaxaca.		23/05/01	11/3/3
		Tuxtepec, Oaxaca.	San Pedro Ixcatlán, Oaxaca.	25/05/01	14/6/9
	Tuxtepec, Oaxaca.	Temascal, Oaxaca.	25/05/01	1/0/0	

Cuadro 8. Continuación.

<i>P. splendida</i>	Tenguayaca	Tuxtepec, Oaxaca.	Cerro de Oro, Oax.	12/11/00	16/0/0
<i>Rhamdia guatemalensis</i>	Juil	Temascal, Oaxaca.	Temascal, Oaxaca.	9/09/01	12/0/0
<i>Strongylura notata</i>	Aguja	Temascal, Oaxaca.	Temascal, Oaxaca.	8/09/01	2/0/0

Cuadro 9. Especies de Mamíferos revisados y datos de colecta.

Especie	Nombre común	Muestra	Localidad	Fecha de colecta
<i>Dasyopus noveminctus</i>	Armadillo	1	Estero Rosamorada, Nayarit.	23/09/01
<i>Didelphis marsupialis</i>	Tlacuache	2	Temascal.	22/12/00 y 9/09/01
<i>Didelphis</i> sp.	Tlacuache	1	Estero Rosamorada, Nayarit.	23/09/01
<i>Philander opossum</i>	Cuatro ojillos	2	Temascal.	22/12/00
<i>Procyon lotor</i>	Mapache	2	Cuitlahuac y Nayarit.	9/09/01 y 23/09/01



Fotografías 1-6. Hospederos de *Gnathostoma* spp. en México.

Foto 1 *Gobiomorus dormitor*. Foto 2 *Petenia splendida*. Foto 3 *Cichlasoma managuense*. Foto 4 *Ariopsis guatemalensis*. Foto 5 *Cichlasoma beani*. 6. *Didelphis marsupialis*.

b) Caracterización morfológica de los ejemplares

Phylum Nematoda

Clase Secernentea

Orden Spirurida

Suborden Spirurina

Superfamilia Gnathostomatoidea

Familia Gnathostomatidae

Subfamilia Gnathostomatinae

Género *Gnathostoma* Owen, 1836

Especie *Gnathostoma binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991.

Descripción basada en 47 ejemplares, la mayoría de ellos se encontraron dentro de quistes translúcidos en la musculatura esquelética de peces que actúan como segundos hospederos intermediarios: en algunas ocasiones, los quistes eran mas gruesos y opacos, en los cuales no es posible ver el parásito a contraluz.

Las larvas son de color rojizo cuando vivas, una vez fijadas adquieren un color blanco amarillento. El cuerpo está dividido en dos regiones separadas por el cuello. El bulbo cefálico presenta cuatro anillos de ganchos rectangulares en su base y que proyectan sus puntas hacia el extremo posterior del cuerpo. La boca se encuentra en el extremo anterior flanqueada por dos labios con un par de papilas simples cada uno. El cuerpo está completamente cubierto por hileras de espinas simples cuyo número descende hacia la parte final del mismo, sin llegar a desaparecer.

La boca se comunica con el esófago que ocupa aproximadamente un tercio de la longitud total del cuerpo; éste se comunica al intestino que es de color pardo y finalmente desemboca al ano de posición subterminal ventral. El anillo nervioso periesofágico se sitúa aproximadamente a la altura de las papilas cervicales.

En el interior del bulbo cefálico se localizan cuatro cavidades (bayonetas) cada una de las cuales se comunica con un saco cervical que se extienden desde el cuello hasta el primer tercio del esófago.

Algunas hileras posteriores al cuello, casi siempre entre la hilera 13 y 15, se presentan un par de papilas cervicales situadas simétricamente a los lados del cuerpo, ligeramente posterior a éstas y en posición ventral se ubica el poro excretor. Al inicio del último tercio del cuerpo se presentan un par de papilas semejantes a las cervicales pero asimétricas, siendo la izquierda ligeramente anterior. A la misma altura, en algunas larvas se detectaron los esbozos del aparato reproductor femenino, cuya abertura es ventral. Los ejemplares de referencia fueron depositados en

la Colección Nacional de Helmintos (CNHE), Instituto de Biología, UNAM, México, con los números de catálogo: 4426 y 4427 para el material de Tabasco; 4515-4518 para los ejemplares de la cuenca del Papaloapan; 4510 de Nayarit; 4509 de Tres Palos y 4511-4514 para los ejemplares recuperados de peces comprados en Tuxtepec, Oaxaca cuya procedencia es el estado de Tabasco. Los ejemplares empleados para Microscopía Electrónica de Barrido también fueron depositados con el siguiente número de catálogo: 4521 y 4522. En las fotomicrografías 7-21 se muestran las L₃A obtenidas de los ejemplares por nosotros estudiadas y en la figura 4 se muestra el extremo anterior de una larva de *G. binucleatum* obtenida mediante el uso de la cámara clara.

Discusión

El estudio de las larvas de tercer estadio avanzado de *Gnathostoma* en México se encuentra todavía en sus primeras etapas. La determinación específica de las larvas encontradas en diversas especies de cordados, basándose únicamente en datos morfológicos ha sido realizada utilizando los caracteres empleados para diferenciar entre sí a los ejemplares asiáticos: número y forma de los ganchos del bulbo cefálico y número de núcleos por célula del epitelio intestinal (Akahane *et al.*, 1986). En los cuadros 10-14 se muestran los datos obtenidos a partir de las larvas estudiadas en este trabajo y en el cuadro 15 se les compara con cuatro especies del género, tres de ellas presentes en México. Vale la pena señalar que los datos de *G. procyonis* y *G. turgidum* deben ser tomados con cierta reserva, ya que el número de ejemplares en que se basó su descripción es muy reducido ($n=15$ y $n=31$ respectivamente), además de que en el segundo caso se trata de ejemplares obtenidos experimentalmente (Sánchez-Miranda *et al.*, 2001¹⁰). En cuanto a la longitud corporal, al parecer *G. turgidum* es menor que las demás especies, sin embargo, por observaciones efectuadas en el presente trabajo, sabemos que la longitud que alcanzan los organismos depende en gran medida de la fijación en alcohol, por lo cual no consideramos estos datos concluyentes para diferenciar a *G. turgidum* de sus congéneres, más aún considerando que provienen de una doble infección experimental. Por lo que respecta a las especies restantes, el intervalo de variación es tan amplio que su determinación con el uso de este carácter es imposible. El número de la hilera en la que se presentan las papilas cervicales y el poro excretor, así como el número total de hileras corporales son caracteres difícilmente evaluables, ya que no se conocen con exactitud en todas las especies y en las que se señalan, las diferencias son tan pequeñas que no permiten concluir nada al respecto. Por otro lado, las papilas cervicales se distribuyen simétricamente, pero es común observar en un mismo individuo desfases de 2 o más hileras. La diferenciación mediante la comparación entre el número de ganchos por anillo entre las distintas especies ha sido muy controvertido, lo que ha llevado a diversos autores a registrar sus hallazgos únicamente hasta el nivel de género (Lamothe-Argumedo *et al.*, 1989; Álvarez-Guerrero y Lamothe-Argumedo, 2000; López-Jiménez

García-Magaña, 2000; León-Regagnon *et al.*, 2000; Bertoni-Ruiz, 2002¹¹). Lo expuesto con anterioridad hace necesario y justifica la realización de un mayor número de estudios sobre la morfometría de las larvas para poder esgrimir caracteres que nos permitan diferenciar entre las especies americanas del género. No obstante, en la discusión general se expondrán las opiniones personales sobre la posibilidad de diferenciar las L₃A de *G. binucleatum* de sus congéneres. La determinación del material aquí estudiado fue realizado a partir de la comparación de la secuencia del segundo espaciador interno (ITS-2) del ADN nuclear del material (cuadro 16). Se obtuvieron secuencias de 423 pb que se muestran en la figura 3. En el cuadro 17 se presenta el porcentaje de similitud de las secuencias obtenidas en este trabajo y su comparación con la de *G. binucleatum* y en el apéndice 1 se muestra el alineamiento de las secuencias. El primer estudio sobre la variación intraespecífica de *G. binucleatum* (Almeyda-Artigas *et al.*, 2000), señalaba que el ITS-2 de todos los ejemplares eran idénticos; posteriormente, León-Regagnon *et al.* (2002¹⁸), registraron 99.08 % de similitud para la misma especie, con lo que se registraba por primera vez una ligera variación en este segmento. En el material que aquí presentamos, tres secuencias son idénticas a las de *G. binucleatum* disponible en GenBank y solo una de ellas, la proveniente de Tabasco, mostró una ligera variación con un porcentaje de similitud de más del 99%. Con base en lo anterior, consideramos que el material por nosotros estudiado corresponde a la especie *G. binucleatum*.

Cuadro 10. Datos morfométricos obtenidos de L₃A de peces dulceacuícolas de diversas localidades.
Longitud total/Ancho máximo/Ancho del bulbo/Largo del bulbo.

Especie	Tabasco Localidad.	Tabasco Mercado.	Cuenca Papaloapan.	Tres Palos, Guerrero.	Aguamilpa, Nayarit.
<i>G. dormitor.</i>	2.18 (2.05-2.27)n=3	3.88(2.9-4.61)n=15	3.42 n=1		
	0.4(0.38-0.43)	0.39(0.32-0.45)	0.45		
	0.21(0.17-0.23)	0.23(0.22-0.26)	0.24		
	0.091(0.087-0.094)	0.11(0.095-0.136)	0.12		
<i>P. splendida.</i>	4.32 n=1		3.97(2.31-5.2)n=21		
	0.45		0.4(0.34-0.53)		
	0.24		0.24(0.18-0.26)		
	0.11		0.1(0.085-0.12)		
<i>C. managuense.</i>	3.89(3.72-4.06) n=2				
	0.36(0.28-0.43)				
	0.22(0.2-0.25)				
	0.098(0.08-0.11)				
<i>A. guatemalensis.</i>				4.02(3.95-4.15)n=3	
				0.36(0.3-0.41)	
				0.23(0.22-0.24)	
				0.068(0.061-0.078)	
<i>C. beani.</i>					4.15 n=1
					0.46
					0.25
					0.19

Cuadro 11. Datos morfométricos obtenidos de L₃A de peces dulceacuícolas de diversas localidades.
 Largo del labio/Ancho del labio/ Número total de hileras/Hilera de la papila cervical.

Especie	Tabasco Localidad.	Tabasco Mercado.	Cuenca Papaloapan.	Tres Palos, Guerrero.	Aguamilpa, Nayarit.
<i>G. dormitor.</i>	0.036(0.031-0.04)n=2	0.032(0.023-0.048)	0.027		
	0.075(0.07-0.08)	0.065(0.054-0.078)	0.068		
	200(152-248)	257.86(230-276)	260		
	9-14	11-16	13-14		
<i>P. splendida.</i>	0.03		0.04(0.023-0.085)		
	0.061		0.065(0.037-0.085)		
	268		252(219-299)		
<i>C. managuense.</i>	15-16		10-17		
	0.023				
	0.071				
	224.5(175-274)				
<i>A. guatemalensis.</i>	13-15			0.027(0.024-0.03)	
				0.068(0.061-0.078)	
				234.6(218-249)	
				11-14	
<i>C. beani.</i>					0.04
					0.06
					273
					14-15

Cuadro 12. Datos morfométricos obtenidos de L₃A de peces dulceacuícolas de diversas localidades.
 Número de ganchos por anillo el bulbo/Diferencia entre el primer y último anillo.

Especie	Tabasco Localidad.	Tabasco Mercado.	Cuenca Papaloapan.	Tres Palos, Guerrero.	Aguamilpa, Nayarit.
<i>G. dormitor.</i>	41.33(39-44)	40.06(36-46)	36		
	44(41-48)	43(38-47)	46		
	48.66(46-50)	46.53(42-50)	46		
	50.66(48-52)	49.6(46-54)	50		
<i>P. splendida.</i>	9.336	9.54	14		
	38		40.42(37-46)		
	40		44(40-48)		
	44		45.8(40-50)		
	48		48.73(42-54)		
<i>C. managuense.</i>	10		8.3		
	39.5(38-41)				
	42.5(42-43)				
	46				
<i>A. guatemalensis.</i>	50.5(50-51)				
	11				
				39(38-40)	
				41.6(40-44)	
				45.33(41-48)	
<i>C. beani.</i>				48.66(48-50)	
				9.66	
					40
					44
				50	
				54	
				14	

Cuadro 13. Datos morfométricos obtenidos de L₃A de peces dulceacuicolas de diversas localidades.
Largo sacos cervicales/Ancho sacos cervicales/Largo esófago/Ancho esófago.

Especie	Tabasco Localidad.	Tabasco Mercado.	Cuenca Papaloapan.	Tres Palos, Guerrero.	Aguamilpa, Nayarit.
<i>G. dormitor.</i>	0.53(0.42-0.6)	0.66(0.49-0.76)	0.7		
	0.054(0.047-0.064)	0.058(0.045-0.076)	0.087		
	1.13(0.92-1.21)	1.32(1.12-1.43)	1.32		
	0.21(0.19-0.22)	0.25(0.19-0.34)	0.25		
<i>P. splendida.</i>	0.5		0.6(0.34-0.79)		
	0.038		0.06(0.038-0.096)		
	1.06		1.35(1.17-1.67)		
	0.18		0.26(0.17-0.36)		
<i>C. managuense.</i>	0.54(0.36-0.72)				
	0.053(0.034-0.072)				
	1.44				
<i>A. guatemalensis.</i>	0.33			0.62(0.57-0.69)	
				0.071(0.062-0.084)	
				1.31(1.28-1.35)	
				0.19(0.18-0.21)	
<i>C. beani.</i>					0.78
					0.073
					1.5
					0.39

Cuadro 14. Datos morfométricos obtenidos de L₃A de peces dulceacuicolas de diversas localidades.

Especie	Localidad Tabasco.	Tabasco mercado.	Cuenca Papaloapan.	Tres Palos, Guerrero.	Aguamilpa, Nayarit.
<i>G. dormitor.</i>	25	26.71(23-33)	27		
	0.053	0.053(0.034-0.068)	0.054		
	?	156.33(135-178)	152		
	?	180.	186		
<i>P. splendida.</i>	?		26.93(24-29)		
	0.051		0.053(0.034-0.071)		
	?		148-83(135-173)		
	?		175.66(154-210)		
<i>C. managuense.</i>	27				
	0.064				
	177				
	196				
<i>A. guatemalensis</i>				26.66(25-28)	
				0.054(0.045-0.068)	
				151(137-165)	
				171(170-172)	
<i>C. beani.</i>					27
					0.061
					162
					187

Cuadro 15. Comparación morfométrica de larvas de tercer estadio avanzado de *Gnathostoma* spp.

Caracter	<i>G. spinigerum</i> ¹	<i>G. binucleatum</i> ²	<i>G. procyonis</i> ³	<i>G. turgidum</i> ⁴	<i>G. binucleatum</i> ⁵
Longitud corporal	5 (4.6-5.5)	4.3 (2.6-5.9)	5.2	1.49(1.3-1.68)	3.74(2.05-5.2)
Número de ganchos/anillo:					
Anillo 1	44 (39-49)	39 (35-44)	33 (29-36)	31.25(28-35)	39(36-46)
Anillo 2	47 (42-54)	42 (38-47)	37 (32-40)	33.96(29-36)	43(38-48)
Anillo 3	50 (45-56)	45 (40-49)	41 (37-45)	37.04(33-40)	46.5(40-50)
Anillo 4	52 (45-58)	48 (43-52)	45 (42-47)	41.82(38-45)	50(48-54)
Anillo 4 - anillo 1*	8	9.5	12		9.56
Hileras transversales de espinas (No.)	+200	260	—	195	246
Posición pc/pe**		13/30		11.79/21.57	13-14/27

¹ Miyazaki (1954); ² Almeyda-Artigas, (1991); ³ Ash (1962); ⁴ Sánchez-Miranda *et al.* (2001)¹¹ Datos de este trabajo⁵; *diferencia entre el número de ganchos del anillo 4 con respecto al del anillo 1; ** posición de la papila cervical (pc) y del poro excretor (pe) con relación al número de hilera transversal de espinas.

Cuadro 16. Datos de colecta de los ejemplares utilizados para la obtención de datos moleculares.

Clave	Estadio de desarrollo	Hospedero	Región	Secuencia
8	Larva L3A	<i>P. splendida</i>	Cuenca Papaloapan	ITS-2
16	Larva L3A	<i>P. splendida</i>	Cuenca Papaloapan	ITS-2
19	Larva L3A	<i>G. dormitor</i>	Tabasco	
22	Larva L3A	<i>C. managuense</i>	Tabasco	ITS-2
32	Larva L3A	<i>P. splendida</i>	Cuenca Papaloapan	ITS-2
44	Larva L3A	<i>A. guatemalensis</i>	Tres Palos	

Cuadro 17. Matriz de similitud entre las secuencias de ITS-2 de larvas L3A de peces dulceacuícolas

<i>G. binucleatum</i>	<i>G. binucleatum</i>	8	16	22
8	100	-		
16	100	100	-	
22	99.525	99.525	99.525	-
32	100	100	100	99.525

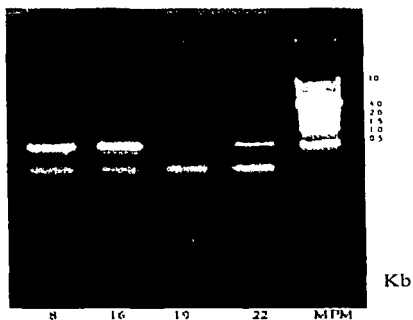


Figura 3. Fragmentos amplificados del ITS-2 obtenidos de L₃A de *Gnathostoma binucleatum*.



7



8



9



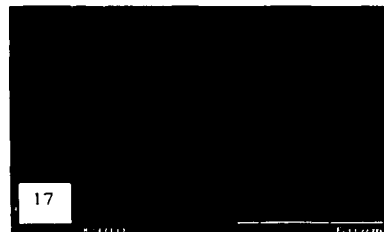
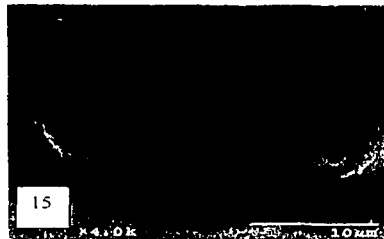
10



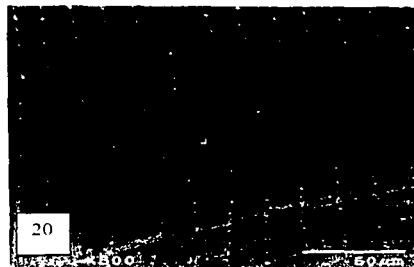
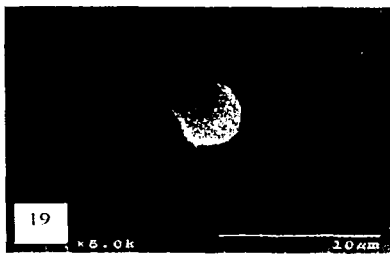
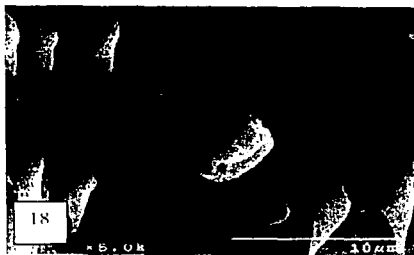
11

Fotomicrografías de Microscopía óptica 7-11. Larvas de tercer estadio avanzado de *Gnathostoma binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991.

Foto 7 Vista completa de L₃A. Foto 8 Extremo posterior. Foto 9 Extremo anterior. Foto 10 Primeras hileras del cuerpo. Foto 11 Papila cervical.

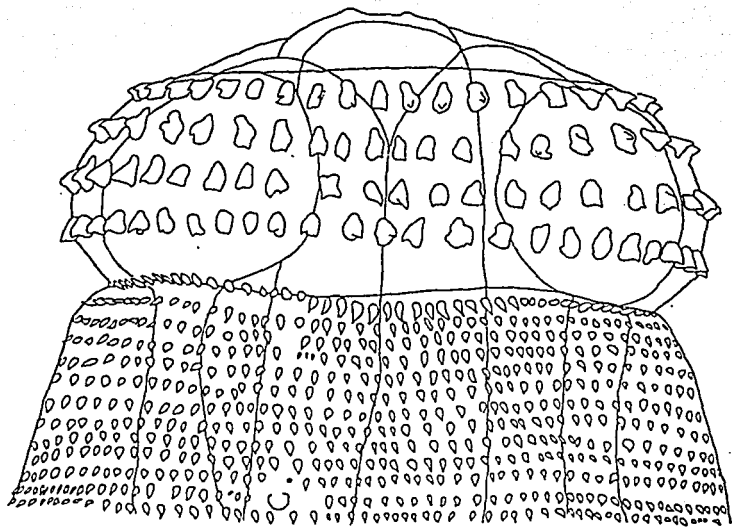


Fotomicrografías de Microscopía Electrónica de Barrido 12-17. Larvas del tercer estadio avanzado de *Gnathostoma binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991.
Foto 12 Vista frontal del bulbo cefálico. Foto 13 Extremo anterior. Foto 14 Labios y boca.
Foto 15 Papilas y anfishio. Foto 16 Fasmidios en el extremo posterior. Foto 17 Poro excretor.



Fotomicrografías de Microscopía Electrónica de Barrido 18-21. Larvas del tercer estadio avanzado de *Gnathostoma binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991.

Foto 18 Papila cervical. Foto 19 Detalle de la papila del último tercio del cuerpo. Foto 20 Papila del último tercio del cuerpo. Foto 21. Extremo posterior..



0.2 mm.

Figura 4. Vista lateral del extremo anterior de una L₃A de *Gnathostoma binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991.

Gnathostoma turgidum Stossich, 1902. Redescripción.

Basada en un ejemplar macho extraído del hígado de un tlacuache *Didelphis marsupialis* capturado en las inmediaciones de la presa de Temascal, Oaxaca en diciembre de 2000. El gusano presentaba un color rojizo cuando vivo y un color blanco una vez fijado. La longitud total del cuerpo es de 40.25, el ancho máximo es de 1.85 hacia el ultimo tercio del cuerpo. El bulbo cefálico mide 0.356 de largo por 0.781 de ancho. Presenta un par de labios que flanquean a la boca provistos de un par de papilas simples cada uno. Los labios miden 0.082 de largo por 0.24 de ancho. El bulbo presenta 11 anillos de ganchos simples, los dos primeros incompletos, su base es rectangular con las puntas achatadas que se dirigen hacia el extremo posterior. Los primeros miden en promedio 0.013 de largo por 0.01 de ancho, en los anillos intermedios 0.022 por 0.014 y en los restantes 0.02 por 0.012. El cuello mide 0.561 de ancho. Las papilas cervicales se encuentran entre la hilera 9 y 10 de espinas del cuerpo a 0.356 del cuello. La espinación corporal inicia inmediatamente posterior del cuello y desaparece hacia la mitad del cuerpo, ocupando el 43.82% de su superficie anterior, la cutícula de la mitad posterior es desnuda y solo reaparecen pequeñas espinas alrededor de la cloaca, en la región de la bolsa copulatriz.

Las espinas de la primera hilera presentan entre 6 y 7 puntas, miden 0.022 de largo por 0.037 de ancho. Las que rodean a la papila presentan de 9 a 12 puntas y miden 0.064 de largo por 0.041 de ancho. A 0.548 del cuello, las espinas se ensanchan en su región distal adquiriendo forma de trapecio, miden 0.034 en la base, 0.061 en la región distal de la hoja y 0.078 de largo y presentan de 9 a 12 puntas. A 1.726 del cuello, las espinas miden 0.037 en su base y 0.061 de ancho máximo en la región media de la espina y se va modificándose gradualmente, presentando la punta central muy alargada de 0.095, las puntas laterales se reducen en tamaño y número (tres a cada lado). Las espinas a este nivel son romboidales.

Las espinas presentan un menor número de puntas al acercarse al extremo posterior. Aproximadamente a 13.39 del cuello las espinas tienen cuatro puntas de tamaño similar, miden 0.051 de largo por 0.044 de ancho. Las espinas disminuyen en cantidad, tamaño y puntas gradualmente hasta transformarse en espinas con una sola punta para después solo percibirse como puntuaciones refringentes hacia la mitad el cuerpo y finalmente desaparecer dejando la cutícula desnuda. En la región ventro-terminal, circundando la cloaca reaparecen pequeñas espinas arregladas en hileras.

A 14.48 del cuello, el cuerpo se engrosa ligeramente. El poro excretor es ventral y se sitúa a 0.794 del cuello, en la hilera 31 de espinas corporales.

La abertura cloacal es posterior y ventral, se sitúa a 0.767 del extremo posterior del cuerpo; presenta dos espículas genitales, la derecha mide 0.959 y la izquierda 2.74, ésta sale del cuerpo del animal a través de la abertura cloacal. El extremo posterior presenta cuatro pares de papilas grandes pedunculadas, dos pares son precloacales y dos pares postcloacales, los tres primeros están separados del cuarto par el cual es posterior y está a la altura del extremo caudal. Presenta también cuatro pares de papilas sésiles que son más pequeñas que las anteriores: El primer par está situado a la misma altura del primer par de papilas pedunculadas pero más cercanas al eje central del cuerpo. El segundo y tercer par se encuentran en la base posterior del segundo y tercer par de papilas pedunculadas respectivamente y el cuarto par en las depresiones que se forman entre el tercer y cuarto pares de papilas pedunculadas, más cercanas a las últimas. Presenta numerosas hileras transversales de pequeñas espinas distribuidas solo en una pequeña porción de la región ventral, las cuales desaparecen en la región inmediata anterior de la cloaca, en las papilas y en la superficie rectangular posterior a la cloaca en donde se presentan dos cojinetes grandes. Posteriormente, después de una región desnuda, se encuentra un grupo de hileras de espinas transversales (Fotos 22-27 y Figura 6-8).

El bulbo, la región posterior y la cutícula del organismo fueron depositadas en la CNHE con el número de catálogo 4519.

Discusión taxonómica

Como parásitos de marsupiales en América se han registrado tres especies de *Gnathostoma*: *G. turgidum*, distribuida en Argentina, Perú, E.U.A. y México; *G. didelphis* en E.U.A. y Panamá y *G. brasilense* en Brasil; Sin embargo, las dos últimas especies fueron descritas con base en ejemplares inmaduros, por lo cual, Miyazaki (1960) las consideró sinónimos de *G. turgidum*, constituyéndose así como la única especie del género que parasita marsupiales en América. No obstante, este criterio no fue validado por Daengsvang (1980,1982) quien las considera especies independientes. Debido a que el último autor no aportó datos adicionales a las descripciones de éstas, en este trabajo nos apegamos a lo propuesto por Miyazaki (1960). Posteriormente, Almeyda-Artigas *et al.* (2000) señalaron la existencia de tres especies más, a las que caracterizaron con base en datos moleculares (véase discusión general).

El ejemplar que aquí presentamos concuerda morfológicamente con la descripción de *G. turgidum* presentada por Miyazaki (1960) y Akahane *et al.* (1999) tanto en la disposición general de las espinas, presentes solo en la mitad anterior del cuerpo, como en las características de las mismas a los distintos niveles.

Adicionalmente a la distribución de las espinas, el arreglo y número de papilas en la región de la bursa han sido considerados como caracteres de importancia taxonómica. Miyazaki (1960)

señaló nueve pares de papilas en *G. turgidum*, cuatro pares son grandes, pedunculadas y simétricas. Chandler (1932), al describir a *G. didelphis* observó cuatro pares de papilas similares a las descritas anteriormente y solo un par de pequeñas papilas simples. Miyazaki (1960) reexaminó este material encontrando tres o cuatro pares de papilas simples y no uno, como Chandler (1932). Por su parte, Travassos (1925) y Ruiz (1952) al describir a *G. brasilense*, registraron cinco pares grandes de papilas pedunculadas, lo que fue considerado por Miyazaki (1960) como deformaciones. No obstante, ninguno de los autores antes citados realizaron esquemas precisos de la bursa como los que existen para otras especies del género. Con base en nuestro ejemplar, efectuamos por primera vez un esquema de esta región en el se observan ocho pares de papilas dispuestas simétricamente, un par menos que lo señalado por Miyazaki (1960). A pesar de lo anterior y de presentar una longitud ligeramente menor (4.025 cm, siendo 5 cm promedio de la especie), nuestro ejemplar presenta las características morfométricas del adulto de *G. turgidum*.

Lo anterior sugiere que esta especie alcanza la madurez en el hígado (posiblemente con excepción del noveno par de papilas y la talla final) para luego migrar al estómago. Sin embargo, consideramos necesario realizar mas estudios de este tipo para establecer definitivamente las características del extremo posterior de *G. turgidum*.

Del mismo ejemplar se obtuvo la secuencia del ITS-2 de 359 pb (Figura 5) misma que se contrastó con la disponible en GenBank (ver apéndice 2), presentando una similitud del 100%. De todo lo anterior, concluimos que tanto morfométrica como molecularmente, el ejemplar estudiado corresponde con *G. turgidum*.

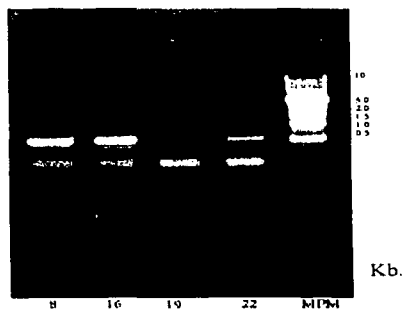
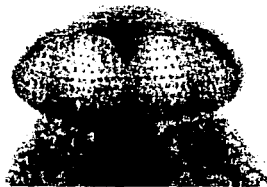
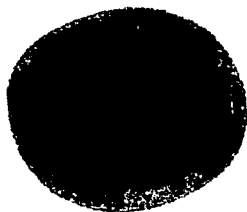


Figura 5. Fragmento amplificado del ITS-2 de *Gnathostoma turgidum*.

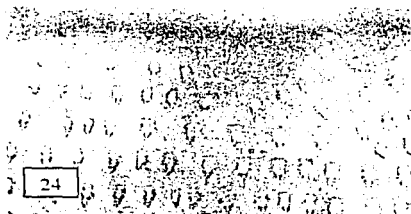
22



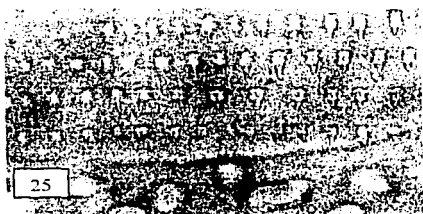
23



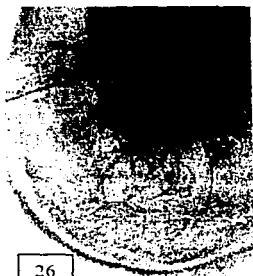
24



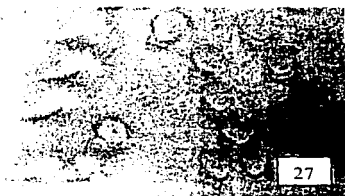
25



26



27



Fotomicrografías 22-27. Ejemplar macho inmaduro de *Gnathostoma turgidum*, Stossich, 1902.
 Foto 22 Bulbo cefálico. Foto 23 Bulbo cefálico vista frontal. 24 Primeras hileras del bulbo
 cefálico. 25 Últimas hileras del bulbo cefálico. 26 Extremo posterior. 27 Papila cervical.

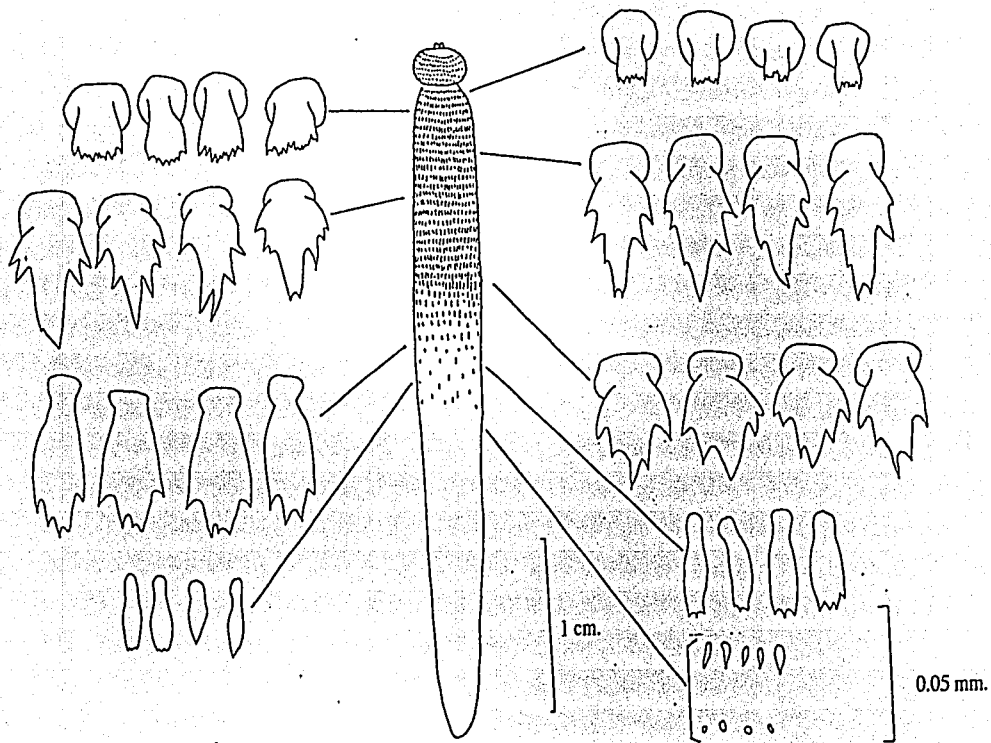


Figura 6. Forma y distribución de las espinas corporales de un macho inmaduro de *Gnathostoma turgidum* Stossich, 1902.

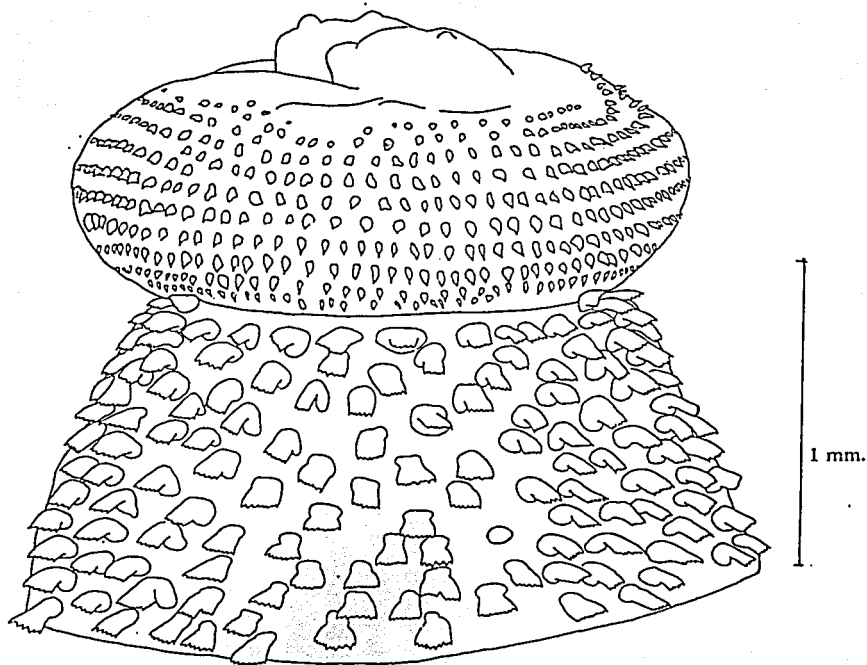


Figura 7. Vista lateral del extremo anterior de un macho inmaduro de *Gnathostoma turgidum* Stossich, 1902.

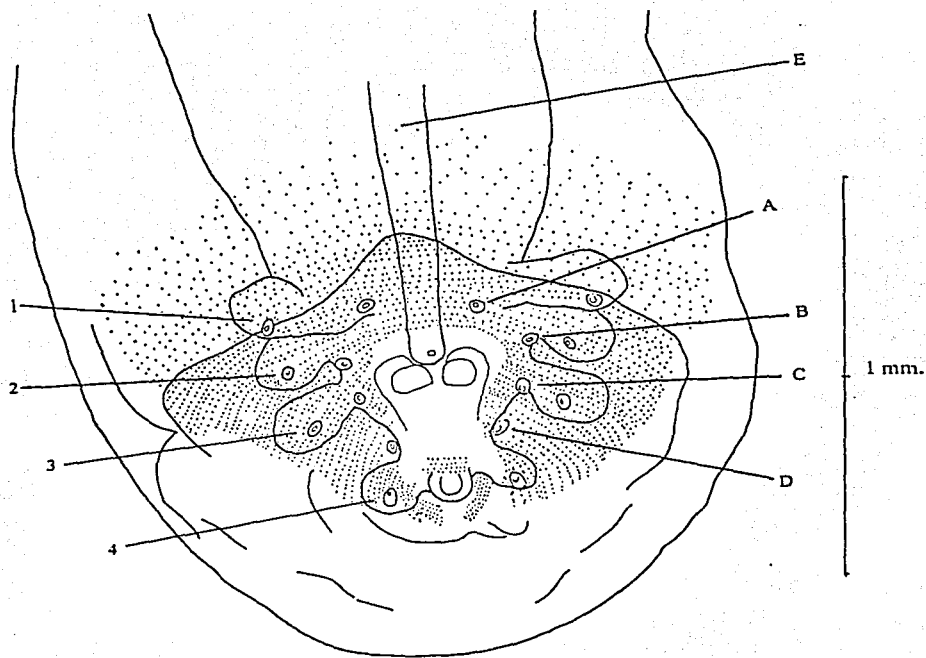


Figura 8. Vista ventral del extremo posterior de un macho inmaduro de *Gnathostoma turgidum* Stossich, 1902.

1-4: Papilas pedunculadas.
 A-D: Papilas sésiles.
 E: Espícula izquierda.

Discusión General

Especies de *Gnathostoma* en México

Hasta la fecha se han descrito 23 especies del género *Gnathostoma* en diversas regiones del mundo, sin embargo únicamente se consideran válidas entre 11 y 13 (Daengsvang, 1980,1982; Miyazaki, 1991; Almeyda-Artigas, 1991): cinco distribuidas en América y al menos tres en México, el resto principalmente en Asia. La diferencia en el número de especies referido por cada autor estriba en que Daengsvang (1982) considera tanto a *G. brasilense* como a *G. didelphis* como especies independientes de *G. turgidum*, criterio no compartido por los demás autores, ya que ambas descripciones se basaron en ejemplares inmaduros. De ser cierta la sinonimia, significaría que *G. turgidum* se distribuye desde el sur del continente hasta E.U.A., siendo por lo tanto la especie del género con distribución geográfica más amplia.

La especie del género descrita más recientemente es *G. binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991, parásita de cánidos y félidos. De acuerdo con Almeyda-Artigas *et al.* (2000), es la responsable de los casos humanos de la enfermedad en América. La gran similitud entre esta especie y *G. spinigerum* llevó a varios autores a dudar de que se tratase de una especie válida y de su relación con los casos humanos (Lamothe-Argumedo y Osorio-Sarabia, 1998; Koga *et al.*, 1999); sin embargo, al emplear nuevos datos provenientes del análisis de secuencias del ADN ribosomal, se estableció definitivamente a *G. binucleatum* como una especie válida y hasta la fecha, la única que se ha demostrado estar implicada en la gnatostomiasis humana en América (Almeyda-Artigas *et al.*, 2000; León-Régagnon *et al.*, 2002).

Desde que se registraron los primeros casos de gnatostomosis humana por Levinsen en 1889 (Miyazaki, 1960) el diagnóstico ha sido confuso. El agente causal de este primer caso fue determinado como *Cheiracanthus siamensis* y tiempo después determinado correctamente como *G. spinigerum*, especie que desde ese momento fue considerada como el único agente causal de la enfermedad en humanos. En Japón, país donde la gnatostomosis humana representó un problema grave de salud se distribuyen cuatro especies del género (*G. spinigerum*, *G. hispidum*, *G. doloresi* y *G. nipponicum*). La necesidad de diferenciar cada especie en etapa de L₃A llevó a diversos grupos de parasitólogos a buscar caracteres morfométricos para tal efecto. Como resultado, se esgrimieron tres caracteres de importancia taxonómica: forma y número de los ganchos del bulbo cefálico y número de núcleos por célula del epitelio intestinal (Akahane *et al.* 1986) que posibilitaron la determinación específica del agente causal de la gnatostomosis humana en dicho país y de esta manera, se estableció que no solo *G. spinigerum* es la responsable de la enfermedad sino también las otras tres especies (Akahane *et al.*, 1982; Ogata *et al.*, 1988; Ando *et al.*, 1988; Nomura *et al.*, 2000).

En México, se presentó un caso similar al ocurrido en Japón; al registrarse los primeros casos humanos de la parasitosis (Pelaez y Pérez-Reyes, 1970) se infirió que eran causados por *G. spinigerum* sin haberse realizado un examen taxonómico profundo; con el paso del tiempo, al incrementarse el número de casos humanos, surgió la necesidad de determinar con precisión la identidad del agente causal y de conocer diversos aspectos biológicos del parásito. Pronto se estableció que en nuestro país se distribuyen tres especies, cuyas L3A no son diferenciables morfológicamente con la escasa información que de ellas tenemos (León-Régagnon *et al.*, 2002; Kifune *et al.*, 2002).

Almeyda-Artigas *et al.* (2000) realizaron el primero trabajo sobre la caracterización molecular de las especies del género; en él, sugieren la existencia de dos especies más del género en México basándose exclusivamente en diferencias del ITS-2 y una especie más no diferenciable molecularmente de *G. turgidum*. El status de estas tres especies es dudoso. Almeyda-Artigas *et al.* (1994) registraron la presencia de *G. procyonis* en México basándose en un solo ejemplar hembra obtenido de un mapache, el cual únicamente difería de la descripción de la especie (Chandler, 1932 y Miyazaki, 1960) por presentar crestas a lo largo del extremo posterior del cuerpo que le confieren un aspecto globoso; con este registro se confirmaba la presencia de dicha especie en nuestro país; posteriormente, Almeyda-Artigas *et al.* (1995)¹⁹ refieren la colecta de ocho gusanos adultos (cuatro hembras y cuatro machos) de mapaches en las inmediaciones de Tlacotalpan, Veracruz, mismos que fueron determinados como *G. procyonis*. Además, los autores registraron el desarrollo larvario experimental de *G. procyonis*, señalando la similitud de éste con el previamente registrado para la especie por Ash (1962). Parecía entonces clara su presencia en México. Ulteriormente, Almeyda-Artigas *et al.* (2000) al obtener diversas secuencias nucleares de ejemplares obtenidos de mapaches de Tlacotalpan, Veracruz (sin aclarar si se tratan de los mismos descritos por Almeyda-Artigas *et al.* 1995¹⁹ como *G. procyonis*) propusieron que se trataba de una nueva especie: *Gnathostoma* sp.1 (= *G. procyonis* sensu Almeyda-Artigas *et al.* 1994). De esta forma, basándose en las secuencias del ITS-2, proponen la existencia de una nueva especie del género que se diferencia morfológicamente de *G. procyonis* únicamente por presentar crestas a lo largo del extremo posterior del cuerpo. Para aumentar la confusión, en GenBank no existen secuencias de *G. procyonis* con las cuales comparar a *Gnathostoma* sp.1. Se presenta además, en la misma base de datos, la secuencia del 18s de *G. neoprocyonis*, de la cual no indican su sitio de colecta, hospedero, ni si se trata de *Gnathostoma* sp.1 o de una forma distinta.

¹⁹ Almeyda-Artigas R. J., M. A. Mosqueda-Cabrera, V. A. Acosta-Hernández, L. Alonzo-Díaz, M. Castañeda-Sánchez & V. Zárate-Ramírez. 1995. Desarrollo larvario experimental de *Gnathostoma procyonis* Chandler 1942 (Nematoda: Spirurida) de las inmediaciones de Tlacotalpan, Veracruz. Memorias XIII Congreso Nacional de Zoología, Morelia, Michoacán.

Por lo que respecta a *Gnathostoma* sp.II (= *G. turgidum* sensu Foster, 1939 pro parte) únicamente podemos inferir que es muy similar a *G. turgidum*, ya que de la primera únicamente se ha dado a conocer una secuencia del ITS-2, que, de establecerse definitivamente como un buen marcador taxonómico, nos indicaría que se trata de una nueva especie con morfología similar a *G. turgidum*.

En cuanto a *Gnathostoma* sp.III la distinción es todavía mas compleja. Almeyda-Artigas *et al.* (2000) proponen la existencia de esta tercera especie sin esgrimir ninguna razón para ello, más aún, al analizar el ITS-2 de esta especie, resulta idéntico al de *G. turgidum*, criterio que había sido utilizado para diferenciar entre todas las demás especies. De demostrarse que *Gnathostoma* sp. III es una especie independiente, quedaría claro que el ITS-2 no es un marcador confiable para diferenciar especies congénéricas además de que ha mostrado poca utilidad como marcador filogenético de acuerdo con León-Régagnon *et al.* (2002).¹⁸

Por lo tanto, hasta el momento consideramos que *G. procyonis* es una especie presente en nuestro país, sin evidencia contundente de que se trate de una especie nueva. En cuanto a *Gnathostoma* sp.II estimamos prematuro establecerla como especie independiente. Con respecto a *Gnathostoma* sp.III, se considera como sinónimo de *G. turgidum*. En conclusión, en México únicamente se distribuyen tres especies del género: *G. turgidum*, *G. binucleatum* y *G. procyonis*.

Especificidad hospedatoria

En el presente trabajo se registra el hallazgo *G. turgidum* en un marsupial con lo que se pone de manifiesto la alta especificidad de los hospederos definitivos para las especies del género, concordando así con lo establecido en registros previos (Dikmans, 1931; Caballero y Caballero, 1958; Miyazaki *et al.*, 1978; Lamothe-Argumedo *et al.*, 1998; Akahane *et al.*, 1999; Almeyda-Artigas *et al.*, 2000), donde se señala que esta especie de parásito solo se encuentra en marsupiales. En el mismo orden de ideas, hasta la fecha no existen reportes de las especies restantes presentes en México parasitando a este grupo de mamíferos, solo con excepción de los registrados por Bravo-Hollis y Caballero-Deloya (1979) y Ortiz-Villaseñor (1990)², sin embargo, consideramos que el material necesita ser revisado. Este criterio, apoya la sinonimia de *G. didelphis* y *G. brasiliense* con *G. turgidum*, la que se constituye como la única especie del género parásita de marsupiales distribuida en todo el continente americano, aunque es necesario un estudio a fondo de los ejemplares suramericanos.

Por lo que respecta a los segundos hospederos intermediarios, en México se han registrado una gran cantidad de peces dulceacuícolas pertenecientes principalmente a tres familias: Cichlidae, Ariidae y Eleotridae (Lamothe-Argumedo *et al.*, 1989; Almeyda-Artigas, 1991; León-Règagnon *et al.* 2000, 2002; López-Jiménez y García-Magaña, 2000; Alvarez-Guerrero y Lamothe-Argumedo, 2001); todos los registros realizados por nosotros en el presente trabajo corresponden a las familias antes señaladas, por lo que en su conjunto estos datos podrían ser indicativos de la composición característica del espectro hospedatorio del nematodo en los cuerpos de agua dulce del país; sin embargo, cabe la posibilidad que el método de colecta de peces no sea el más representativo de la ictiofauna mexicana ya que en la mayoría de los casos, se han revisado únicamente peces producto de la pesca comercial dejando de lado una cantidad considerable de peces sin importancia comercial que pudieran jugar un importante papel en los ciclos de vida de las especies del género.

Identificación específica

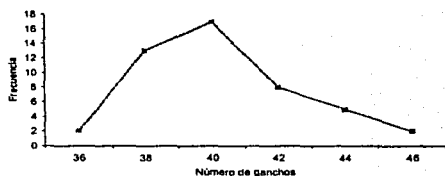
En la mayoría de los casos antes señalados no se ha determinado específicamente al parásito. En otros trabajos, los ejemplares se han determinado, no sin controversia, como *G. binucleatum* basándose exclusivamente en caracteres morfológicos. La determinación por medio de herramientas moleculares es hasta ahora el método más preciso, no obstante se ha realizado en muy pocas ocasiones (Almeyda-Artigas *et al.*, 2000; Martínez-Salazar, 2001¹⁴, León-Règagnon *et al.*, 2002; 2002¹⁸).

Debido a lo poco costeable que resulta obtener secuencias de ADN de todas las larvas L₃A recolectadas y a la insuficiente información morfológica que se obtendría al hacerlo, en nuestro estudio se decidió someter al proceso de extracción solo a algunos ejemplares, asumiendo, no sin riesgos, que los resultados obtenidos podrían extrapolarse a toda la población. De esta manera y con base en las secuencias obtenidas de 4 individuos, asumimos que las 47 larvas estudiadas que exhiben rasgos morfométricos similares corresponden a *G. binucleatum*; no obstante, en el presente estudio analizamos el comportamiento de la distribución del número de ganchos por anillo de los ejemplares. En las gráficas 1-4 se muestra la distribución del número de ganchos por anillo en 47 ejemplares estudiados por nosotros y en el cuadro 18 se muestran algunos datos estadísticos sobre el comportamiento de estos.

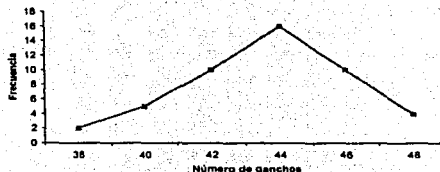
El que la moda, media y mediana sean similares y la desviación standard pequeña implica que la mayoría de los datos se distribuyen hacia el centro de la gráfica y por el contrario, solo algunos se distribuyen hacia los extremos. Debido a que en los trabajos publicados donde se señala el número de ganchos por anillo únicamente se indica el valor de la media y del intervalo, es imposible conocer el comportamiento de los datos. Si asumimos que la distribución del número de ganchos por anillo en las demás especies se

comporta de la misma forma que en los ejemplares estudiados por nosotros, es posible realizar una serie de planteamientos encaminados a esclarecer la determinación a nivel de especie.

Gráfica 1. Número de ganchos del primer anillo de L3A de *G. binucleatum*



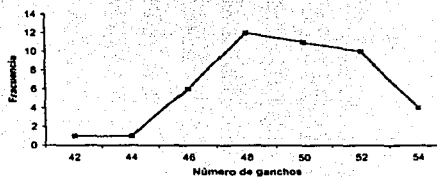
Gráfica 2. Número de ganchos del segundo anillo de L3A de *G. binucleatum*



Gráfica 3. Número de ganchos del tercer anillo de L3A de *G. binucleatum*



Gráfica 4. Número de ganchos del cuarto anillo de L3A de *G. binucleatum*



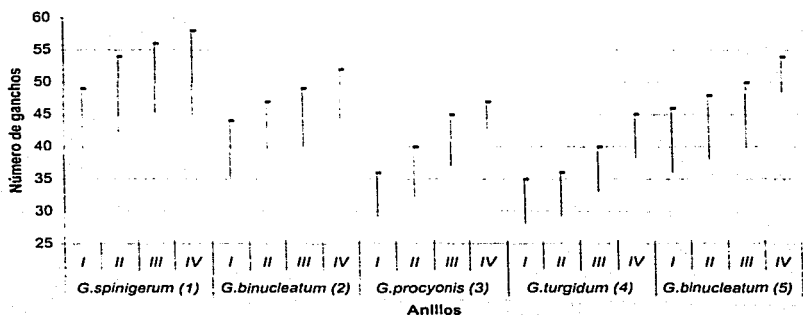
Cuadro 18. Datos estadísticos sobre la distribución del número de ganchos por anillo de L3A de *Gnathostoma binucleatum*.

	Anillo 1	Anillo 2	Anillo 3	Anillo 4
Media	40	43	46	49
Moda	41	44	46	48
Mediana	40	43	45	48
Desviación standard	2.38	2.51	2.58	2.71

En la gráfica 5 se muestran los intervalos del número de ganchos por anillo de diversas especies del género. Como se observa, los datos de *G. spinigerum*, *G. binucleatum* en los dos casos

y *G. procyonis* solo se sobrelapan en los extremos de sus intervalos. Si consideramos el tipo de distribución del número de ganchos en cada uno de los anillos, observaríamos que en términos reales, el número de individuos que puedan encontrarse en ese sobrelapamiento sería mínimo para cada uno de ellos. Si esta probabilidad es reducida para un anillo, lo es más aún considerar que un mismo organismo pueda estar en los límites en los cuatro anillos. Esto es posible pero la probabilidad es muy reducida. Como se observa en la gráfica 5, el sobrelapamiento de los ganchos no es tan evidente; puede observarse que los datos del presente trabajo se asemejan más a los previamente señalados para *G. binucleatum*, que a cualquiera de las demás especies. En cambio, *G. procyonis* y *G. turgidum* son más similares entre sí que cada una con respecto a *G. binucleatum*.

Gráfica 5. Intervalo del número de ganchos por anillo de *Gnathostoma* spp.



1 Miyazaki (1954); 2 Almeyda-Artigas (1991); 3 Ash (1962); 4 Sánchez-Miranda *et al.* (2001)¹⁰; 5 Datos de este trabajo

Al realizarse un análisis estadístico profundo, podríamos hacer determinaciones con un alto grado de precisión tanto de ejemplares como de poblaciones; sin embargo por la escasa información disponible sobre la morfometría de las L₃A de dos de las tres especies presentes en México, el análisis tendría que asumir varios supuestos un tanto arriesgados, como el que la distribución de los ganchos por anillo de estas dos especies es similar al registrado para *G. binucleatum*, es decir, que presenten las medidas de tendencia central y la desviación standard similares. Por otro lado, el tamaño de la muestra para todas las especies debe incrementarse para tener una mejor idea sobre lo que está pasando con la distribución de los datos, así como deben compararse a fondo los ejemplares obtenidos por infecciones experimentales con los obtenidos de infecciones naturales.

Consideramos pertinente señalar la necesidad de incluir en las descripciones de los organismos, además del promedio y los intervalos, la desviación standard ya que ésta nos habla de la dispersión de los datos.

Al asumir que todas las larvas encontradas en los peces pertenecen a *G. binucleatum* y que, *G. turgidum* siempre se ha encontrado en tlacuaches, concluiríamos que los marsupiales no se infectan al ingerir peces de los cuerpos de agua dulce de su entorno, sino que lo hacen ingiriendo otros hospederos considerados paraténicos como anfibios y reptiles (que en tal caso deberán considerarse como hospederos intermediarios de *G. turgidum*). Sin embargo, los registros de *Gnathostoma* en anfibios y reptiles de México son escasos además de que no definen el status específico de las larvas (Lamothe-Argumedo, 1997; Bertoni-Ruiz, 2001¹¹). No obstante, existen dos registros de *G. binucleatum* en reptiles de Temascal, Oaxaca determinados con base en los caracteres morfológicos (Almeyda-Artigas *et al.*, 1992)⁸, pero a partir de lo anterior afirmar que estos parásitos presentan alta especificidad hacia este grupo de vertebrados sería erróneo ya que es característico del género presentar ciclos de vida secundarios (Miyazaki, 1960; Miyazaki, 1991) en los que están involucrados una gran cantidad de segundos hospederos intermediarios y paraténicos, caracterizados como tales por los niveles de infección y consideraciones ecológicas y no por la capacidad de las L₃A de infectar.

Un caso parecido ocurrió en Japón, en donde se intento explicar un patrón similar de especificidad hospedatoria hacia las serpientes de las L₃A de *G. doloresi* (Imai *et al.*, 1988), sin embargo, tiempo después se estableció el papel de los peces en dicho ciclo de vida, lo cual concuerda con observaciones realizadas en las demás especies del género (Nawa *et al.*, 1993).

En el presente estudio se obtuvieron secuencias del ITS-2 de 4 ejemplares de un total de 47, esto es el 6.38% de la muestra total. En un estudio previo, Martínez-Salazar (2001)¹⁷ obtuvo datos moleculares del 17.39% de la muestra total de 69 ejemplares; en ambos, las secuencias concordaron con las de *G. binucleatum* disponibles en GenBank. Hasta la fecha no se ha realizado ningún estudio que comprenda la determinación específica de todas ni de un alto porcentaje de larvas presentes en determinado hospedero o localidad. De presentarse infecciones causadas por dos o mas especies de *Gnathostoma* en peces dulcecacuícolas, solo llegaría a su fase adulta aquella que haya sido ingerida por el hospedero definitivo sin importar que su proporción en los peces sea pequeña. Un dato que podría apoyar esta suposición es el señalado por Almeyda-Artigas *et al.* (1994) en un mapache de las inmediaciones de Tlacotalpan; en el que encontraron un *G. procyonis* adulto en el estómago y una larva determinada como *G. binucleatum* en la musculatura.

La información aportada por las imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido (Figuras 12-21) ha sido útil para caracterizar con mayor precisión estructuras no distinguibles empleando

microscopía convencional. Koga *et al.* (1999) señalaron la importancia del uso de esta herramienta para diferenciar entre los huevos de *G. binucleatum* y *G. spinigerum* ya que los últimos presentan numerosas y pequeñas hoquedades ovales en toda su superficie. Por lo que respecta a las L₃A, han sido estudiadas en diversas ocasiones (Koga e Ishii, 1987; Koga *et al.* 1988; Koga *et al.*, 1989 y Koga *et al.*, 1994) señalándose con exactitud la posición y características de diversas estructuras, como las papilas y anfídios en los labios, papilas cervicales, poro excretor, papilas presentes al inicio del tercio posterior del cuerpo y un par de papilas terminales. Los estudios de las larvas L₃A de ejemplares mexicanos utilizando esta herramienta han sido abordados escasamente (Lamothe-Argumedo *et al.*, 1989; Lamothe-Argumedo 1992; Koga *et al.*, 2000; Bertoni-Ruiz, 2001¹¹). En el presente trabajo se presentan fotografías de los anfídios, de las papilas ubicadas al inicio del tercio posterior del cuerpo y de los fasmidios o papilas caudales de *G. binucleatum*. La diferencia más evidente entre las larvas aquí estudiadas y las especies asiáticas es la forma de las papilas del tercio posterior del cuerpo, ya que en las últimas son muy aplanadas, claramente diferenciables de las papilas cervicales. Por el contrario, en *G. binucleatum*, las papilas cervicales y las del tercio posterior son similares, en ambos casos son proyecciones cuticulares globosas, el par de papilas del tercio posterior son asimétricas, la papila izquierda se ubica aproximadamente 20-35 hileras de espinas antes que la papila derecha.

Es necesario realizar más estudios al respecto para establecer si la forma y distribución de las papilas son caracteres útiles para diferenciar entre estas especies o si se trata del resultado de diferencias en la fijación y procesamiento del material.

Los fasmidios se localizan en el extremo posterior del cuerpo, son observables únicamente con esta herramienta (MEB) y son similares entre los ejemplares por nosotros estudiados y *G. doloresi*, *G. spinigerum* y *G. hispidum* por lo tanto, este carácter no es informativo para diferenciar a las especies japonesas de la mexicana.

Fuentes de Infección para el humano

El consumo de peces de agua dulce por el hombre no se remite a las poblaciones aledañas a los cuerpos de agua, sino que el producto se transporta continuamente de un estado a otro, por ejemplo, de Temascal, Oaxaca a Tierra Blanca, Veracruz y de Tabasco a Tuxtepec, Oaxaca. En el presente estudio se revisaron peces que se obtuvieron de tres formas: directamente de los pescadores, en sitios de concentración del producto (cooperativas) y en mercados de centros urbanos. El hallazgo de larvas de *G. binucleatum* vivas en peces obtenidos de las tres formas antes mencionadas evidencia la resistencia de las larvas aún después de la muerte del hospedero y que, al menos

potencialmente, pueden parasitar al hombre; así mismo, dificulta el estudio de la endemidad de la enfermedad en los humanos y de la distribución de los parásitos en un ambiente determinado. De esta forma, no es suficiente conocer los niveles de prevalencia y abundancia de las especies del género en los peces de los distintos cuerpos de agua, ya que es posible que las poblaciones humanas se estén infectando al ingerir peces de otras localidades donde las condiciones ecológicas y la composición sean distintas.

El estudio de la distribución del género en nuestro país ha sido un aspecto importante para los distintos grupos de investigación, de esta forma el registro de hospederos y de localidades es necesario para conocer los sitios prioritarios para continuar con las investigaciones. En el presente estudio, registramos la presa de Aguamilpa, Nayarit, como nueva localidad para el parásito al encontrarlo en *Cichlasoma beani*. Así mismo, registramos a *Petenia splendida* como nuevo hospedero en los Pantanos de Centla, Tabasco, con lo cual se amplía el espectro de distribución geográfica y de hospederos para *Gnathostoma*.

Por lo que respecta a la gnatostomosis humana en México, el problema ha sido complejo; como se ha señalado con anterioridad, la especie involucrada en la enfermedad humana fue determinada en un principio como *G. spinigerum*, sin embargo pronto se demostró que esta especie no se distribuye en América. A partir de ese momento el problema fue determinar cual de las tres especies mexicanas es la de importancia zoonótica. Almeyda-Artigas *et al.* (2000) sugirieron que *G. binucleatum* es la responsable de todos los casos humanos, sin embargo diversos autores han señalado lo prematuro que es hacer una afirmación de ese tipo debido principalmente a dos razones: se han recuperado muy pocas larvas de humanos y el diagnóstico de esta enfermedad se ha realizado con base en datos clínicos y no por el análisis directo de las larvas, ya que en la mayoría de los casos, al paciente se le administran antihelmínticos resultando de poco interés recuperar los nematodos, más aún, la mayoría de los ejemplares recuperados están en tan mal estado que resulta imposible realizar un examen morfométrico profundo. Por otro lado, Moravec (1998) ha señalado que diversos miembros de tres familias de nematodos: Gnathostomatidae, Anisakidae y Capilaridae son potencialmente zoonóticos, lo que ejemplifica la gran capacidad de diversos organismos de parasitar al hombre y pone en manifiesto lo prematuro de asignar tal capacidad solo a algunas especies del género. Sin embargo, pese a lo anterior, el poco material estudiado morfológica y molecularmente ha correspondido a *G. binucleatum*, lo cual la sitúa, con seguridad, como la especie de mayor importancia para el humano, sin descartar la importancia de las otras dos.

Gnathostoma turgidum ha sido señalada como la especie de mayor distribución en el continente, sin embargo resulta extraño que no se le haya involucrado directa o indirectamente con

la enfermedad en el hombre. El estudio de los peces de consumo humano en diversas localidades de nuestro país, ha mostrado que la especie presente en éstos es *G. binucleatum* sin que se tenga evidencia contundente de que puedan existir infecciones de dos o más especies de *Gnathostoma* en estos peces, lo que ha llevado a algunos autores a sugerir un tipo de especificidad de *G. turgidum* hacia reptiles u otros vertebrados como segundos hospederos intermediarios, sin embargo, tampoco existen evidencias claras de esto, lo que nos sugiere la posibilidad de que esta especie se presente mayoritariamente en otro tipo de peces que no sean colectados para el consumo humano y que de esta forma tampoco hayan sido detectadas por nuestros estudios, ya que básicamente revisamos peces de importancia económica y no a toda la diversidad ictica de las localidades.

El estudio del género *Gnathostoma* es de particular interés tanto desde el punto de vista biológico como médico, resultando evidente que todavía quedan varias preguntas dentro de los dos ámbitos que deberán ser contestadas para tener un panorama general de sus características. En México, es necesario conocer con exactitud el número de especies presentes así como las características morfométricas que las distingan, su distribución geográfica y ciclos de vida. En el mismo orden de ideas, es necesario realizar estudios filogenéticos en base a datos morfológicos y moleculares tanto dentro del grupo como de su relación con géneros emparentados, para obtener un sistema general de referencia que permita organizar la información procedente de otras disciplinas. La exploración de nuevos genes es necesaria ya que hasta la fecha no se ha establecido con claridad marcadores moleculares que permitan elaborar árboles filogenéticos.

Desde el punto de vista médico, es necesario conocer con exactitud la o las especies involucradas en la parasitosis humana, establecer métodos más precisos de diagnóstico, antihelmínticos más eficaces y sobre todo, medidas de control.

Conclusiones:

Se establece la presa de Aguamilpa, Nayarit como nueva localidad para *Gnathostoma binucleatum*, al ser detectado parasitando a *Cichlasoma beani*.

Se realiza el registro de *Petenia splendida* como nuevo hospedero de *Gnathostoma binucleatum* en la reserva de la Biósfera "Pantanos de Centla", Tabasco.

Se confirma la importancia del transporte de productos pesqueros de una localidad a otra como causa de la diseminación de L₃A de *Gnathostoma binucleatum* y la posible relación de esta actividad con los casos humanos de gnatostomosis.

Se confirma que *Gnathostoma binucleatum* es una especie ampliamente distribuida en la República Mexicana.

Se robustece la idea de que *Gnathostoma binucleatum* parasita preferencialmente a especies de peces de las familias Eleotridae, Ariidae y Cichlidae.

Se describe por vez primera, la localización de las papilas del tercio posterior de las L₃A de *Gnathostoma binucleatum*.

Se sugiere realizar estudios para evaluar si la forma de las papilas presentes en el último tercio del cuerpo de las L₃A de *Gnathostoma binucleatum* es de importancia para diferenciar a las especies.

Se analizo la distribución de la frecuencia del número de ganchos por anillo de las L₃A de *Gnathostoma binucleatum* y se sugiere con base en estos resultados, la posibilidad de diferenciar a esta especie de las otras dos presentes en México.

Se confirma la importancia del uso de caracteres moleculares para determinar las L₃A de *Gnathostoma binucleatum*.

Se confirma la utilidad del ITS-2 del ADN ribosomal como un buen marcador para diferenciar a las especies dentro del género *Gnathostoma*.

Se detectó una pequeña variación del ITS-2 del ADN ribosomal de *Gnathostoma binucleatum* de Centla, Tabasco.

Se robustece la idea de que *Gnathostoma turgidum* presenta una alta especificidad hacia marsupiales como hospederos definitivos.

Se realiza por primera vez la descripción de *Gnathostoma turgidum* con ilustraciones de sus rasgos morfológicos más importantes.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ACEVEDO-HERNÁNDEZ A., M. T. QUINTERO M. & L. LÓPEZ-XICOTENCATL. 1988. Hallazgo de huevos de *Gnathostoma* sp. (Owen, 1836) en heces de perro y cerdo de Temascal, Oaxaca, México. *Revista Mexicana de Parasitología*. 1(1):35
- ANDO K., H. TANAKA, Y. TANIGUCHI, M. SHIMIZU & K. KONDO. 1988. Two human cases of Gnathostomiasis and discovery of a second intermediate host of *Gnathostoma nipponicum* in Japan. *Journal of Parasitology*. 74(4) 623-27
- ASH, L. R. 1962. Development of *Gnathostoma procyonis* Chandler, 1942, in the first and second intermediate host. *Journal of Parasitology*. 48: 298-305.
- AKAHANE H., K. IWATA & I. MIYAZAKI. 1982. Studies on *Gnathostoma hispidum* Fedchenko, 1872 Parasitic in loaches imported from China. *Japanese Journal of Parasitology*. 31(6):507-16.
- AKAHANE H., R. LAMOTHE-ARGUMEDO, J. M. MARTÍNEZ-CRUZ, D. OSORIO-SARABIA & L. GARCÍA-PRieto. 1994. A morphological observations of the Advanced Third-Satge larvae of Mexican *Gnathostoma*. *Japanese Journal of Parasitology*. 43(1):18-22.
- AKAHANE H., R. LAMOTHE-ARGUMEDO, D. OSORIO-SARABIA, L. GARCÍA-PRieto, M. KOGA & K. IWATA. 1999. Morphological observations of *Gnathostoma turgidum* Stossich, 1902 obtained from an opossum in Mexico. Memorias del Congreso "Studies on the new creeping disease in Mexico." University of Fukuoka, Japón. 1999.
- AKAHANE H., M. SANO & T. MAKU. 1986. Morphological differences in Cross-Section of the Advanced Third-Satge Larvae of *Gnathostoma spinigerum*, *G. hispidum* and *G. doloresi*. *Japanese Journal of Parasitology* 35(5):465-467.
- ALMEYDA-ARTIGAS R. J. 1991. Hallazgo de *Gnathostoma binucleatum* n. sp. (Nematoda:Spirurida) en felinos silvestres y el papel de peces dulceacuicolas y oligohalinos como vectores de la gnatostomiasis humana en la cuenca baja del Río Papaloapan, Oaxaca-Veracruz, México. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México*. 18:137-155.
- ALMEYDA-ARTIGAS R. J., V. A. ACOSTA-HERNÁNDEZ., M. CASTAÑEDA-SÁNCHEZ & V. R. ZÁRATE-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 & S. MAS-COMA. 2000. ITS-2 rDNA sequencing of *Gnathostoma* species (Nematoda) and elucidation of the species causing human gnathostomiasis in the Americas. *Journal of Parasitology* 86(3):537-544.

- ALMEYDA-ARTIGAS R. J., M.A. MOSQUEDA-CABRERA, E. SÁNCHEZ-NUÑEZ, G. SALDAÑA-MARTÍNEZ, M. E. HERNÁNDEZ-VICICONTI & E. ALCOLEA-HERRERA. 1995. Development of *Gnathostoma binucleatum* Almeida-Artigas, 1991. (Nematoda:Gnathostomidae) in its first intermediate experimental host. *Research and Reviews in Parasitology* 55(3):189-194.
- ALVAREZ-GUERRERO C. & R. LAMOTHE-ARGUMEDO. 2000. Larva de *Gnathostoma* sp. en peces estuarinos de Nayarit, México. *Anales del Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Zoológica*.71(2):179-84.
- BRAVO-HOLLIS M. & J. CABALLERO-DELOYA. 1979. Catálogo de la Colección helmintológica del Instituto de Biología. *Anales del Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Zoológica*.(1):743-768.
- CABALLERO Y CABALLERO E. 1958. Estudios helmintológicos de la región oncocercosa de México y de la República de Guatemala. Nematoda. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México*. 9:61-76.
- CHANDLER A. C. 1932. Notes on the helminth parasites of the opossum (*Didelphis virginina*) in southeast Texas with descriptions of four new species. *Proceedings of the U.S. National Museum*.81 (Art.16):1-5.
- CHILTON N. B., R. B. GASSER & I. BEVERIDGE. 1995. Differences in a Ribosomal DNA Sequences of Morphologically Indistinguishable Species within the *Hypodontus macropi* complex (Nematoda:Strongyloidea). *International Journal of Parasitology*. 25(5): 647-651.
- COMISIÓN FEDERAL DE ELECTRICIDAD. 1991. Estudios específicos de fauna del embalse del Proyecto Hidroeléctrico Aguamilpa, Nayarit.
- DAENGSVANG S. 1980. A Monograph on the genus *Gnathostoma* and *Gnathostomiasis* in Thailand. SEAMIC South Asian Medical Information Center. Tokyo pp.
- DAENGSVANG S. 1982. *Gnathostomiasis*. In: J. H. Steele (ed.). Handbook Series in Zoonoses. Section C. Parasitic zoonoses. CRC Press.Boca Raton, Florida. vol. II. pp 147-180.
- DÍAZ-CAMACHO S. P., M. C. DE LA CRUZ-OTERO & K. WILLMS-MANNING. 2000. *Gnathostomosis*. *Revista de la Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México*.43(5):192-201.
- DIEGO N. & R.FONSECA. 1994. Estudios florísticos de Guerrero No 3. Laguna de Tres Palos. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 15 pp.
- DIKMANS G. 1931.A new nematode worm, *Viannaia bursobscura* from the opossum, with a note on other parasites of the opossum. *Proceedings U.S. National Museum*.79 (Art.31),1-4.

- GARCÍA E. & Z. FALCÓN DE G. 1974. Nuevo Atlas Porrúa de la República Mexicana. Ed. Porrúa, México. 219 pp.
- HILLIS D. M., B. K. MABLE, A. LARSON, S. K. DAVIS & E. A. ZIMMER. 1996. Nucleic Acids IV: Sequencing and Cloning. In: HILLIS D. M., C. MORITZ & B. K. MABLE. (eds.) Molecular Systematics. Sinauer, Sunderland, Massachusetts:321-381.
- IMAI J., Y. ASADA, Y. HORI, K. OGATA & K. OTSUKA. 1988. *Gnathostoma doloresi* larvae found in snakes, *Akistrodon halys*, captured in the Central part of Miyazaki Prefecture. *Japanese Journal of Parasitology*. 37(6):444-450.
- KIFUNE T., R. LAMOTHE-ARGUMEDO, L. GARCÍA-PRIETO, A. OCEGUERA-FIGUEROA & V. LEÓN-RÉGAGNON. 2002. *Gnathostoma binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991 (Spirurida:Gnathostomatidae) en peces dulceacuícolas de Tabasco, México. *Revista de Biología Tropical*. (Enviado)
- KOGA M., H. AKAHANE, Y. ISHII & S. KOJIMA. 1994. External Morphology of the Advanced Third-Stage Larvae of *Gnathostoma spinigerum*: A Scanning Electron Microscopy. *Japanese Journal of Parasitology*. 43(1):23-29.
- KOGA M., H. AKAHANE, R. LAMOTHE-ARGUMEDO, D. OSORIO-SARABIA, L. GARCÍA-PRIETO, J. M. MARTÍNEZ-CRUZ, S. P. DÍAZ-CAMACHO & K. NODA. 2000. Surface ultrastructure of Larval *Gnathostoma* cf. *binucleatum* from Mexico. *Comparative Parasitology*. 67(2):244-249.
- KOGA M., H. AKAHANE, K. OGATA, R. LAMOTHE-ARGUMEDO, D. OSORIO-SARABIA, L. GARCÍA-PRIETO & J. M. MARTÍNEZ-CRUZ. 1999. Adult *Gnathostoma* cf. *binucleatum* Obtained from Dogs Experimentally Infected with Larvae as an Etiological Agent in Mexican Gnathostomiasis: External Morphology. *Journal of the Helminthological Society of Washington*. 66(1):41-46.
- KOGA M., J. ISHIBASHI, Y. ISHII & T. NISHIMURA. 1988. Scanning Electron Microscopic Comparison Among the Early and Advanced Third-stage Larvae of *Gnathostoma hispidum* and the *Gnathostoma* Larvae Obtained from Loaches. *Japanese Journal of Parasitology*. 37(4):220-26.
- KOGA M. & Y. ISHII. 1987. Surface Morphology of the Advanced Third-Stage Larva of *Gnathostoma doloresi* -An Electron Microscopic Study-. *Japanese Journal of Parasitology*. 36(4):231-235.
- KOGA M., K. MOTOMURA, Y. ISHII & K. NINOMIYA. 1989. Fine Structure of the Early Third-stage and Developing Second-stage Larvae of *Gnathostoma doloresi* Reared in Cyclops. *Japanese Journal of Parasitology*. 38(5):301-306.

- LAMOTHE-ARGUMEDO R. 1992. Gnatostomiasis. *Anales del Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Zoología*. 63(1):155-159.
- LAMOTHE-ARGUMEDO R. 1997. Hospederos definitivos, intermediarios y paraténicos de *Gnathostoma* en Veracruz y Oaxaca. *Cuadernos Mexicanos de Zoología*. 3(1):22-28.
- LAMOTHE-ARGUMEDO R., H. AKAHANE, D. OSORIO-SARABIA & L. GARCÍA-PRieto. 1998. Hallazgo de *Gnathostoma turgidum* en *Didelphis virginiana* de Temascal, México. *Anales del Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Zoología*. 69(2):225-229.
- LAMOTHE-ARGUMEDO R., F. ALARCÓN-OSGUERA & R. M. SÁNCHEZ-MANZANO. 2001. Gnathostomosis ocular. Un caso mas registrado en México. *Revista Mexicana de Patología Clínica*. 48(4): 219-22.
- LAMOTHE-ARGUMEDO R., R. MEDINA-VEENCES., S. LÓPEZ-JIMENEZ. & 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*. 60(3):311-320.
- LAMOTHE-ARGUMEDO R. & 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 V., L. GARCÍA-PRieto., D. OSORIO-SARABIA & JIMÉNEZ-RUIZ A. 2000. Gnathostomosis in Fish from Tres Palos Lagoon, Guerrero, Mexico. *Emerging Infectious Disease*. 6(4):4.
- LEÓN-RÉGAGNON V., D. OSORIO-SARABIA., L. GARCÍA-PRieto., H. AKAHANE., R. LAMOTHE-ARGUMEDO., M. KOGA., M. MESSINA-ROBLES & C. ALVAREZ-GUERRERO. 2002. Study of the etiological agent of gnatostomosis in Nayarit, Mexico. *Parasitology International* (en prensa)
- LÓPEZ-HERNÁNDEZ E. S & C. PÉREZ-LÓPEZ. 1993. Guía para la interpretación de la naturaleza en los Pantanos de Centla, Tabasco. Universidad Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Tabasco, México. 106pp.
- LÓPEZ-JIMENEZ S. & L. GARCÍA-MAGAÑA. 2000. Estudio de larvas de *Gnathostoma* sp. en tres especies de peces de los pantanos de Centla, Tabasco. *Universidad y Ciencia*. 16(31):41-48.
- MARTÍNEZ-CRUZ J., R. BRAVO-ZAMUDIO, R. ARANDA & M. MARTÍNEZ. 1989. La Gnathostomiasis en México. *Salud Pública de México*. 31(4):541-49.

- MIYAZAKI I. 1954. Studies on *Gnathostoma* Occurring in Japan (Nematoda: Gnathostomidae) II. Life History of *Gnathostoma* and morphological comparison of its larva forms. *Kyushu Memories of Medical Sciences*. 5(2):123-139.
- MIYAZAKI I. 1960. On the genus *Gnathostoma* and human gnathostomiasis, with special reference to Japan. *Experimental Parasitology*.9(3):338-370.
- MIYAZAKI I. 1966. *Gnathostoma* and gnathostomiasis in Japan. In: Morshita K., Y. Komiya and H. Matsubayashi (Editors). *Progress of Medical Parasitology in Japan*. Vol.3:529-586.
- MIYAZAKI I. 1991. An Illustrated Book of Helminthic Zoonoses. International Medical Foundation of Japan, Fukuoka, Japan. 494p.
- MIYAZAKI I., T. KIFUNE., S. HABE & N. UYEMA. 1978. Reports of Fukuoka University. Scientific Expedition to Peru. Department of Parasitology. School of Medicine, Fukuoka University.28p.
- MORAVEC F. 1998. Nematodes of fresh water fishes of the neotropical region. Academia. Praha. 464 pp.
- NAWA Y., J. IMAI, Y. HORII, K. OGATA & K. OTSUKA. 1993. *Gnathostoma doloresi* larvae found in *Lepomis macrochirus* Rafinisque, a freshwater fish (Common name bleu-gill) in the central part of Miyazaki Prefecture, Japan. *Japanese Journal of Parasitology*.42(1):40-43.
- NOMURA Y., K. NAGAWARA, N. KAGEII, Y. TSUMI, K.AKARI & M.SUGAWARA. 2000. Gnathostomiasis possibly caused by *Gnathostoma malaysiae*. *Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine*. 25(1):81-86.
- OGATA K, J. IMAI & Y. NAWA. 1988 Three Confirmed and Five Suspected Human Cases of *Gnathostoma doloresi* Infection Found in Miyazaki Prefecture, Kyushu. *Japanese Journal of Parasitology*. 37(5):358-64.
- OGATA K., Y. NAWA, H. AKAHANE, S.P. DIAZ-CAMACHO, R. LAMOTHE-ARGUMEDO & A.CRUZ-REYES. 1998. Short report of Gnathostomiasis in Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 58(5):316-318.
- OWEN R. 1836. Anatomical description of two species of Entozoa from the stomach of a tiger, one of wich forms a new genus of Nematoida. *Proceedings of the Zoological Society of London*. Part 4. 122-126.
- PELÁEZ R. D. & R. PÉREZ-REYES. 1970. Gnatostomiasis humana en América. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 12:83-91.
- PÉREZ-PONCE DE LEÓN G., L. GARCÍA-PRIETO, D. OSORIO-SARABIA & V. LEÓN-RÉGAGNON. 1996. Listados faunísticos de México. VI Helminfos parásitos de peces de aguas continentales de México. Instituto de Biología. UNAM. 101pp.

- RUIZ J. M. 1952. Sobre um novo *Gnathostoma* assinado no Brasil (Nematoda: Gnathostomatidae). *Memorial do Instituto Butantan*. 24:fasc.1:37-44.
- SATO H., H. KAMIYA & K. HANADA. 1992. Five confirmed human cases of *Gnathostoma nipponicum* recently found in Northern Japan. *Journal of Parasitology*. 78(6):1006-10.
- SALGADO-MALDONADO G., G. CABAÑAS-CARRANZA, E. SOTO-GALERA, J. M. CASPETA-MANDUJANO, R. G. MORENO-NAVARRETE, P. SÁNCHEZ-NAVA & R. AGUILAR-AGUILAR. 2001. A Checklist of the Helminth parasites of freshwater fishes from the Lerma-Santiago River Basin, Mexico. *Comparative Parasitology*. 68(2):204-218.
- STEVENSON L. A., N. B. CHILTON & R. B. GASSER. 1995. Differentiation of *Haemonchus placei* from *H. contortus* (Nematoda Tichostrongylidae) by the Ribosomal DNA Second Internal Transcribed Spacer. *International Journal of Parasitology*. 25 (4):483-488.
- STOCK S. P., J. HENG, D. J. HUNT, A. P. REID, X. SHEN & H. Y. CHOO. 2001. Redescription of *Steinernema longicaudum* Shen & Wang (Nematoda: Steinernematidae); geographic distribution and phenotypic variation between allopatric populations. *Journal of Helminthology*. 75:81-92.
- VIDAL-MARTINEZ V. M. & C. R. KENNEDY. 2000. Zoogeographical determinants of the composition of the helminth fauna of neotropical cichlid fish. In: SALGADO-MALDONADO G., A. N. GARCIA-ALDERETE., V. M. VIDAL-MARTINEZ. (eds.) Metazoan parasites in the neotropics: A systematic and ecological perspective. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México:227-290.

Apéndice 1. Secuencias alineadas del ITS-2 del ADN ribosomal de *G. binucleatum*; (1) *G. binucleatum* disponible en GenBank.(8) *P. splendida*, Cuenca Papaloapan. (16) *P. splendida*, Cuenca del Papaloapan.(22) *C. managuense*, Tabasco.(32) *P. splendida*, Cuenca del Papaloapan.

```

      16      20      30      40      50      60      70      80      90
G. binucleatum(1)
      --TTATTGAA ATATGATGGT GACACGATGC GGAGCGAGGG ATCTCGTCTC GCGGCGGCGA GGTCTTCGTT TGCAGTGTGG TGTTCAITCA
8      GATTATTGAA ATATGATGGT GACACGATGC GGAGCGAGGG ATCTCGTCTC GCGGCGGCGA GGTCTTCGTT TGCAGTGTGG TGTTCAITCA
16     GATTATTGAA ATATGATGGT GACACGATGC GGAGCGAGGG ATCTCGTCTC GCGGCGGCGA GGTCTTCGTT TGCAGTGTGG TGTTCAITCA
22     GATTATTGAA ATATGATGGT GACACGATGC GGAGCGAGGG ATCTCGTCTC GCGGCGGCGA GGTCTTCGTT TGCAGTGTGG TGTTCAITCA
32     GATTATTGAA ATATGATGGT GACACGATGC GGAGCGAGGG ATCTCGTCTC GCGGCGGCGA GGTCTTCGTT TGCAGTGTGG TGTTCAITCA

```

```

      100     110     120     130     140     150     160     170     180
G. binucleatum(1)
      TTTAGCGGCA GGTGATGTTG ACGCCTTAAA TGGTTGCATC CCATGCTTAG TGGATCAGTC GTGCGCGAGA GGTCTTCATC TCTCTAAGTG
8      TTTAGCGGCA GGTGATGTTG ACGCCTTAAA TGGTTGCATC CCATGCTTAG TGGATCAGTC GTGCGCGAGA GGTCTTCATC TCTCTAAGTG
16     TTTAGCGGCA GGTGATGTTG ACGCCTTAAA TGGTTGCATC CCATGCTTAG TGGATCAGTC GTGCGCGAGA GGTCTTCATC TCTCTAAGTG
22     TTTATCGGCA GGTGATGTTG ACGCCTTAAA TGGTTGCATC CCATGCTTAG TGGATCAGTC GTGCGCGAGA GGTCTTCATC TCTCTAAGTG
32     TTTAGCGGCA GGTGATGTTG ACGCCTTAAA TGGTTGCATC CCATGCTTAG TGGATCAGTC GTGCGCGAGA GGTCTTCATC TCTCTAAGTG

```

```

      190     200     210     220     230     240     250     260     270
G. binucleatum(1)
      CGTACGAGTG TGGCGCATCG TCGAGAAATG GCGATGATGA TGATAATGTT GATGCTCGAG TGTGTGGCCA AACGTAAGGA TCGTACGGGG
8      CGTACGAGTG TGGCGCATCG TCGAGAAATG GCGATGATGA TGATAATGTT GATGCTCGAG TGTGTGGCCA AACGTAAGGA TCGTACGGGG
16     CGTACGAGTG TGGCGCATCG TCGAGAAATG GCGATGATGA TGATAATGTT GATGCTCGAG TGTGTGGCCA AACGTAAGGA TCGTACGGGG
22     CGTACGAGTG TGGCGCATCG TCGAGAAATG GCGATGATGA TGATAATGTT GATGCTCGAG TGTGTGGCCA AACGTAAGGA TCGTACGGGG
32     CGTACGAGTG TGGCGCATCG TCGAGAAATG GCGATGATGA TGATAATGTT GATGCTCGAG TGTGTGGCCA AACGTAAGGA TCGTACGGGG

```

```

      280     290     300     310     320     330     340     350     360
G. binucleatum(1)
      AATATCATGC TACACATCGA GTTGATCATG CTGTGATGTC GTGCGCATTG TCGCTTATCG AGCACGTTTA TTGCCTTAAC GAGGACGGCG
8      AATATCATGC TACACATCGA GTTGATCATG CTGTGATGTC GTGCGCATTG TCGCTTATCG AGCACGTTTA TTGCCTTAAC GAGGACGGCG
16     AATATCATGC TACACATCGA GTTGATCATG CTGTGATGTC GTGCGCATTG TCGCTTATCG AGCACGTTTA TTGCCTTAAC GAGGACGGCG
22     AATATCATGC TACACATCGA GTTGATCATG CTGTGATGTC GTGCGCATTG TCGCTTATCG AGCACGTTTA TTGCCTTAAC GAGGACGGCG
32     AATATCATGC TACACATCGA GTTGATCATG CTGTGATGTC GTGCGCATTG TCGCTTATCG AGCACGTTTA TTGCCTTAAC GAGGACGGCG

```

```

      370     380     390     400     410     420
G. binucleatum(1)
      ATGAACGGCT CCGGATGAAT CGACATCATC TATCGATGAA CGTCGATAGC AGCGCCTCAT TGT
8      ATGAACGGCT CCGGATGAAT CGACATCATC TATCGATGAA CGTCGATAGC AGCGCCTCAT TGT
16     ATGAACGGCT CCGGATGAAT CGACATCATC TATCGATGAA CGTCGATAGC AGCGCCTCAT TGT
22     ATGAACGGCT CCGGATGAAT CGACATCATC TATCGATGAA CGTCGATAGC AGCGCCTCAT TGT
32     ATGAACGGCT CCGGATGAAT CGACATCATC TATCGATGAA CGTCGATAGC AGCGCCTCAT TGT

```

A=Adenina;G=Guanina;T=Timina;C=Citosina.

Apéndice 2. Secuencias alineadas del ITS-2 del ADN ribosomal *G. turgidum*; (1) *G. turgidum* disponible en GenBank. (2) *G. turgidum* reportado en este trabajo.

	10	20	30	40	50	60	70	80
<i>G. turgidum</i> (1)	TTTTGAAAAA	TGRCCGACATG	ATGATGATGC	AGTGTGCTG	GTGCTAATG	TCGACGGCTT	ACTCGTCACG	GTGCGACGAG
<i>G. turgidum</i> (2)	TTTTGAAAAA	TGACGACATG	ATGATGATGC	AGTGTGCTG	GTGCTAATG	TGACGGCTT	ACTCGTCACG	GTGCGACGAG
	90	100	110	120	130	140	150	160
<i>G. turgidum</i> (1)	GGAGGCGGCC	TCTCATCCTC	CATTGTCTAT	TGTGTGTTT	GGCGGCACGT	GATGTTGATG	CCTTAAATG	TTCATCCGA
<i>G. turgidum</i> (2)	GGAGGCGGCC	TCTCATCCTC	CATTGTCTAT	TGTGTGTTT	GGCGGCACGT	GATGTTGATG	CCTTAAATG	TTCATCCGA
	170	180	190	200	210	220	230	240
<i>G. turgidum</i> (1)	TGCTTAGTTG	ACCAGTCGTA	TGTGAGAAAA	TATGCATACG	CGAGTGGTGC	GTTATCGCGC	AATGACGATG	ATGATGATGA
<i>G. turgidum</i> (2)	TGCTTAGTTG	ACCAGTCGTA	TGTGAGAAAA	TATGCATACG	CGAGTGGTGC	GTTATCGCGC	AATGACGATG	ATGATGATGA
	250	260	270	280	290	300	310	320
<i>G. turgidum</i> (1)	TGTTGGGGTG	TGGCGGACGT	GAGGATCGTC	CTATGGCTGC	TATGTCACAC	TTCGGATTGA	CGGTGATG	ATCATCATCG
<i>G. turgidum</i> (2)	TGTTGGGGTG	TGGCGGACGT	GAGGATCGTC	CTATGGCTGC	TATGTCACAC	TTCGGATTGA	CGGTGATG	ATCATCATCG
	330	340	350	360				
<i>G. turgidum</i> (1)	CATGCTGCCG	GTCATGATGA	TAGTTGCCGG	CCTCGTTAT				
<i>G. turgidum</i> (2)	CATGCTGCCG	GTCATGATGA	TAGTTGCCGG	CCTCGTTAT				

A=Adenina;G=Guanina;T=Timina;C=Citosina.