



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL GÉNERO GNATHOSTOMA
OWEN, 1836 (NEMATODA: GNATHOSTOMATIDAE).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

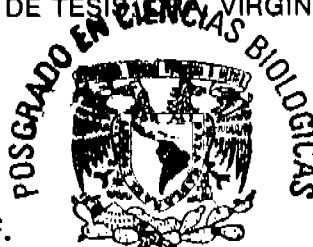
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(SISTEMÁTICA)

P R E S E N T A

FLORENCIA BERTONI RUIZ

DIRECTORA DE TESIS MAESTRA VIRGINIA LEON REGAGNON



MÉXICO, D.F.

ABRIL, 2006

COORDINACIÓN



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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Florencia Bestani Ruiz

FECHA: 21 de abril de 2006

~~DATA:~~

**ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL GÉNERO *GNATHOSTOMA*
OWEN, 1836 (NEMATODA: GNATHOSTOMATIDAE).**



Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 27 de febrero del 2006, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Sistemática) de la alumna **Bertoni Ruiz Florencia** con número de cuenta **92236736** con la tesis titulada: "**Análisis filogenético del género Gnathostoma Owen, 1836 (Nematoda: Gnathostomatidae)**", bajo la dirección de la **Dra. Virginia León Regagnon**.

Presidente:	Dr. Marcos Rafael Lamothe Argumedo
Vocal:	M. en. C. David Nahum Espinosa Organista
Secretario:	Dra. Virginia León Regagnon
Suplente:	Dr. Fernando Álvarez Noguera
Suplente:	Dra. Gabriela Parra Olea

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 18 de abril del 2006


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Reconocimientos

A la doctora Virginia León Rêgagnon, directora del presente trabajo.

A la Dra. Gabriela Parra Olea y el M. en C. David Espinosa Organista, miembros del comité tutorial.

A los Doctores Rafael Lamothe Argumedo y Fernando Álvarez Noguera, miembros del jurado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y a la Dirección General de Estudios de Posgrado, por el apoyo económico proporcionado durante la realización de este trabajo.

Al proyecto IN201403 PAPIIT-UNAM

Agradecimientos:

Al Instituto de Biología gran recinto del estudio de la biodiversidad mexicana.

A la Dra. Virginia León, por dirigir amable y pacientemente mi tesis. Por todo su apoyo, por soportar mis distracciones y altibajos.

A la Dra. Gabriela Parra y al Maestro David Espinosa por ser parte de mi comité tutorial y por la continua revisión a los avances de mi proyecto.

Al Dr. Rafael Lamothe, por sus valiosas aportaciones y observaciones.

Al Dr. Fernando Álvarez, por la rápida, pero muy constructiva corrección de la tesis.

A la Dra. Patricia Escalante, jefa del departamento de biología por las facilidades e instalaciones prestadas en la realización del trabajo.

A la M. en C. Berenit Mendoza, por tomar las fotos de microscopía electrónica de barrido. También por su solidaridad y apoyo durante todo este proceso.

A la Dr. Gerardo Pérez Ponce de León, por el préstamo del analizador de imágenes, microscopio y scanner.

A la M. en C. Laura Márquez, por su cordial ayuda en la obtención de secuencias.

A Roció de posgrado, por sus atenciones para la realización de los trámites, préstamo de computadoras y scanner.

Al Dr. Eric Smith por su repetida y muy amable explicación del método GFC.

Dr. H. Akahane (†), Dr. Ando, Dra. J. Kaira, Dr. E. Hoberg y Dra. P. Pillit, Dr. S Garner y A. Jiménez y M. en C. Luis García la donación o préstamo de material.

A Luis García por estar siempre dispuesto a las preguntas, peticiones y a ayudar a todos. Por leer y corregir mi tesis...por que siga haciendo "algo" por el estudio de *Gnathostoma*.

A el M. en C. David Osorio, por los comentarios a mi tesis y por su apoyo en diversos aspectos de su realización.

A Felipe Luna por su ayuda en los engargolados, fotocopiado y prestamos bibliotecarios.

A mis compañeros: Jorge Falcón, Rogelio, Elizabeth, Ulises, Rosario, David, Lorena, Luis, Tony, Alejandro, Jorgito, Armando, Arlette, Rocío, Luz, Yolanda y Violeta por su ayuda en las recolectas y procesamiento de material. Por hacer del laboratorio de helmintología el mejor del instituto.

A Chayo y a Alejandro por su invaluable ayuda en el laboratorio de biología molecular, en el procesamiento de datos y en la revisión del escrito. A Lore por su continuo apoyo. A los tres por hacer más amigable la estancia en el laboratorio, por los chismes y buenos momentos durante la comida.

A Elisa mi mejor amiga, por que en las buenas y malas experiencias siempre he tenido su apoyo.

A Rick, Jorge, Anahí , Elisa y Arturo, porque somos "los que fuimos al Norte" y siempre sigamos unidos.

A las comadres: Marcia, Araceli, Anahí y Elisa, por las reflexivas, serpenteantes y terapéuticas y muy necesarias reuniones.

Mis amigos de generación: Isra, Dona, Paty, Karina, Esteban, Itzel, Carlitos, Diego, Maripili, Nino, Gaby, Iván, Marcia, Anahí, Elisa, Rick, Arturo, Chino y Ara. Por los buenos y malos momentos, por seguir compartiéndolos.

A Rodrigo por su paciencia, ayuda y solidaridad...por motivarme, por soportarme y quererme. Por hacer mejor mi vida.

A Rodrigo por ser ese gran árbol bajo el cual el tiempo pasa imperceptible y las ilusiones y sueños se vuelven infinitos.

A mis Padres Delfina y Vicente (†) con todo mi agradecimiento y cariño.

A mis hermanas Claudia, Yaneli y Ruth, porque las Bertoni sigamos siempre unidas.

A Rosy , Gabriel y Alonso, mi segunda familia, por todo el apoyo brindado.

A Godo por su gran franqueza e inolvidable sonrisa, por las enseñanzas y los momentos que nunca olvidaré.

CONTENIDO

Resumen -----	4
Introducción -----	6
Sistemática filogenética	
Sistemática molecular	
Estudio de biología comparada con parásitos	
Antecedentes -----	9
Ciclo de Vida	
Sistemática del género	
Estudios de sistemática molecular con <i>Gnathostoma</i>	
Relación de <i>Gnathostoma</i> con sus hospederos y su distribución geográfica	
Justificación -----	15
Objetivos -----	16
Material y Metodos -----	17
Obtención de material -----	17
a) Salidas al campo. Recolecta de animales silvestres	
b) Adquisición de material por donación o préstamo	
Análisis filogenético -----	19
Estudio morfológico -----	19
a) Revisión de información bibliográfica	
b) Revisión de ejemplares obtenidos mediante recolectas	
c) Técnica utilizadas	
d) Elección de caracteres morfológicos	
e) Determinación de grupo externo	
c) Análisis de caracteres multiestado polimórficos con GFC y construcción de matrices	
Estudio molecular -----	24
a) Obtención de caracteres moleculares	
Obtención de la hipótesis morfológica y molecular -----	26
Resultados -----	26
Recolecta de hospederos y ejemplares de <i>Gnathostoma</i> en México	
Análisis filogenético con datos morfológicos -----	26
Caracteres	
Discusión de la filogenia morfológica	

Análisis filogenético con datos moleculares	34
Discusión de filogenia molecular	
Revisión taxonómica del género en América	37
<i>Gnathostoma americanum</i>	
<i>Gnathostoma binucleatum</i>	
<i>Gnathostoma lamothei</i>	
<i>Gnathostoma procyonis</i>	
<i>Gnathostoma socialis</i>	
<i>Gnathostoma turgidum</i>	
Discusión General y Conclusiones	59
Bibliografía	65
Apéndice 1. Ejemplares revisados en la USNPC y en el HWML	70
Apéndice 2. Matrices morfológicas para GFC	72
Apéndice 3. Técnicas de biología molecular	86
Apéndice 4. Caracteres morfológicos	88
Apéndice 5. Alineamiento de Secuencias	99
Apéndice 6. A new species of <i>Gnathostoma</i> (Nematoda: Gnathostomatidae) in <i>Procyon lotor herandezii</i> from México	106

Resumen

El género *Gnathostoma* fue descrito por Owen en 1836; a partir de entonces se han registrado 12 especies parásitas de mamíferos en Asia y América. El estudio de este género se incrementó al descubrirse su importancia médica, debido a que las larvas de tercer estadio avanzado de especies como *G. spinigerum*, *G. hispidum*, *G. doloresi*, *G. nipponicum* y *G. binucleatum*, son capaces de infectar al hombre causando una enfermedad llamada gnatostomiasis.

Con el desarrollo de la sistemática filogenética se dio un giro en el estudio de las relaciones entre grupos parásitos y se abandonó el uso de los datos del hospedero para inferir su identidad e historia evolutiva; lo anterior, aunado al desarrollo de técnicas moleculares, robusteció el estudio evolutivo de estos organismos. Dentro de este marco se realizó el análisis filogenético del género *Gnathostoma* con base en datos morfológicos (obtenidos de ejemplares adultos) y moleculares (a partir de las secuencias del gen ribosomal 28S). Mediante recolectas en el campo, donación o préstamo por parte de varias instituciones, se obtuvieron los gusanos estudiados tanto morfológica como molecularmente. Siguiendo la metodología cladista se analizaron individualmente ambos tipos de datos. En total se obtuvieron 21 caracteres morfológicos, en su mayoría binarios y multiestado; cuatro de estos fueron multiestado polimorficos y se analizaron con el método "Generalized Frequency Coding". Se obtuvieron las secuencias de *G. binucleatum*, *G. doloresi*, *G. hispidum*, *G. lamothei*, *G. nipponicum*, *G. spinigerum* y *G. turgidum*; éstas fueron alineadas resultando una matriz de 599 sitios por 15 taxones, mostrando una divergencia de 1-6.2 % entre sí. Ambas matrices se corrieron en PAUP, realizando análisis de parsimonia máxima con búsqueda heurística de árboles. Se obtuvo un árbol en cada uno de los casos. El árbol de datos morfológicos tuvo valores de: L=1951, IC= 0.727, RI=0.56 y RC= 0.404, mientras que el de datos moleculares presentó: L=317, IC= 0.933, RI=0.796 y RC= 0.760.

El análisis filogenético mostró que el género *Gnathostoma* es monofilético y que su origen probablemente fue en América del norte y su historia de diversificación y distribución en el mundo siguió un patrón general ligado estrechamente a los mamíferos carnívoros. Los cambios de hospedero en diferentes momentos de la historia del género podrían estar jugando un papel importante en la evolución del mismo, así como el intercambio de faunas a través del paso de Bering y del Istmo de Panamá; de la misma forma, el aislamiento de taxones tras la última glaciación, tuvo influencia en la evolución

del género así como en la presencia del amplio espectro hospedatorio con que este grupo de nemátodos cuenta.

Las especies asiáticas y americanas no formaron dos clados independientes. De la misma manera, las especies que parasitan al hombre no representan un grupo monofilético; lo que sugiere que todas las especies del género pueden tener la capacidad de infectar al hombre, siempre y cuando tengan un hospedero intermediario o paraténico incorporado a la cadena alimenticia del humano.

Entre los aspectos taxónicos derivados del estudio filogenético se encuentra la afirmación de la independencia de *G. binucleatum* y *G. socialis*, ambas señaladas por algunos autores como sinónimas de *G. spinigerum*. Debido a lo anterior, la composición actual del género asciende a 13 especies: *G. americanum*, *G. binucleatum*, *G. doloresi*, *G. hispidum*, *G. lamothei*, *G. miyazakii*, *G. malasiae*, *G. nipponicum*, *G. procyonis*, *G. socialis*, *G. vietnamicum*, *G. spinigerum* y *G. turgidum*.

Finalmente, y a pesar de que faltan algunos aspectos por cubrirse para realizar una hipótesis más robusta de las relaciones entre las especies de *Gnathostoma*, este trabajo constituye un primer acercamiento a la filogenia del género y puede sentar las bases para estudios taxonómicos y filogenéticos posteriores.

Abstract

The genus *Gnathostoma* was described by Owen 1836. Twelve species parasitizing mammals have been recorded in the world so far. The study of this genus was increased when it was discovered its medical importance, since the advanced third stage larvae of some species (*G. spinigerum*, *G. hispidum*, *G. doloresi*, *G. nipponicum* and *G. binucleatum*) are able to infect humans causing the disease called gnathostomiasis.

A phylogenetic analysis of *Gnathostoma* was carried out with morphological (obtained from adult specimens) and molecular data (28S ribosomal gene sequences). The worms were obtained through collects, donations or loans. Following cladistic methodology both kinds of data were analyzed; in total 21 morphological characters were obtained, 17 binary and multistate and four polymorphic multistate. The latter were analyzed with the method "Generalized Frequency Coding". The sequences obtained for *G. binucleatum*, *G. doloresi*, *G. hispidum*, *G. lamothei*, *G. nipponicum*, *G. spinigerum* and *G. turgidum* were aligned to build a matrix of 599 sites by 15 taxa. The matrices were analyzed in PAUP with maximum parsimony and heuristic search. The morphological tree had: L=1951, CI = 0,727, RI=0.56 and RC = 0,404, whereas the molecular tree presented: L=317, CI = 0,933, RI=0.796 and RC = 0.760. The phylogenetic analysis pointed out that *Gnathostoma* is a monophyletic group and it was probably originated in North America. The diversification and distribution of this genus was closely related with those of carnivore mammals. Likely the host-switching, the interchange of faunas through Beringian passage and Panama Isthmus, and the taxa isolation during the last glaciation, played an important role in the evolution of this genus and its presence in several hosts. On the other hand, neither Asiatic and American species, nor the species parasitizing humans represent monophyletic groups; this suggests all species of *Gnathostoma* can be parasites of humans, if they have incorporated an intermediary or paratenic host in their nutritional chain. The phylogenetic study suggests that *G. socialis* is not a junior synonym of *G. spinigerum*, therefore *Gnathostoma* includes 13 species: *G. americanum*, *G. binucleatum*, *G. doloresi*, *G. hispidum*, *G. lamothei*, *G. miyazakii*, *G. malasiae*, *G. nipponicum*, *G. procyonis*, *G. socialis*, *G. vietnamicum*, *G. spinigerum* and *G. turgidum*.

Although some aspects can be improved to get a more robust hypothesis about relationships among species of *Gnathostoma*, this study represents the first approximation to the genus phylogeny and the baseline for future taxonomic and phylogenetic surveys.

INTRODUCCIÓN

Sistemática Filogenética

Durante más de la mitad del siglo 20, los esfuerzos de los sistemáticos enfocados a reconstruir la historia filogenética de los organismos, estuvieron basados en criterios poco objetivos. Esta situación cambió cuando se definieron métodos precisos para la reconstrucción de la historia evolutiva, a partir de atributos de los organismos actuales y fósiles, principalmente a través de la metodología propuesta por el zoólogo Willi Hennig (1966). Posteriormente, estos métodos fueron refinados y se desarrollaron criterios explícitos para generar estimaciones filogenéticas, instituyéndose una de las escuelas en sistemática más importante hasta el momento: la sistemática filogenética o cladismo (Wiley, 1981).

La sistemática filogenética emplea métodos empíricos y principios estrictamente evolutivos para formar clasificaciones más que depender de la intuición o la autoridad (Wiley, 1981). En este método el concepto de homología ha sido central. Así, los cladistas cuentan con criterios morfológicos, filogenéticos, paleontológicos y embriológicos y con la correlación de series de transformación para la identificación de las homologías derivadas (sinapomorfias) y ancestrales (plesiomorfias) (Hennig, 1966; Wiley, 1981; Schuh, 2000). A partir del análisis de la forma y estado de las sinapomorfias, se establecen las relaciones de ancestría y descendencia. Las sinapomorfias definen agrupamientos a diferentes niveles que se consideran como grupos monofiléticos o naturales (Hennig, 1966; Schuh, 2000). De manera contraria, las plesiomorfias (caracteres ancestrales) y las simplesiomorfias (caracteres ancestrales compartidos) no son útiles para determinar grupos monofiléticos, pues no son caracteres heredados directamente de un ancestro común inmediato (Wiley, 1981).

Las hipótesis de relaciones filogenéticas son expuestas en esquemas de ramificación dicotómica (Schuh, 2000); estos esquemas son llamados cladogramas y a partir de ellos es posible construir clasificaciones (Wiley, 1981). Tras un análisis cladista se obtienen varias hipótesis (cladogramas); el criterio de parsimonia (menor número de cambios) permite decidir entre una de las hipótesis resultantes (Wiley, 1981).

Sistemática molecular

Aproximadamente al mismo tiempo de los avances en los métodos de estimación filogenética en los años 60, las técnicas para obtener la secuencia molecular de las proteínas y ácidos nucleicos de los organismos fueron adoptadas por los biólogos evolutivos y los datos obtenidos para la estimación filogenética comenzaron a incrementarse. Una de las razones centrales de este incremento fue el desarrollo de una nueva herramienta: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). Ésta es de gran utilidad para la replicación *in vitro* del DNA, lo que la hace una herramienta con un poder inigualable en la sistemática filogenética. Lo anterior, en unión con el desarrollo y utilización de un amplio grupo de iniciadores para la amplificación de genes (primers), han incrementado la cantidad de datos referentes a la variación de las secuencias de DNA dentro y entre las especies. A la fecha, se han construido algoritmos para el análisis y comparación de secuencias en programas computarizados, con los cuales es posible el análisis de grupos de datos grandes y complejos (Hillis *et al.*, 1996).

En las secuencias de DNA, los caracteres son los sitios o loci del DNA ocupados por un nucleótido en particular, el cual será a su vez el estado de carácter presente, siendo entonces cuatro los posibles estados: adenina, citosina, guanina y timina o uracilo (en el caso de RNA) (ACGT ó U) (Hillis *et al.*, 1996). Determinar la homología de sitios al comparar secuencias de DNA o RNA entre taxones es referido como un alineamiento. Dos o más sitios que se encuentran en una localización similar dentro de la secuencia, pueden representar homología, debido a que ellos están ocupados por el mismo nucleótido. No obstante, secuencias como el DNA ribosomal pueden tener un número variable de nucleótidos entre diferentes taxones, así como algunas áreas no homólogas insertadas o áreas duplicadas, por lo cual, además de requerir el uso de moléculas homólogas, un análisis filogenético de secuencias requiere también de homología posicional (Hillis *et al.*, 1996).

Estudios de biología comparada con parásitos

El primer investigador en utilizar a los parásitos y los patrones de distribución de sus hospederos como evidencia de la deriva continental fue Von Ihering (1891, 1902 En: Brooks y Mc Lennan, 1993). Este autor propuso que las relaciones entre los helmintos y sus hospederos pueden ayudar en la estimación de la edad mínima de especies y

géneros (dando énfasis a la especificidad hospedatoria); también propuso que los parásitos pueden tener una especiación paralela a sus hospederos si estos últimos fueron aislados geográficamente. Por su parte, Kellogg (1896, 1913 y 1914 En: Brooks y McLennan, 1993) señaló que la especiación del hospedero tras un aislamiento geográfico, no implicaba necesariamente la especiación de sus parásitos, argumentando que el medio es el que cambia e influye directamente sobre el hospedero; en cambio, para los parásitos no se modifican las condiciones al interior éste. También considera que la especificidad hospedatoria no es tajante, indicando que existen especies de parásitos en más de dos especies de hospederos no relacionadas entre sí y habitando una misma región.

Fué hasta el desarrollo del método cladista cuando se robusteció el estudio de la evolución de grupos parásitos. El uso de la distribución geográfica y/o datos del hospedero para inferir la identidad de los parásitos y sus relaciones filogenéticas fueron abandonados.

A partir de que se comenzaron a utilizar las relaciones parásito - hospedero para explicar procesos evolutivos, han sido realizados varios trabajos de los cuales se han desprendido algunas reglas e ideas nuevas aplicadas a los patrones de especiación de los parásitos y la especificidad hospedatoria, entre otros aspectos. Brooks y McLennan (1993) han integrado algunas de estas ideas en una propuesta que involucra el estudio evolutivo de los parásitos y sus hospederos: "Parascript" (los parásitos y el lenguaje de la evolución), concepto que fue propuesto por Manter (1966, En: Brooks y McLennan, 1993). Con el Parascript se intentan esclarecer los patrones geográficos de los parásitos y de asociación con sus hospederos. Las asociaciones pueden exhibir dos clases de patrones. Primero, una especie de parásito puede presentarse en un área particular y en un hospedero particular por la acción de la vicarianza y porque sus ancestros y los ancestros de sus hospederos interactuaron en el pasado. Segundo, los parásitos pueden presentarse en un hospedero o área particular por la acción de la dispersión o cambio de hospedero. En cada caso las especies parásitas tienen una asociación inherente, y su historia filogenética puede ser o no congruente con la historia geológica de las áreas o la historia filogenética de los hospederos.

ANTECEDENTES

El género *Gnathostoma* fue descrito por Owen en 1836 tras el hallazgo de algunos ejemplares de *G. spinigerum* parasitando el estómago de un tigre de Bengala (*Panthera tigris*) en el zoológico de Londres. A partir de entonces varias especies se han descrito como parásitas de distintos taxones de vertebrados y de algunos invertebrados, cuya distribución básicamente se restringe a dos continentes: Asia y América. En Asia los países que cuentan con registros son Japón, Tailandia, Malasia, China, India, Vietnam, Filipinas, Sri-Lanka, Birmania, Bangladesh, Sumatra, Israel, Rusia e Islas Mentawai (Miyazaki, 1960, 1991; Daengsvang, 1980; Lamothe, 1997). Hasta el momento, en América, se ha señalado la presencia de especies de *Gnathostoma* en los siguientes países: Canadá, E.U.A, México, Perú, Brasil, Panamá, Ecuador y Argentina (Daengsvang, 1980; Ollague, 1985; Lamothe, 1997). También se han realizado registros aislados en Hungría, Alemania, Turquía, Australia y Zaire (Daengsvang, 1980; Miyazaki, 1991).

El estudio de los nemátodos de este género se incrementó a partir de que se descubrió su importancia médica, ya que las larvas de tercer estadio avanzado (L₃A) de algunas especies como *G. spinigerum*, *G. hispidum*, *G. doloresi*, *G. nipponicum* y *G. binucleatum* (Miyazaki, 1991; Almeyda-Artigas, 1991; León-Régagnon *et al.*, 2002) son capaces de infectar de manera accidental al hombre cuando éste ingiere carne cruda de sus segundos hospederos intermediarios o paraténicos, especialmente peces, causando un padecimiento denominado gnatostomiasis, la cual presenta prevalencias muy altas en países como Tailandia y Japón y sólo casos aislados en algunos otros.

Ciclo de vida

Los gusanos adultos habitan principalmente en la pared del estómago, aunque también algunas especies se han encontrado alojadas en el esófago y riñones de sus hospederos definitivos. Las hembras después de la cópula, depositan huevos que son conducidos al exterior a través de las heces (u orina al encontrarse en riñones). Al estar en contacto con un cuerpo de agua dulce o salobre, los huevos continúan su desarrollo diferenciándose una larva de primer estadio (L₁), la cual sufre una muda transformándose en una larva 2 (L₂). Dicha larva abandona el huevo a través de un opérculo y nada activamente en el medio. De ser ingerida por copépodos (primeros hospederos intermediarios), la L₂ se transforma en una larva 3 temprana (L₃T), la cual se aloja en el hemoceloma del crustáceo. Los copépodos infectados sirven de alimento a distintas

especies de peces (segundos hospederos intermediarios), en cuyo estómago son digeridos liberando a la L₃T; esta larva migra hacia la musculatura esquelética, transformándose en una larva 3 avanzada (L₃A), que es la forma infectiva para el hospedero definitivo. Sin embargo, este ciclo suele complicarse por la intervención de hospederos paraténicos, los cuales pueden ser otros peces, anfibios, reptiles, aves ictiófagas e incluso mamíferos (Lamothe, 1997). Finalmente, mamíferos (hospederos definitivos) carnívoros, marsupiales, suidos y roedores, que tienen como parte de su dieta al segundo hospedero intermediario o alguno de los hospederos paraténicos, se infectan con la L₃A, la cual se transforma en adulto alcanzando la madurez sexual (Miyazaki, 1991).

Sistemática del género

A partir del establecimiento del género *Gnathostoma* en 1836, se han descrito 11 especies, en su mayoría a partir de características presentes en los organismos adultos. Sin embargo, los caracteres utilizados para definir especies han variado de un autor a otro y también de acuerdo con la época de la descripción; por ejemplo, varias de las primeras descripciones son muy poco detalladas e incompletas y generalmente no presentan dibujos o fotografías de las estructuras que caracterizan a las especies. No obstante, hay ciertos caracteres constantes que se han establecido y en los que han coincidido los autores al hacer alguna revisión del género, otorgando de esta forma la validez a las especies. Estos caracteres son: número de anillos de ganchos en el bulbo cefálico, porcentaje del cuerpo cubierto por espinas, forma y distribución de las espinas en cada región, cantidad de tapones polares en el huevo, textura de la cáscara del huevo, patrón de las papilas pericloacales en el macho, taxón del hospedero definitivo y distribución geográfica (Miyazaki, 1960; Daengsvang, 1980).

Dadas las enormes diferencias que presentan los ejemplares en estadio larvario (L₃A) con respecto al adulto y la necesidad de identificar a las especies en esta etapa debido a su importancia médica, se han utilizado caracteres diagnósticos en esta fase del ciclo de vida como: número de ganchos en cada uno de los anillos del bulbo cefálico, diferencia entre el número de ganchos del primer y último anillo, la posición de la papila cervical y poro excretor, forma de los ganchos del bulbo (Lamothe *et al.*, 1989), así como el patrón nuclear perientérico (Akahane *et al.*, 1986). No obstante, se ha observado que en algunos casos estas características no son suficientes para diferenciar a las especies a este nivel, lo que ha originado controversia en cuanto a la identificación del agente causal

de la gnatostomiasis humana, principalmente en América (Almeyda-Artigas, 1991; Almeyda-Artigas *et al.*, 2000a; León- Règagnon *et al.*, 2002). Cabe añadir que para las L₃A de la mayoría de las especies americanas no hay descripciones publicadas y las existentes, no son detalladas.

La primera revisión del género fue realizada por Baylis y Lane (1920); ésta es parte de una revisión general de la familia Gnathostomatidae la cual fue dividida en dos subfamilias: Spiroxynae y Gnathostominae. La primera subfamilia quedó integrada únicamente por el género *Spiroxys* y la segunda por los géneros *Tanqua*, *Echinocephalus* y *Gnathostoma*; en ese entonces, este último género contaba con pocas especies descritas y la mayoría cayeron en sinonimia con *G. spinigerum*.

En 1960, Miyazaki efectuó la revisión de las 19 especies conocidas hasta entonces en la literatura, reconociendo como válidas solo a siete de éstas, y considerando a las restantes como sinónimos. Posteriormente, Daengsvang (1980) en una nueva revisión, consideró a 12 especies válidas, pero dos de éstas (*G. brasiliense* Ruiz, 1952 y *G. didelphis* Chandler, 1932) fueron descritas basándose en organismos jóvenes, por lo que su validez fue puesta en duda. En 1991, Miyazaki realizó un segundo análisis del género, reconociendo la validez de diez especies: las siete publicadas en su primer trabajo y tres incluidas por Daengsvang (1980), considerando a *G. brasiliense* y *G. didelphis* como sinónimos de *G. turgidum*. Almeyda-Artigas (1991) adicionó una especie más al género: *G. binucleatum* y recientemente Bertoni *et al.* (2005) describieron una nueva especie (*G. lamothèi*); lo que suma un total de 12 especies pertenecientes a este género.

Tabla 1. Composición actual del género *Gnathostoma* en el mundo (Miyazaki, 1991; Almeyda-Artigas, 1991 y Bertoni *et al.*, 2005)

ESPECIE	HOSPEDERO DEFINITIVO	PAISES CON REGISTRO
ASIA		
<i>G. spinigerum</i> Owen, 1836	Tigres, perros y gatos	Japón, Tailandia.
<i>G. hispidum</i> Fedtschenko, 1872	Cerdos silvestres y domésticos	China, Japón, Tailandia, Hungría, Alemania, Australia.
<i>G. doloresi</i> Tubangui, 1925	Cerdos silvestres y domésticos	Filipinas, India, Japón, Vietnam.
<i>G. nipponicum</i> Yamaguti, 1941	Comadreas	Japón
<i>G. malaysiae</i> Miyazaki y Dunn, 1965	Ratas	Malasia
<i>G. vietnamicum</i> Le-van-Hoa, 1965	Nutrias	Vietnam
AMERICA		
<i>G. turgidum</i> Stossich, 1902	Tlacuaches	Argentina, Brasil, México y E.U.A.
<i>G. americanum</i> Travasos, 1925	Tigrillos	Brasil
<i>G. procyonis</i> Chandler, 1942	Mapaches	E.U.A.
<i>G. miyazakii</i> Anderson, 1964	Nutrias	Canadá
<i>G. binucleatum</i> Almeyda-Artigas, 1991	Tigrillos, gatos y perros	México y Ecuador
<i>G. lamothei</i> Bertoni <i>et al.</i> , 2005	Mapaches	México

Estudios de sistemática molecular con *Gnathostoma*

En los últimos años, las herramientas moleculares han cobrado auge en los estudios de sistemática y evolución de nemátodos (Nadler, 1992; Fitch *et al.*, 1995; Campbell *et al.*, 1995). Para el género *Gnathostoma* se han realizado cuatro trabajos utilizando este tipo de información. En los dos primeros (Almeyda-Artigas *et al.*, 2000a; 2000b), se analizaron las secuencias de los espaciadores internos ITS1 e ITS2 del DNA ribosomal (rDNA) y el fragmento 5.8S del rDNA de *G. binucleatum*, *G. spinigerum* y *G. turgidum*, concluyendo que el ITS2 es un buen marcador genético para la diferenciación de las especies del género, aún cuando éstas sean morfológica y biológicamente muy parecidas. El grado de divergencia encontrado entre las secuencias de nucleótidos de este marcador es elevado, lo que no permite el alineamiento con secuencias de otras especies del género, por lo cual no es posible utilizarlo para estudios filogenéticos. Para el caso del ITS1, la variación observada fue excesiva para tener información a este nivel taxonómico. Así también, determinaron que la región 5.8S del gen del rDNA está bien conservada, por lo que podría ser un buen marcador para análisis de tipo filogenético, aunque esta región es demasiado corta. Por otro lado, basándose en las secuencias, Almeyda-Artigas *et al.*, 2000a, asumen la presencia de dos nuevas especies para México: *Gnathostoma* sp. I y *Gnathostoma* sp. II. La secuencia de la primera fue nombrada en el genbank como *G. neoprocyonis*, sin embargo, ninguna de estas especies ha sido descrita formalmente, por lo que no serán incluidas en nuestro estudio.

León-Règagnon *et al.* (2002) estudiaron al agente etiológico de la gnatostomiasis en Nayarit. Utilizando el ITS2 del rDNA, encontraron un grado de divergencia mínimo (0.24 % o menos) entre las larvas de la región y *G. binucleatum*, indicando que las larvas examinadas pertenecen a esta especie.

Posteriormente Martínez-Salazar y León-Règagnon (2005), realizaron un estudio de variación morfológica y molecular de las L₃A en peces de Acapulco, donde se utilizó como marcador al ITS2. Al comparar sus secuencias con las del Genbank, concluyeron que la especie analizada era *G. binucleatum* y que aún cuando se encontraron seis morfotipos dentro de la población de parásitos en distintos hospederos, las variaciones moleculares fueron mínimas (0.98% y 0.71%) con respecto a esa especie. Sin embargo,

la variación intraespecífica encontrada a este nivel, es más alta que la registrada para la especie en otras poblaciones de *G. binucleatum* (Almeyda *et al.*, 2000ab).

Bertoni-Ruiz *et al.* (2005) al realizar la descripción de *G. lamothei* compararon la secuencia del ITS2 de esta especie con otras publicadas en el genbank, observando un 99.2 % de similitud con la secuencia de *Gnathostoma* sp. 1 (Almeyda-Artigas *et al.*, 2001a), por lo cual los primeros autores asignaron como *G. lamothei* a todos los registros previos de *Gnathostoma* sp.1

Por último, en el genbank se cuenta con las siguientes secuencias de *Gnathostoma*: *G. turgidum* (ITS2, 5.8S y 18S), *G. spinigerum* (ITS1, ITS2, 18S, V4, 5.8S, COI y MMP), *G. binucleatum* (ITS1, ITS2, 5.8S, 18S y COI, 28S), *Gnathostoma* sp. de *Poeciliopsis gracilis* de México (ITS2 y 5.8S), *Gnathostoma* sp. de *Philander oposum* de México (ITS2 y 5.8S), *Gnathostoma* sp. de *Procyon lottor* de México (ITS 2, 5.8S), *G. oligomucronatum* (18S) y *G. neoprocyonis* (18S), *G. hispidum*, *G. nipponicum* y *G. doloresi* (18S, ITS1, ITS2, 5.8S, 28S y COI), *G. lamothei* (ITS2). Cabe destacar que algunas de las secuencias pertenecen a especies aún no descritas o que han sido consideradas como sinonimos.

Relación del género *Gnathostoma* con sus hospederos y su distribución geográfica

Como se ha mencionado anteriormente, los hospederos definitivos de los gusanos del género *Gnathostoma* se encuentran incluidos en al menos cuatro órdenes de mamíferos, mientras que el estadio larvario L₃A ha sido encontrado en varias familias de peces. No obstante el amplio espectro hospedatorio que presenta el género, se tiene claro que cada especie en estado adulto presenta una especificidad en cuanto al taxón de hospedero al que parasita.

En el caso de las L₃A, al menos para las especies mexicanas, también se sabe que existe cierto grado de especificidad, pues peces de las familias Cichlidae, Ariidae y Eleotridae son las que cuentan con el mayor número de registros como hospederos intermediarios en el país (León-Règagnon *et al.*, 2005).

Justificación

Este trabajo es un primer acercamiento al estudio de las relaciones filogenéticas entre las especies del género *Gnathostoma*. Debido al desconocimiento de dichas relaciones, hasta el momento no se ha abordado la discusión sobre los procesos que han originado la distribución actual de estos parásitos, tanto en sus hospederos naturales como en las áreas geográficas donde se han registrado. Un estudio filogenético del género puede responder las siguientes preguntas: ¿estos parásitos presentan una historia en común con sus hospederos?, ¿las especies asiáticas y americanas forman grupos monofiléticos respectivamente?, ¿qué relación existe entre las especies de *Gnathostoma* que tienen un mismo taxón como hospedero?, ¿las especies que parasitan al hombre tienen una historia común? y finalmente ¿cuántas especies forman actualmente al género?

OBJETIVOS

GENERAL

Proponer una hipótesis filogenética para el género *Gnathostoma* mediante la utilización de caracteres morfológicos y moleculares.

PARTICULARES

Realizar un estudio de morfología comparada de las especies válidas del género en el mundo.

Obtener las secuencias del gen ribosomal 28S de *G. binucleatum*, *G. doloresi*, *G. hispidum*, *G. lamothei*, *G. nipponicum* y *G. spinigerum* para su análisis filogenético.

Realizar una revisión taxonómica de las especies americanas del género con el fin de confirmar su identidad.

Proponer una hipótesis biogeográfica para las especies del género en todo el mundo, derivada de su filogenia.

MATERIAL Y MÉTODOS

OBTENCIÓN DE MATERIAL

Con la intención de obtener material helmintológico, tanto para el análisis morfológico de las especies del género *Gnathostoma* como para su estudio molecular, se realizaron las siguientes actividades:

a) Salidas al campo. Recolecta y revisión de animales silvestres

Se llevaron al cabo ocho salidas al campo con el fin de obtener ejemplares frescos de las especies del género que se distribuyen en México. Las localidades visitadas fueron las siguientes: Colima, Colima (8 al 11 de agosto de 2002); Nizanda y Mixtequilla, Oaxaca (13 al 24 de septiembre de 2002); Temazcal, Oaxaca y Tierra Blanca, Veracruz (26 al 30 de septiembre de 2002); Temazcal, Oaxaca (14 al 17 de noviembre de 2002); Villahermosa, Tabasco (1-5 de febrero de 2003); Alvarado, Veracruz (21-24 de marzo de 2003); Mixtequilla, Oaxaca (17-21 de abril de 2003); Alvarado y Tlacotalpan, Veracruz (1-5 de mayo de 2003); Tlacotalpan, Veracruz (6-8 de junio de 2003, 14-19 de julio de 2003 y 12-18 mayo de 2005).

En estas localidades se recolectaron distintos mamíferos, básicamente empleando dos métodos. El primer método fue la utilización de trampas jaula "tomahawk" colocadas en lugares estratégicos, dejando como sebo una mezcla de sardinas en lata, plátanos maduros y hojuelas de avena. De esta manera se capturaron marsupiales de los géneros *Didelphis* y *Philander*. El segundo método fue el uso de armas de fuego mediante la ayuda de cazadores, este método se requirió especialmente para la obtención de mapaches (*Procyon lotor*).

Los hospederos capturados con las trampas se sacrificaron mediante la inhalación directa de cloroformo durante un lapso aproximado de 15-20 minutos. Posteriormente se les realizó una incisión ventral desde el ano hasta el tórax y se extrajeron los órganos donde comúnmente se alojan los nemátodos (aparato digestivo, principalmente estómago e hígado).

Una vez obtenidas las vísceras, estas se revisaron con ayuda del equipo de disección, bajo el microscopio estereoscópico. Los gusanos encontrados se colocaron en cajas de Petri con solución salina al 0.8 %. Para el análisis morfológico fueron fijados en etanol al 70% caliente y conservados en frascos con líquido conservador de helmintos y

para el análisis molecular se colocaron directamente en frascos homeopáticos con etanol al 100%. Algunos de los ejemplares fueron depositados en la colección Nacional de Helmintos (CNHE) (tabla 2).

b) Adquisición de material por donación o préstamo de otras instituciones

Se obtuvieron varios ejemplares de *G. doloresi*, dos de *G. hispidum* y dos de *G. nipponicum* como donación del Dr. H. Akahane (†) de la Universidad de Fukuoka y del Dr. K. Ando de la Universidad de Hie, ambas en Japón, para su estudio tanto morfológico como molecular. El M. en C. Cesar Álvarez Guerrero de la Universidad Autónoma de Nayarit, donó dos ejemplares de *G. binucleatum*. También fueron donados ejemplares de *Spiroxys* sp. por parte de la Colección de Helmintos de la Universidad de San José, Costa Rica y de *Echinocephalus janzeni* donados por la Dra. J. Caira, de la Universidad de Connecticut, Storrs, Connecticut, EUA.

Se obtuvieron en préstamo varios lotes de especies de *Gnathostoma* de las siguientes instituciones: Colección Nacional de Helmintos, Instituto de Biología (CNHE), UNAM; Harold W. Manter Laboratory de la Universidad de Nebraska en Lincoln, Nebraska (HWML); Colección Nacional de Parásitos Estados Unidos de Norte América en Beltsville, Maryland, Washington (USNPC) y de la Colección de Parásitos del Canadian Museum of Nature (CMNPA) en Ottawa, Canadá.

ANÁLISIS FILOGENÉTICO

El análisis filogenético del género se realizó en diferentes etapas según la metodología cladista. La información se obtuvo de acuerdo con las técnicas apropiadas para cada uno de los dos niveles con los que determinamos trabajar: morfológico y molecular.

Estudio Morfológico

a) Revisión de Información bibliográfica

Fueron estudiadas las descripciones de las especies que componen al género *Gnathostoma* distinguiendo los caracteres más utilizados por los autores para diferenciarlas, incorporando algunos de ellos al estudio filogenético.

También se analizó bibliografía de los géneros que componen a la familia Gnathostomatidae, con el fin de determinar grupos externos y seleccionar otros caracteres a utilizar en el análisis.

b) Revisión de ejemplares obtenidos mediante recolectas en el campo y préstamo o donación de colecciones helmintológicas

Algunos caracteres no referidos en la bibliografía fueron obtenidos a través de la observación directa de ejemplares. Inicialmente se analizaron ejemplares de los géneros *Gnathostoma*, *Spiroxys* y *Echinocephalus janzeni* (CNHE). Adicionalmente se revisaron 39 lotes de *G. procyonis* y *G. turgidum* obtenidos en préstamo del HWML; así también, se examinaron 20 lotes de las especies *G. turgidum*, *G. procyonis*, *G. spinigerum*, *G. miyazakii*, *G. hispidum*, *G. doloresi* y *Gnathostoma* sp, los registrados como paratipos de las especies aún no descritas *G. neoprocyonis* y *G. oligomucronatum* de la USNPC (apéndice 1). Por último, se analizó un lote de ejemplares de *G. miyazakii* proveniente de CMNPA. También fueron revisados todos aquellos ejemplares de *G. binucleatum* y *G. doloresi* recibidos en donación. Esta revisión de ejemplares también fue útil para la validación y redescrición de algunas especies americanas, así como para redeterminar a algunos de estos lotes.

c) Técnicas utilizadas

Para un análisis morfológico detallado fue necesario aclarar a los nemátodos con lactofenol de Amman durante un periodo de 10-30 días según el tamaño y textura de la cutícula de los nemátodos; una vez aclarados, se montaron en preparaciones temporales utilizando cubreobjetos, portaobjetos y calzas de papel. Estas preparaciones se observaron con la ayuda de un microscopio óptico y con un analizador de imágenes digitales (Image Proplus) se obtuvieron fotografías digitales de varias estructuras.

También se realizaron estudios de microscopía electrónica de barrido (MEB) con *G. turgidum*, *G. procyonis*, *G. miyazakii*, *G. doloresi*, *G. lamothei* y *G. socialis*. Para éstos los ejemplares fueron deshidratados en alcoholes graduales (70%, 80%, 90% y 100%), posteriormente los ejemplares fueron secados a punto crítico con CO₂ y por último se recubrieron con oro-paladio. Las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico de barrido marca Hitachi.

d) Elección de caracteres morfológicos

Utilizando individualmente o en conjunto las técnicas descritas anteriormente, así como la información bibliográfica, se definieron los caracteres morfológicos utilizados en el análisis.

La mayoría de los caracteres fueron obtenidos a partir de características cuantitativas y cualitativas de los diferentes tipos de espinas. Como el patrón de espinación varía a lo largo del cuerpo de las especies en cuanto a la forma de las espinas así como en el número de puntas, fue necesario determinar cuatro regiones del cuerpo con el fin de tener la certeza de que se estuvieran comparando zonas homólogas entre cada uno de los taxones. Lo anterior se hizo basándonos en el principio de homología de posición (Hennig, 1966). Estas cuatro regiones se eligieron tomando como referencia ciertas estructuras claramente distinguibles y presentes en todas las especies de *Gnathostoma* (el bulbo, la papila cervical, los sacos cervicales y la unión esófago-intestino) (**figura 1**).

e) Determinación de grupo externo

Hasta este momento no se había realizado ningún tipo de análisis sobre las relaciones entre los diferentes taxones que componen a la familia Gnathostomatidae, por lo tanto no se conoce cuál es el grupo hermano de *Gnathostoma*. Utilizando criterios tales como su posición taxonómica tradicional, la facilidad de colecta o de acceso a ellos mediante donaciones, entre otros, se eligieron como grupos externos a los siguientes taxones: *Spiroxys* sp. y *Echinocephalus janzeni* ambos de la familia Gnathostomatidae.

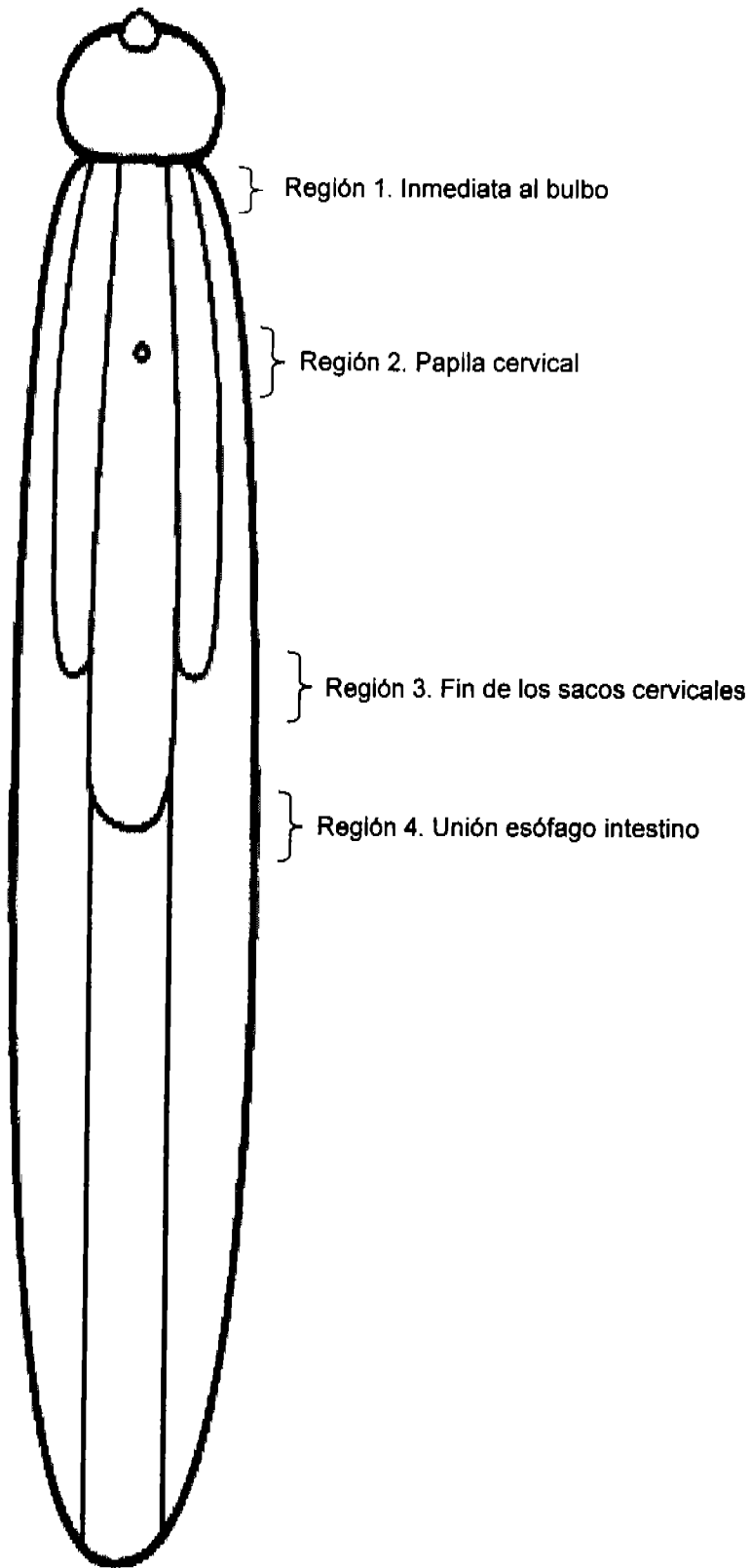


Figura 1. Regiones delimitadas para el estudio de las espinas del cuerpo.

d) Análisis de caracteres polimórficos multiestado con GFC y construcción de matrices

El análisis de los caracteres 17-20 (ver lista de caracteres) se realizó utilizando el método "Generalized Frequency Coding" (GFC) propuesto por Smith y Gutberlet (2001), con el cual pueden analizarse de manera sencilla los caracteres polimórficos multiestado de acuerdo con su frecuencia de aparición en cada uno de los taxones. Este método puede ser aplicado tanto a caracteres cualitativos como cuantitativos que tengan como característica ser polimórficos y multiestado, así mismo, con él se pueden integrar aquellos caracteres binarios o multiestado que no son polimórficos.

De acuerdo con el método GFC, el primer paso es construir una matriz en la cual, cada uno de los estados de carácter de los caracteres 17 a 20 (polimórficos multiestado) deben considerarse como subcaracteres, es decir, ya no se codifican estos estados en la matriz original, sino se construye una matriz "a" adicional de cada uno de estos caracteres. Por ejemplo el carácter 18 es el número de puntas en la región inmediatamente posterior al bulbo cefálico. Estas van desde una hasta 11 puntas, por lo tanto, los subcaracteres son una punta, dos puntas... hasta once puntas. Este procedimiento se hace con cada uno de los caracteres obteniéndose tablas (matriz "a") en las cuales las columnas representan a los subcaracteres y las hileras a los diferentes taxones; los estados de subcaracter son la frecuencias con que aparece cierto número de puntas en cada uno de los taxones.

Una vez obtenida la matriz "a" se construye una segunda matriz "b" en donde deben expresarse las frecuencias acumuladas, es decir, la suma de todas las frecuencias de la muestra en un taxón, empezando a sumar las frecuencias desde el siguiente valor a la derecha del primer subestado hasta el valor correspondiente al último. Después se suman las frecuencias a la derecha del segundo subestado y así sucesivamente de manera tal, que esta matriz presenta una columna menos que la matriz "a". Es posible que se obtengan frecuencias acumuladas con un valor de 0 para todos los taxones, lo cual significa que no es un subcaracter informativo para el análisis.

Después de haber obtenido la matriz "b", se construye una matriz "c" en la cual se sustituyen los valores de las frecuencias acumuladas en cada uno de los taxones por letras, de acuerdo con el método propuesto por Wiens (1995).

El procedimiento anterior puede realizarse de manera manual o de la forma que se hizo en este trabajo, utilizando el programa "FastMorfologyGFC" disponible en:

<http://home.earthlink.net/~mgutber/codethis/codethis.htm> (Smith y Gutberlet, 2001), el cual se alimenta con la matriz de los caracteres binarios y multiestado (**matriz 1, apéndice 2**) y polimorficos más las matrices "a" (**matriz 2, apéndice 2**) de todos los caracteres polimorficos multiestado y de manera automática se calculan las matrices siguientes quedando una matriz final (**matriz 3, apéndice 2**) con ambos datos en formato nexus, la cual puede ser corrida directamente en el programa PAUP 4.10b.

ESTUDIO MOLECULAR

a) Obtención de caracteres moleculares

Con la finalidad de obtener información molecular complementaria para el análisis filogenético, se realizaron una serie de técnicas estandarizadas para la obtención de secuencias de ADN (**apéndice 3**).

De ejemplares recolectados en el campo o donados de las especies *G. spinigerum*, *G. turgidum*, *G. nipponicum*, *G. hispidum*, *G. doloresi*, *G. lamothel*, *Spiroxys* sp. y *Echinocephalus janzeni* se extrajo DNA mediante el método fenol-cloroformo (Hillis *et al.*, 1996). A partir del DNA total se amplificó el gen ribosomal 28S utilizando los oligonucleótidos "28SY" (5'- 3' CTA AC AGG ATT CCC TCA GTA ACG GCG AGT) y "28SZ" (5'- 3' AGA CTC CTT GGT CCG TGT TTC AAG AC) mediante la técnica de PCR, con una temperatura de alineamiento de 50°C para *G. hispidum* y *G. lamothel* y 45°C para las especies restantes, con 35 ciclos en un termociclador marca Eppendorf. Se evaluaron los resultados a través de una electroforesis en gel-agarosa. Posteriormente se realizó la purificación del fragmento amplificado con la ayuda de un kit específico (QIAquik PCR purification marca QIAGEN) y se llevó al cabo la reacción de secuenciación para la cual se utilizó el protocolo propuesto para Big Dye sequencing kit. Por último, los productos purificados con columnas CentriSep marca Princeton Separations, fueron llevados a un secuenciador automático (ABI PRISM 310) obteniéndose las secuencias parciales del gen ribosomal 28S. Las secuencias fueron editadas a ojo y alineadas automáticamente con los programas BioEdit (Hall, 1999) y Clustal W (Thomson *et al.*, 1994).

OBTENCIÓN DE LAS HIPÓTESIS MORFOLÓGICA Y MOLECULAR

Con los datos morfológicos analizados con GFC y las secuencias alineadas se construyeron dos matrices de datos en formato Nexus.

Los datos fueron analizados independientemente en el programa PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002) haciendo análisis de parsimonia máxima. Se realizaron búsquedas heurísticas con mil réplicas al azar. Los cladogramas se enraizaron utilizando el grupo externo. De los árboles resultantes se calcularon los parámetros de longitud, Índice de consistencia, Índice de retención e Índice de retención reescalado. Se calculó el soporte de las ramas mediante bootstrap y de colapsamiento de éstas mediante el Índice de Bremer.

RESULTADOS

RECOLECTA DE HOSPEDEROS Y EJEMPLARES DE GNATHOSTOMA EN MÉXICO

En total se recolectaron y revisaron 77 mamíferos en los estados de Colima, Oaxaca, Michoacán, Tabasco, Veracruz y Jalisco. De marsupiales del género *Didelphis* se recolectaron seis ejemplares de *Gnathostoma turgidum*; asimismo, seis gusanos de *Gnathostoma lamothei* se encontraron parasitando a *Procyon lotor hernandezii*. A la mayoría de estos ejemplares se les asignó un número de catálogo de la CNHE (Tabla 2).

Tabla 2. Ejemplares de *Gnathostoma* recolectados en México durante este estudio.

Hospedero	Localidad	Especie (n)	No. de catalogo CNHE
<i>D. virginiana</i>	Vallarta, Jalisco	<i>G. turgidum</i> (1)	4740
<i>D. virginiana</i>	Tlacotalpan, Veracruz	<i>G. turgidum</i> (1)	4737
<i>D. marsupialis</i>	Centro, Tabasco	<i>G. turgidum</i> (3)	4739*
<i>P. lotor hernandezii</i>	Tlacotalpan, Veracruz	<i>G. lamothei</i> (5)	4735*
<i>P. lotor hernandezii</i>	Tlacotalpan, Veracruz	<i>G. lamothei</i> (1)	s/n *
<i>P. lotor hernandezii</i>	San José Independencia, Oaxaca.	<i>G. lamothei</i> (3)	4421

* Lotes o ejemplares usados total o parcialmente para microscopía electrónica o en biología molecular.

ANÁLISIS FILOGENÉTICO CON DATOS MORFOLÓGICOS

En el análisis morfológico se incluyeron 12 especies del género *Gnathostoma*, seis asiáticas (*G. spinigerum*, *G. hispidum*, *G. doloresi*, *G. nipponicum*, *G. malaysiae* y *G. vietnamicum*) y seis americanas (*G. turgidum*, *G. miyazakii*, *G. procyonis*, *G. lamothei*, *G. binucleatum* y *G. americanum*); así mismo, se incluyeron en el análisis dos lotes de ejemplares registrados como *Gnathostoma* sp. y *G. spinigerum* (registrados como parásitos de *Mustela vison* en E.U.A) que contaban con características únicas, diferentes a las de *G. spinigerum* y que en el análisis nombraremos como "*Gnathostoma* sp. (E.U.A)". Para todas estas especies, los datos se obtuvieron a partir de su observación e información bibliográfica.

Caracteres

En total se obtuvieron 21 caracteres, 16 de los cuales hacen referencia a características cualitativas, de estos, la mayoría se codificaron como multiestado y sólo dos como binarios (caracteres 1 y 8). Los caracteres 9 a 21 (a excepción del 17) fueron obtenidos a partir de características (cuantitativas y cualitativas) de las espinas del cuerpo de acuerdo a las regiones que se muestran en la figura 1.

De los caracteres 18 a 21 no se muestran los estados de carácter por ser polimórficos multiestado. Estos caracteres se analizaron utilizando el método de codificación de frecuencias generalizadas (Smith y Gutberlet, 2001), el cual es detallado en la metodología.

A continuación listamos los caracteres con sus respectivos estados, cuya representación gráfica se observa en el **apéndice 4**.

1. Forma del cuerpo

0= cilíndrica

1= ensanchada en la región posterior

2. Cobertura de espinas en el cuerpo

0= 0 %

1= 80-100 %

2= 50 % con el resto de la cutícula lisa

3= 50 % con el resto de la cutícula con ornamentaciones diferentes a espinas.

3. Número de tapones en el huevo

0= sin tapones

1= con un tapón

2= con dos tapones

4. Textura de la cáscara del huevo

0= liso

1= con pequeñas excavaciones profundas

2= con pequeñas excavaciones ligeras

5. Forma de los ganchos del bulbo

0= sin ganchos

1= cónicas simples

2= forma de gorro (con una base gruesa y una punta grande y roma)

3= forma de garra

4= forma de espina de rosal (Con una base gruesa y la punta pequeña y aguda)

6. forma de la bursa copulatrix en los machos

0= bilobada

1= lobada simple

2= lobada con apéndice distal

7. Forma de las espinas de la bursa

0= sin espinas

1= espinas cónicas

2= espinas elongadas

3= espinas redondas

8. Cambio en el patrón del tamaño papilar de la bursa

0= descendente

1= ascendente en los pares 1, 2 y 3 descendente en el 4

9. Forma de las espinas en las espinas de la región inmediata al bulbo (región 1).

1= isométricas paralelas

2= isométricas divergentes con constreñimiento prominente

3= isométricas divergentes con constreñimiento discreto

4= isométricas convergentes

10. Tamaño de los dientes en las espinas de la región 1

0= sin dientes

1= dientes aproximadamente iguales

2= dientes laterales mayores a los centrales

3= dientes centrales hasta una vez mayores a los laterales

4= dientes centrales de más de una vez hasta tres veces mayores a los laterales

11. Forma de las espinas en la región de la papila cervical (región 2)

0= ausentes

1= isométricas paralelas

2= isométricas divergentes con constreñimiento prominente

3= isométricas divergentes con constreñimiento discreto

4= isométricas convergentes

5= isométricas con puntas en los bordes laterales

12. Tamaño de los dientes en las espinas de la región 2

0= sin dientes

1= dientes aproximadamente iguales

2= dientes laterales mayores a los centrales

3= dientes centrales hasta una vez mayores a los laterales

4= dientes centrales de una vez hasta tres veces mayores a los laterales

13. Forma de las espinas en la región terminal de los sacos cervicales (región 3)

0= ausentes

1= isométricas paralelas

2= isométricas divergentes con constreñimiento prominente

3= isométricas divergentes con constreñimiento discreto

4= isométricas convergentes

5= isométricas con puntas en los bordes laterales

14. Tamaño de los dientes en las espinas de la región 3

0= sin dientes

1= dientes aproximadamente iguales

2= dientes laterales mayores a los centrales

3= dientes centrales hasta una vez mayores a los laterales

4= dientes centrales de más de una vez hasta tres veces mayores a los laterales

5= dientes centrales más de tres veces mayores a los laterales

15. Forma de las espinas en la región de unión de esófago e Intestino 4

0= ausentes

1= isométricas paralelas

2= isométricas divergentes con constreñimiento prominente

3= isométricas divergentes con constreñimiento discreto

4= isométricas convergentes

5= isométricas con puntas en los bordes laterales

6= isométricas con bordes redondeados

16. Tamaño de los dientes de las espinas en la región 4

0= sin dientes

1= aproximadamente iguales

2= laterales mayores a los centrales

3= centrales hasta una vez mayores a los laterales

4= centrales de mas de una vez hasta tres veces mayores a los laterales

5= centrales más de tres veces mayores a los laterales.

17. Forma de los labios

- 0= con tres lóbulos aproximadamente iguales
- 1= con tres lóbulos, lóbulo central pequeño y laterales grandes
- 2= con tres lóbulos, lóbulo central pequeño y laterales grandes
- 3= con un lóbulo con el borde interno con tres picos
- 4= con un lóbulo con el borde interno liso

18. Número de puntas en las espinas presentes en la región Inmediata al bulbo (región 1)

19. Número de puntas en las espinas de la región de la papila cervical (región 2)

20. Número de puntas en las espinas presentes en la región terminal de los sacos cervicales (región 3)

21. Número de puntas en las espinas presentes en la región de intersección del esófago e Intestino (región 4)

Análisis filogenético

Utilizando la matriz construida con el método propuesto por Smith y Gutberlet (2001) y utilizando el programa GFC "FastMorfologyGFC", tras una búsqueda heurística con parsimonia máxima, se obtuvo un árbol con los siguientes parámetros: longitud= 1915, Índice de consistencia= 0.727, Índice de retención= 0.556 y un Índice de retención reescalado = 0.404. En la **figura 2** se muestra el árbol obtenido con los valores de soporte (bootstrap y Bremer) para cada uno de los clados.

En el cladograma se puede observar un clado pobremente soportado, compuesto por *G. turgidum*, *G. miyazakii* + *G. vietnamicum*, como grupo hermano de los clados restantes. Un segundo clado está formado por *G. americanum* + *G. binucleatum* y se presenta como grupo hermano del clado constituido por *G. malaysiae* (*G. spinigerum*, *G. doloresi* + *G. hispidum*) (*G. lamothei* + *G. procyonis*) (*G. nipponicum* + *Gnathostoma* sp. (EUA)). La especie *G. malaysiae* representa el taxón hermano que engloba a las últimas siete especies. Este segundo clado con todos los subclados contenidos en él, presentan altos valores de soporte de rama. Podemos observar que hay cinco pares de especies hermanas: *G. miyazakii* + *G. vietnamicum*, *G. americanum* + *G. binucleatum*, *G. doloresi* + *G. hispidum*, *G. lamothei* + *G. procyonis* y *G. nipponicum* + *Gnathostoma* sp. (E.U.A). Algunos de estos clados comparten un mismo taxón de hospedero, así como una misma región geográfica (**figura 2**).

Discusión de filogenia morfológica

Con respecto a la taxonomía del género *Gnathostoma* y a partir del árbol obtenido (figura 2) se puede decir que el género es monofilético, y que su composición no es de 10 u 11 especies como lo propusieron Miyazaki (1991) y Almeyda-Artigas (1991) respectivamente, sino de trece especies. En la figura 2 podemos observar que *G. spinigerum* y *Gnathostoma* sp. (EUA) no se agrupan en un mismo clado. Lo anterior indica que los ejemplares originalmente catalogados como *G. spinigerum* y *Gnathostoma* sp. en la USNPC, y aquí tratados como *Gnathostoma* sp. (E.U.A), pertenecen a una especie independiente, cuyos caracteres morfológicos, corresponden con los descritos para *G. socialis* Leidy, 1858, especie que fue sinonimizada con *G. spinigerum* (Baylis and Lane, 1920; Miyazaki, 1960) (ver revisión de la especie en el capítulo de "Revisión del género en América"). *Gnathostoma lamothei* y *G. procyonis* son muy similares morfológicamente y aunque en el cladograma aparecen como especies hermanas, podemos aseverar que se trata de dos especies distintas porque cada una de ellas presenta diferentes autapomorfías. Una situación más que queda aclarada con este estudio es el caso de *G. binucleatum* y *G. spinigerum*, especies que en varias ocasiones han sido confundidas entre sí, y que no aparecen cercanamente emparentadas en árbol, por lo que es factible descartar su sinonimia, la cual ha generado cierta controversia entre algunos autores (Koga *et al.*, 1999, Almeyda-Artigas *et al.* 2000a; Díaz-Camacho *et al.*, 2002).

El hecho de que *G. procyonis* y *G. lamothei* aparezcan como hermanas en el cladograma indica que los rasgos morfológicos que comparten son homologías heredadas del mismo ancestro en común; su existencia en una misma especie de hospedero apoya esta hipótesis, además de indicar que en *Gnathostoma* se han presentado procesos de especiación más rápidos que sus hospederos. Por su parte, *G. doloresi* y *G. hispidum*, parásitas del género *Sus*, podrían estar reflejando un proceso similar, debido a que en los dos casos la distribución de los taxones es cercana. Para el caso de *G. nipponicum* y *G. socialis*, parásitas de dos especies de mustélidos (una asiática y una americana), es probable que una especie ancestral de *Gnathostoma* haya parasitado al ancestro de ambos mustélidos, dándose posteriormente un proceso de coespeciación de la misma forma que en *G. binucleatum* y *G. americanum* que también aparecen como especies

hermanas en el cladograma, siendo ambas parásitas de félidos y cánidos. Sin embargo, en este último caso la ambigüedad de los datos utilizados para *G. americanum* (especie que cuenta con la descripción más pobre), podría estar influyendo en este resultado. Lo mismo podría estar pasando con *G. malaysiae* que se presentó como el clado hermano de (((*G. spinigerum*, (*G. doloresi*+*G. hispidum*)) ((*G. lamothei*+ *G. procyonis*) (*G. nipponicum* + *G. socialis*))) pues su descripción también es pobre; sin embargo, ésta es la única especie que parasita a roedores, por lo cual su aparición en el cladograma como un taxón independiente no es extraña.

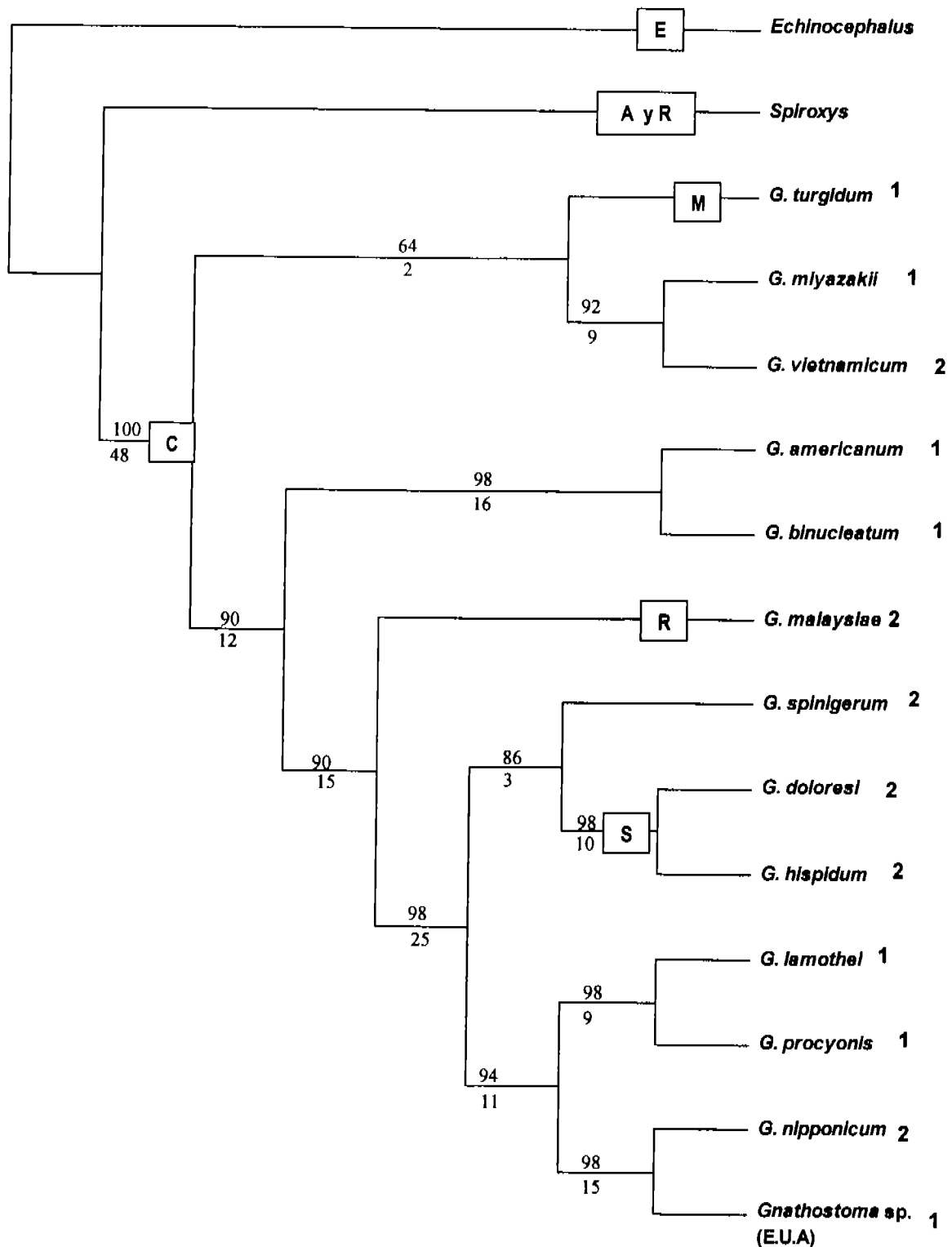


Figura 2. Árbol de datos morfológicos obtenido de la búsqueda heurística con 1000 réplicas al azar. L= 1951 CI= 0.727 RI= 0.56 y RC= 0.404. Valores de bootstrap por encima de las ramas e índice de Bremer por debajo de las ramas. Optimización de los hospederos y la distribución geográfica de los taxa en la hipótesis filogenética de *Gnathostoma*. E= Elasmobranchios, A y R= Anfibios y reptiles M= Marsupialia, C= Carnívora, R= Rodentia y S= Suidae. 1= América y 2= Asia

ANÁLISIS FILOGENÉTICO CON DATOS MOLECULARES

Del gen 28S se obtuvieron las secuencias de siete de las 13 especies que componen al género: *G. binucleatum* (de esta especie se obtuvieron ejemplares de tres poblaciones en Sinaloa, Nayarit y Guerrero); *G. doloresi*, *G. hispidum*, *G. lamothei*, *G. nipponicum*, *G. spinigerum* y *G. turgidum*. Del genbank fueron obtenidas las secuencias de cinco de estas mismas especies *G. binucleatum*, *G. doloresi*, *G. hispidum*, *G. nipponicum* y *G. spinigerum*.

Las secuencias obtenidas ya sea en este trabajo (1) o en el genbank (2) tuvieron las siguientes longitudes: *G. binucleatum* (1) 743 pb y (2) 599 pb; *G. doloresi* (1) 739 pb y (2) 598 pb, *G. hispidum* (1) 654 pb y (2) 599 pb; *G. lamothei* (1) 606 pb, *G. nipponicum* (1) 601 pb y (2) 600 pb, *G. spinigerum* (1) 735 pb, (2) 599 pb y *G. turgidum* (1) 736 pb.

El alineamiento de estas secuencias resultó en una matriz de 599 sitios (al eliminar algunos residuos en las secuencias del genbank) por 15 taxones (**apéndice 5**).

Se realizó un análisis de parsimonia máxima en PAUP* con los siguientes parámetros: todos los datos se tomaron con el mismo peso y como desordenados; los "gaps" se analizaron como datos faltantes.

A partir de esa búsqueda se encontró un árbol cuyos valores fueron los siguientes: longitud= 317, Índice de consistencia= 0.937, Índice de retención= 0.796 e Índice de retención reescalado= 0.76. Este árbol se muestra a modo de filograma con la finalidad de representar el número de cambios presentes en cada rama (**figura 3**).

El grado de divergencia entre las secuencias del grupo externo (*Spiroxys* sp.) y las especies de *Gnathostoma* es del 27.7-29.14%, mientras que la divergencia entre las especies del género va del 1.0% al 6.2%. Entre poblaciones de la misma especie se observó una variación del 0 -0.16%.

En la **figura 3**, se observa que *G. binucleatum* es la especie basal y se encuentra como especie hermana de un clado débilmente soportado, compuesto por *G. nipponicum*, *G. lamothei*, *G. turgidum*, *G. spinigerum*, *G. doloresi* + *G. hispidum*. La mayoría de los clados se encuentran pobremente sustentados, con valores de bootstrap menores o apenas por arriba de 50, a excepción del clado *G. doloresi* + *G. hispidum* que es de 62. De la misma manera, los valores del índice de Bremer en su mayoría fueron bajos.

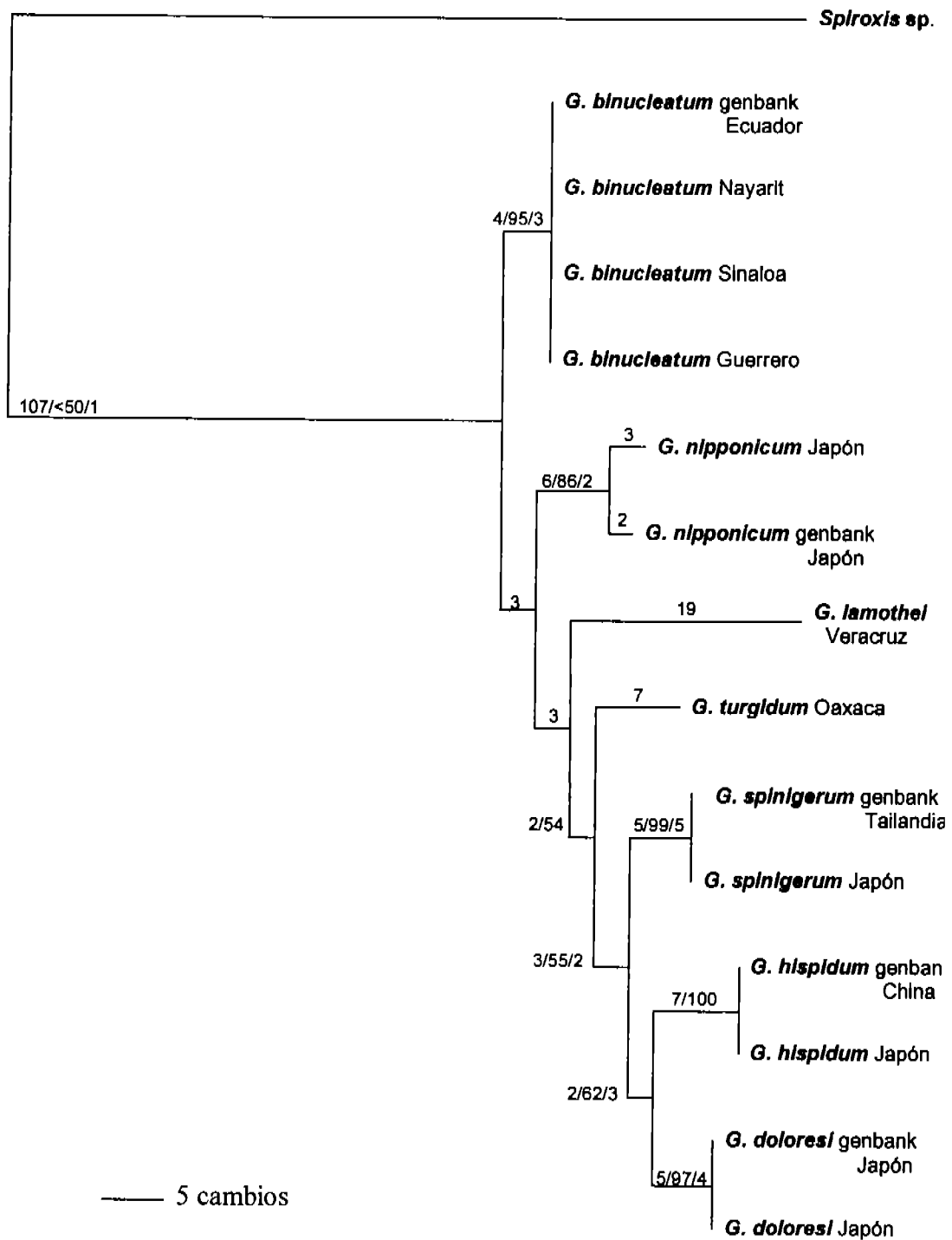


Figura 3. Árbol obtenido a partir de las secuencias del gen 28S tras la búsqueda heurística con 1000 replicas al azar. L= 317, CI= 0.933 RI= 0.796 y RC= 0.760. Por encima o al lado de cada rama: número de cambios/ Bootstrap / Bremer

Discusión de la filogenia molecular

La topología del árbol obtenido a partir de las secuencias del gen 28S (**figura 3**) no es muy diferente al obtenido en la filogenia con datos morfológicos (**figura 2**), donde el único punto contradictorio es la posición de *G. turgidum*. De acuerdo con este cladograma de datos moleculares, podemos hipotetizar la monofilia de las siete especies y el origen del género en el continente americano, al ser *G. binucleatum* la especie basal. Sin embargo, hay que destacar que los valores de soporte fueron muy bajos, por lo que probablemente la posición de algunos clados cambie al incluir las secuencias de las especies que no fue posible obtener para este análisis.

El clado que contiene a los taxones *G. spinigerum*, *G. doloresi* + *G. hispidum*, tiene la misma topología los dos análisis y presenta los valores de soporte más altos. Estos datos nos conducen a concluir que estas especies realmente tienen un origen común, aún cuando los hospederos de *G. spinigerum* (félidos y cánidos) sean diferentes a los de *G. hispidum* y *G. doloresi* (cerdos).

Gnathostoma lamothei y *G. nipponicum* no se encuentran formando un clado independiente, probablemente la ausencia en este análisis de *G. procyonis* y *G. socialis* que respectivamente se presentaron como especies hermanas en el árbol basado en morfología (**figura 2**), podría estar determinando que éstas no se agrupen en un mismo clado terminal. *Gnathostoma turgidum* se presentó como taxón hermano del clado (*G. spinigerum*, (*G. doloresi*, *G. hispidum*)), lo cual resulta extraño al comparar, una vez más, con la filogenia morfológica, donde esta especie está en un clado basal. Este hecho puede ser debido a un muestreo insuficiente al no haberse obtenido los datos moleculares de las especies *G. miyazakii* y *G. vietnamicum*, que fueron las especies que resultaron más emparentadas con *G. turgidum* en nuestro análisis morfológico.

La falta de datos moleculares de seis especies del género, así como del grupo externo más cercanamente emparentado (*Echinocephalus janseni*), nos impiden realizar un análisis de evidencia total en donde se incluyera la información morfológica y molecular, aun cuando de acuerdo con la sistemática filogenética, esto es lo más recomendable. Por lo anterior es pertinente continuar con la búsqueda de tejidos de las especies no analizadas para la obtención de sus secuencias teniendo como objetivo realizar un análisis combinado y obtener una filogenia más robusta y que los valores de soporte de ramas sean mayores para la hipótesis molecular, ya que los obtenidos hasta el momento han hecho tomar con reserva los resultados de dicha hipótesis.

REVISIÓN TAXONÓMICA DEL GÉNERO GNATHOSTOMA EN AMÉRICA.

A través del análisis bibliográfico y la revisión de ejemplares provenientes de distintas colecciones parasitológicas, así como de los resultados obtenidos en el análisis filogenético de *Gnathostoma*, fue posible determinar la validéz de las especies del género distribuidas en el continente americano.

Como resultado de lo anterior, la composición específica del género *Gnathostoma* en América actualmente asciende a siete especies (**tabla 3**): *G. americanum*, *G. binucleatum*, *G. lamothei*, *G. miyazakii*, *G. procyonis*, *G. socialis* y *G. turgidum*. Aún cuando autores como Miyazaki (1960, 1991), excluyeron a *G. socialis* de las especies válidas, en este trabajo se concluyó que debe incluirse en las especies presentes en América.

La situación taxonómica de la mayoría de las especies se estableció con base en el análisis del material tipo y de referencia, con excepción de *G. americanum*, por lo que su estatus se definió a partir de la descripción original (Ruíz, 1952). A pesar de que esta especie está inadecuadamente descrita, las pocas características mencionadas permiten diferenciarla del resto de las especies distribuidas en el continente, sin embargo, al no contar con material biológico no fue posible complementar la información de la descripción original. Sobre *G. binucleatum*, *G. turgidum*, *G. procyonis*, *G. socialis* y *G. miyazakii*, se disponía de descripciones originales incompletas en diferentes grados y en varias de ellas se omitió información taxonómica importante. Debido a lo anterior, en esta sección se presenta la redescipción de *G. miyazakii*, *G. procyonis*, *G. socialis* y *G. turgidum*. Para *G. binucleatum*, Koga *et al.* (1999) realizaron un estudio ultraestructural de organismos obtenidos a partir de infecciones experimentales, el cual complementó el conocimiento morfológico de la especie, por lo que no consideramos necesario realizar su redescipción en este trabajo. Por su parte, la descripción de *G. lamothei* (**Apéndice 6**) es de las más completas, por lo tanto consideramos innecesaria una redescipción.

Tabla 3. Especies del género *Gnathostoma* registradas en América y su estatus taxonómico.

Especie	Estatus en trabajos previos	Estatus actual	Registros en América
<i>G. americanum</i> Travassos, 1925	Validez dudosa (1) Especie válida (2)	Especie válida	Brasil
<i>G. binucleatum</i> Almeyda-Artigas, 1991	No incluida (1, 2)	Especie válida	México y Perú
<i>G. brasiliense</i> Ruíz, 1964.	Especie no válida (1) No incluida (2)	Sinónimo de <i>G. turgidum</i>	Brasil
<i>G. didelphis</i> Chandler, 1932	Especie no válida (1) No incluida (2)	Sinónimo de <i>G. turgidum</i>	Estados Unidos
<i>G. lamothei</i> Bertoni, García, Osorio y León, 2005	No incluida (1, 2)	Especie válida	México
<i>G. miyazakii</i> Anderson, 1964	No incluida (1) Especie válida (2)	Especie válida	Canadá y Estados Unidos
<i>G. neoprocyonis</i>	Especie no descrita depositada en la USNPC (<i>Nomen nudum</i>)	Especie no válida. Sinónimo de <i>G. lamothei</i>	México
<i>G. oligomucronatum</i>	Especie no descrita depositada en la USNPC. (<i>Nomen nudum</i>)	Especie no válida. Morfológicamente indistinguible de <i>G. turgidum</i>	México
<i>G. socialis</i> Leidy, 1858.	Especie no válida (1) No incluida (2)	Especie válida	E.U.A
<i>G. spinigerum</i> Owen, 1836	Sus registros en América (4, 5, HWML y USNPC) fueron transferidos a <i>G. turgidum</i> (6), <i>G. binucleatum</i> (3), <i>G. procyonis</i> y <i>G. socialis</i> (presente estudio), respectivamente	Especie válida distribuida exclusivamente en Asia.	Estados Unidos, México y Ecuador.
<i>G. turgidum</i> Stossich, 1902	Especie válida (1,2)	Especie válida	México
<i>Gnathostoma</i> sp. I	Especie nueva (3).	Corresponde con <i>G. lamothei</i> (7)	México y Ecuador
<i>Gnathostoma</i> sp. II	Especie caracterizada molecularmente (3)	Especie sin descripción, cuya validez está por confirmarse	

1= Miyazaki, 1960; 2=Miyazaki, 1991; 3= Almeyda-Artigas *et al.*, 2000a; 4= Caballero y Caballero, 1958; 5= Ollague, 1985 ; 6= Lamothe *et al.*, 1998; 7= Bertoni *et al.*, 2005.

Con la finalidad de mencionar las características presentes en cada una de las especies americanas, a continuación se presenta un resumen de los caracteres distintivos de *G. americanum*, *G. binucleatum* y *G. lamothei* elaborado con bases bibliográficas y las redescrpciones de *G. miyazakii*, *G. procyonis*, *G. socialis* y *G. turgidum* realizadas a partir de la observación de ejemplares (machos y hembras). Todas las medidas incluidas están dadas en milímetros.

***Gnathostoma americanum* Travassos 1923**

Descripción tomada de Travassos (1923).

Macho: Longitud del cuerpo 8 mm. Cuerpo revestido de escamas en casi toda su extensión, aproximadamente en tres cuartos de la longitud del cuerpo. Ganchos del bulbo cefálico cónicos. Las espinas posteriores al bulbo son chatas, con 5 a 7 puntas, aumentando de tamaño de arriba hacia la región media del cuerpo, disminuyendo en tamaño hasta transformarse en pequeños esbozos de espinas que se distribuyen hasta la bolsa copulatoria. Al nivel de fin del esófago las espinas miden 0.034 de largo. Labios fuertes con dos papilas laterales pequeñas y nítidas con miden 0.10 de largo por 0.15 de ancho. Bulbo cefálico con 0.24 mm de largo por 0.52 de ancho, armado con 8 series de espinas cónicas. Boca seguida de un vestíbulo corto. Esófago relativamente grande, claviforme con cerca de 2.2 mm de largo y 0.3 de ancho máximo; anteriormente diferenciado en una faringe de 0.87 mm. Sacos cervicales alcanzando la región media del esófago. Machos con bursa copulatoria pequeña con siete pares de papilas distribuidas del siguiente modo: cuatro pares laterales mayores, siendo un par preanal, uno adanal y dos postanales, y tres pares ventrales equidistantes adanales, difíciles de observar. Existe una papila impar mediana, con una punta terminal pequeña y delgada; ano a 0.1 mm, de la extremidad posterior. Espículas delgadas engrosándose en la base miden respectivamente 0.097 y 0.34 de largo.

Hembra: Longitud del cuerpo 1 cm. Con escamas cuticulares terminando por encima de la vulva; vulva a 1.2 mm de la extremidad caudal, ovoyector largo, sinuoso y delgado dirigido anteriormente. Útero doble, huevos embrionados con 0.63 mm de largo por 0.28 de ancho, semejantes a los huevos de *Trichiuris*, con dos tapones polares. Cauda obtusa con cutícula muy gruesa. Ano subterminal. Esófago con 3.6 mm de largo por 0.4 de ancho máximo.

Comentarios. Desde su descripción *G. americanum* no ha sido registrada, y el material tipo tampoco ha sido reevaluado. De acuerdo con las características presentadas, estos gusanos tienen semejanza con *G. binucleatum*, sin embargo la presencia de dos tapones polares en los huevos la diferencia de esta última. No obstante, es recomendable una revisión del material tipo con el fin de confirmar estas características y presentar una descripción apropiada.

Hospedero: *Felis tigrina*

Distribución: Brasil.

***Gnathostoma binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991**

Descripción de acuerdo con Almeyda-Artigas (1991) y Koga *et al.* (1998).

General: Machos con 20.95-25.93 (22.78) de longitud y de ancho máximo 1.06-1.038. Bulbo cefálico con 0.31-0.43 (0.36) y 0.60 a 0.77 de ancho (0.70), armado con 8-10 (9) anillos de ganchos. Papila cervical localizada entre las hileras 16-19 (17) de espinas. Esófago dividido en una porción anterior muscular y una posterior glandular, 3.34 de longitud. Sacos cervicales extendidos hasta la región media del esófago. Superficie corporal cubierta totalmente por espinas, variando en forma y tamaño de acuerdo con la región del cuerpo. Las espinas inmediatas al bulbo son anchas y cortas con 1-3 puntas y 0.0136 -0.02 de largo. Espinas en la región de la papila son más largas (0.037-0.039), con márgenes lineares y tres dientes, punta central mas larga. En la región media del esófago cambian a 3 a 2 puntas en ocasiones una punta mayor y otra pequeña accesoria. En la región del esófago las espinas son de una punta con 0.048 de largo. Posteriormente disminuyen su tamaño y densidad hasta convertirse pequeños esbozos cerca del extremo posterior. Espículas desiguales, la izquierda con mayor longitud 1.40 y derecha 0.31. Extremidad caudal con cuatro pares de papilas laterales pedunculadas, dos preanales y dos postanales. Cuatro pares de pequeñas papilas ventrales sésiles: un par preanal, uno adanal y dos postanales. Fasmidios presentes. Bursa provista de hileras transversales de pequeñas espinas triangulares dirigidas hacia el extremo anterior, área en forma de "Y" en la apertura cloacal.

Hembra con longitud de 14.95-22.38 (19.48) y un ancho máximo de 0.94 - 1.40 (1.20). Papila cervical localizada en la hilera 17. Ganchos del bulbo 0.27 de largo por 0.70 de

ancho. Longitud del esófago 2.76. Vulva al inicio de la mitad posterior. Ano subterminal. Extremo posterior terminado en apéndice digitiforme. Fasmidios presentes. Huevos con un tapón polar 0.058-0.068 (0.064) de largo por 0.037-0.039 (0.038) de ancho (paratipo). La superficie de su cáscara es lisa.

Comentarios: Muchos de los registros de *G. spinigerum* en América corresponden a *G. binucleatum*, debido a que ambas especies guardan gran similitud morfológica. El trabajo de Koga *et al.* (1999), contribuyó grandemente en la separación definitiva de dichas especies al presentar fotografías más detalladas de las espinas del cuerpo y de la textura de la cascara del huevo de *G. binucleatum*, la cual es totalmente lisa (de manera contraria a lo que registra Almeyda-Artigas, 1991). Por otra parte, Almeyda-Artigas *et al.* (2000a) al realizar la comparación de secuencias del ITS2 de ambas especies, reafirmaron la validez de la especie mexicana. Esta especie es a la que le han atribuido los casos de gnatostomiasis humana en México (Almeyda-artigas *et al.*, 2000a, León-Régagnon *et al.*, 2002), y Ecuador (Almeyda-Artigas *et al.*, 2000a). Su presencia en Ecuador indica que *G. binucleatum* podría ser sinónimo de *G. americanum*, debido a la cercanía de éste país con Brasil y que ambos son parásitos de félidos. Asimismo, en el análisis filogenético presentado en este trabajo, ambas especies aparecen en el mismo clado, lo cual apoya esa hipótesis. Lo anterior, quedaría aclarado con un nuevo análisis de los tipos de *G. americanum*, depositados en el Instituto Oswaldo Cruz, en Río de Janeiro, Brasil, pues la descripción original de esta especie es muy poco detallada (Travassos, 1923); lo ideal sería obtener las secuencias del gen 28S de esta especie ya que no dejaría lugar a dudas sobre dicha cuestión.

Hospedero: *Felis pardalis*

Distribución: México y Ecuador

***Gnathostoma lamothel* Bertoni, García, Osorio y León, 2005.**

Breve caracterización basada en Bertoni *et al.* (2005). Descripción original **apéndice 6**

General (basada en cinco machos adultos y tres hembras): Gusanos de tamaño medio, con el cuerpo ensanchado ligeramente en la mitad posterior. Bulbo cefálico armado con 8-9 anillos completos más dos incompletos. Un par de labios trilobados, más anchos que largos, sobresaliendo en el extremo anterior del bulbo cefálico. Dos papilas

simples en cada labio. Un pequeño anfidio localizado entre cada par de papilas. Cuatro ballonetas. Mitad anterior del cuerpo cubierta por espinas. Las espinas varían en forma y tamaño de acuerdo con la región y sexo de los gusanos. Papila cervical localizada en el primer cuarto del cuerpo. Los sacos cervicales se extienden desde las ballonetas hasta cerca de del anillo nervioso. Esófago dividido en una pequeña región anterior muscular y una posterior glandular.

Macho: Cuerpo de 13.2-18.9 (16.1 ± 2.6 , n=4) (14.8) de largo, 0.75-1.4 (1.1 ± 0.35 , n=4) de ancho máximo. Bulbo cefálico con 0.3-0.35 (0.3 ± 0.02 , n=4) de largo por 0.6-0.7 (0.7 ± 0.04 , n=4) de ancho; labios 0.08-0.1 (0.09 ± 0.01 , n=3) de largo por 0.23-0.25 (0.23 ± 0.01 , n=3) de ancho. Ganchos del bulbo con 0.018-0.024 (0.021 ± 0.002 , n=10) de largo por 0.006-0.012 (0.008 ± 0.002 , n=10) de ancho. Espinas de las hileras inmediatas al cuello son cortas [0.026-0.035 (0.029 ± 0.004 , n=17)] de largo y anchas [0.013-0.017 (0.014 ± 0.001 , n=18)], con 3-6 puntas; las espinas al nivel de la papila cervical son cortas [0.029-0.037 (0.032 ± 0.002 , n=10)] y anchas en la región distal [0.015-0.018 (0.017 ± 0.008 , n=9)]; con 4-6 puntas; la punta central es ligeramente más larga que las puntas laterales. Las espinas en la región media del esófago son más largas [0.034-0.044 (0.047 ± 0.002 , n=15)] que anchas [0.013-0.015 (0.014 ± 0.007 , n=15)], con tres puntas principales (la de en medio más larga que las laterales) y con 1-3 pequeñas puntas secundarias. Las espinas al nivel la unión esófago-intestino son alargadas [0.043-0.050 (0.047 ± 0.002 , n=8)], y delgadas [0.011-0.015 (0.014 ± 0.008 , n=14)], con tres puntas; con la típica punta media más larga. En esta región el número de puntas y el tamaño de las espinas disminuye gradualmente hacia la región posterior y finalmente desaparecen en la región ecuatorial del cuerpo. La mitad posterior del cuerpo está cubierta con pequeñas placas redondeadas localizadas entre las estriaciones transversales de la cutícula. El anillo nervioso y la paila cervical están localizados entre las hileras de espinas del cuerpo 21-22 y 7-11 respectivamente. El poro excretor no fue observado. Los sacos cervicales miden 1-1.05 (1.02 ± 0.04 , n=3) de largo. El esófago abarca un 22.5-28.4% (25.2 ± 2.9 , n=3) de la longitud total del cuerpo; con una longitud de 3.3-3.7 (3.4 ± 0.2 , n=3) y 0.37-0.40 (0.38 ± 0.015 , n=4) de ancho. La región muscular mide 0.35-0.4 (0.37 ± 0.03 , n=3) de largo y la región glandular 2.9-3.3 (3.07 ± 0.25 , n=3). Las espículas son desiguales con ápices romos. Espícula izquierda con 0.39-0.41 (0.40 ± 0.01 , n=3) de largo; y la derecha 1.32-1.41 (1.38 ± 0.04 , n=4) de largo, representando un 7.5-10.5% de la longitud total del cuerpo. La extremidad caudal es lobulada con 0.78-0.84 (0.81 ± 0.032 , n=3) de ancho; con una superficie totalmente cubierta de espinas pequeñas y

simples, con excepción del área alrededor de la apertura cloacal. Alas con cuatro pares de papilas pedunculadas laterales (dos precloacales y dos postcloacales). Cuatro pares de papilas ventrales sesiles (uno precloacal, uno adcloacal y dos postcloacales).

Hembra: cuerpo con 17.8-19.6 (18.7 ± 1.25 , n=2) de largo con 1.22-1.29 (1.25 ± 0.035 , n=3) de ancho máximo. Bulbo cefalico con 0.28 de largo por 0.72 de ancho; labios con 0.15 de largo por 0.25 de ancho. Ganchos del bulbo con 0.018-0.026 (0.022 ± 0.0016 , n=28) de largo por 0.006-0.009 (0.008 ± 0.0014 , n=10) de ancho. Espinas del cuerpo inmediatas al cuello son cortas [0.026-0.037 (0.031 ± 0.002 , n=11)] de largo y anchas [0.010-0.013 (0.011 ± 0.0008 , n= 15)], con 3-6 punta; las espinas al nivel de la papilla cervical son cortas y anchas en la región distal midiendo 0.029-0.041 (0.035 ± 0.04 , n=7) de largo por 0.013-0.019 (0.016 ± 0.01 , n=13) de ancho; con 4-6 puntas; punta central ligeramente más larga que las laterales. Las espinas al nivel de la regio media del esófago son más largas, 0.033-0.043 (0.040 ± 0.02 , n=10) que anchas 0.015-0.020 (0.018 ± 0.01 , n=15) con tres puntas principales (con la media más larga que las laterales) y 1-3 puntas secundarias. Las espinas al nivel de la unión esófago-intestino son largas [0.060-0.064 (0.062 ± 0.002 , n=7)] y delgadas [0.06-0.07 (0.06 ± 0.003 , n=7)] con tres puntas; la punta media típicamente más larga. En esta región el número de puntas y el tamaño de las espinas disminuye gradualmente hacia la región posterior finalmente desaparecen en la región ecuatorial del cuerpo. La mitad posterior del cuerpo está cubierta con pequeñas placas redondeadas localizadas entre las estriaciones transversales de la cutícula. Anillo nervioso, papilla cervical y poro excretor localizados entre la hileras de espinas del cuerpo 7-8, 8-11 y 9-10 respectivamente. Sacos cervicales con 1.09-1.1 (1.09 ± 0.007 , n=2) (1.1) de largo. Apertura de la vulva localizada a 10.9-11.4 (11.14 ± 0.25 , n=3) (10.86) del extremo anterior. Huevos con un tapón polar, con 0.056-0.064 (0.59 ± 0.002 , n=15) de largo por 0.035-0.038 (0.037 ± 0.001 , n=15) de ancho, con granulación no muy gruesa distribuida irregularmente en la superficie del huevo. Ano 0.22-0.36 (0.28 ± 0.071 , n=3) . Extremo caudal desnudo y redondeado.

Hospedero: *Procyon lotor hernandezii*.

Distribución: Tlacotalpan, Veracruz, México.

***Gnathostoma miyazakii* Anderson, 1965. Figura 4g**

General: (Basada en 2 machos y 2 hembras). Gusanos grandes, notablemente delgados. Bulbo cefálico armado con 10-11 anillos de ganchos (**figura 4C, D**). completos y uno incompleto (**figura 4 A**). Un par de labios lobulados, con una anchura mayor que el largo, sobresaliendo en el extremo anterior del bulbo cefálico (**figura 4B**). Dos papilas simples en cada labio y un anfidio entre cada par de papilas. Cuatro bayonetas en el bulbo. Mitad anterior del cuerpo cubierta por espinas grandes y mitad posterior espinas de bordes redondeados. Las espinas varían de forma y tamaño según la región del cuerpo de los gusanos. Papila cervical localizada en el primer cuarto del cuerpo. Sacos cervicales iniciando desde las bayonetas y sobrepasando el anillo nervioso. Esófago anterior muscular y posterior glandular.

Macho: Cuerpo 42-47.6 (44.8 ± 3.95 , $n=2$) de largo y 0.69-0.83 (0.76 ± 0.098 , $n=2$) de ancho máximo. Bulbo cefálico 0.115-0.228 (0.169 ± 0.17 , $n=2$) de largo y 0.113-0.130 (0.121 ± 0.012 , $n=2$) de ancho, labios 0.048-0.043 (0.045 ± 0.0035 , $n=2$) de largo por 0.176-0.178 (0.1765 ± 0.0007 , $n=2$) de ancho. Ganchos del bulbo 0.014-0.017 (0.016 ± 0.0015 , $n=4$) de largo por 0.004.-0.006 (0.0047 ± 0.0009 , $n=4$). Espinas situadas posteriormente al bulbo anchas y cortas de 0.015-0.022 (0.019 ± 0.0024 , $n=10$) de largo y 0.007-0.10 (0.009 ± 0.001 , $n=10$) de ancho, con 2-4 puntas del mismo tamaño (**figura 4E**). Espinas al nivel de la papila cervical mas largas [0.020-0.024 (0.022 ± 0.0014 , $n=10$)] por 0.009-0.011 (0.010 ± 0.0006 , $n=10$) de ancho; con 4-5 puntas; puntas laterales ligeramente mayores a las centrales (**figura 4F**). Espinas en la región media del esófago aumentan notablemente su tamaño (0.030-0.035 (0.033 ± 0.0017 , $n=10$) de largo por 0.013-0.018 (0.016 ± 0.001 , $n=10$) con la base de la lámina ligeramente más delgada que la parte distal presentando 5-7 puntas; laterales ligeramente mas grandes (**figura 4G**). Espinas a nivel de la unión esófago- intestino disminuyen su tamaño [(0.021-0.025 (0.022 ± 0.0014 , $n=10$)] de largo por 0.015-0.018 (0.017 ± 0.001 , $n=10$) de ancho, 3-6 puntas pequeñas, bordes laterales de la lamina curvos, semejantes a escamas aserradas(**figura 4H**).. Por debajo de esta región, el tamaño de las espinas disminuye y las puntas se van achatando hasta desaparecer y convertirse en espinas redondeadas simples (**figura 4I**). Al aproximarse a la región posterior, disminuyen en densidad y tamaño, de manera tal que es difícil observarlas en microscopia óptica. Papila cervical y anillo nervioso en las hileras de espinas del cuerpo 12-13 y 18-22 respectivamente. El poro excretor a la altura de las hileras 27-29. Sacos cervicales miden 1.20-1.60 (1.40 ± 0.30 , $n= 2$). Esófago abarca un

6.7-8.57 % (7.63 ± 1.3 , n=2) de la longitud del cuerpo; con una longitud de 3.2-3.6 (3.4 ± 0.28 , n=2). Región muscular 0.47-0.49 (0.48 ± 0.014 , n=2) y glandular 2.73-3.11 (2.92 ± 0.26 , n=2). Espículas desiguales con ápices romos. La espícula izquierda 0.32-0.40 (0.36 ± 0.056 , n=4) y derecha 0.40-0.56 (0.48 ± 0.11 , n=2), representando un 12.5-15.5 % (14 ± 2.12 , n=2) de la longitud total del cuerpo. La extremidad caudal es lobulada, con un apéndice digitiforme en la parte posterior (**figura 4J**), con 0.36-0.46 (0.41 ± 0.07 , n=2) de ancho máximo, superficie totalmente cubierta por espinas carentes de punta, totalmente redondas (**figura 4k**). Alas con cuatro pares de papilas pedunculadas laterales (dos precloacales, uno adcloacal y uno postcloacal). Cuatro pares de papilas cloacales sesiles (uno precloacal y tres poscloacales).

Hembra. Cuerpo con 37.5-41 (39.25 ± 2.47 , n=2) de largo con 0.73-0.89 (0.81 ± 0.113) de ancho máximo. Bulbo cefálico con 0.15-0.20 (0.17 ± 0.035 , n=2) de largo por 0.22-0.26 (0.24 ± 0.028 , n=2). Ganchos del bulbo con 0.017-0.019 (0.018 ± 0.0009 , n=4) de largo y 0.0048-0.005 (0.0049 ± 0.0003 , n=4) de ancho. La forma de las espinas en el cuerpo corresponden con la descrita para los machos. Extremo posterior con escamas redondeadas. Papila cervical localizada en las hileras 12-13 de espinas del cuerpo. Apertura de la vulva localizada cercana al final del extremo posterior del cuerpo a 0.50-0.45 (0.47 ± 0.035 , n=2). Huevos con un tapón polar con 0.075-0.067 (0.07 ± 0.003 , n= 4) de largo por 0.030-0.44 (0.036 ± 0.006 , n=4), con la superficie muy granulosa. El ano se encuentra a 0.30-0.35 (0.32 ± 0.035 , n= 2) del extremo posterior.

Comentarios. Desde la descripción de esta especie, realizada por Anderson (1964), nunca se ha cuestionado su validez, ya que exhibe características únicas entre los miembros del género, tales como cuerpo muy delgado, la presencia de espinas redondas en la región caudal del macho, el apéndice digitiforme en la parte distal de la bursa y el hábitat en que se han encontrado, ya que en América, ninguna otra especie parasita los riñones. Sin embargo, en la descripción original no se mencionan o no se describen adecuadamente algunos rasgos que incorporamos en esta redesccripción y que consideramos de importancia mayor, como son: la posición tan caudal de la vulva, la textura de la cáscara del huevo y la presencia de pequeñas escamas achatadas en toda la región posterior. La redesccripción de esta especie se realizó con la observación de ejemplares provenientes de la USNPC (088150, 074372) y de la CMNPA (sin número).

Hospedero: *Lontra canadensis canadensis*.

Distribución: Canadá y EUA

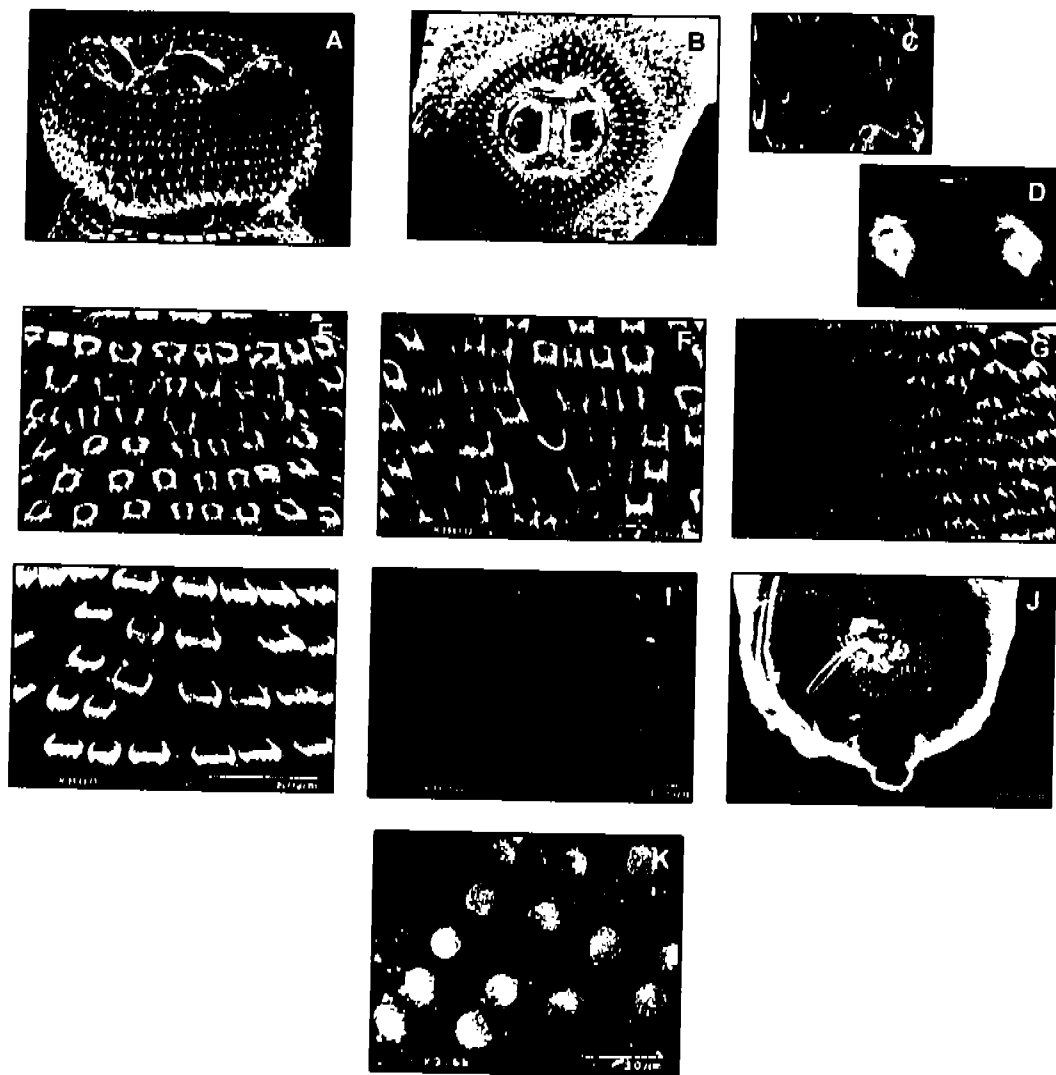


Figura 4. Características de *G. miyazakii*. **A, B.** Bulbo cefálico, **C.** Ganchos vista frontal, **D.** Ganchos vista lateral, **E.** Espinas inmediatas al bulbo, **F.** Espinas de la región de la papila cervical, **G.** Espinas en la región media del esófago, **H.** Espinas en la unión esófago-intestino. **I.** Cutícula con escamas redondeadas de la mitad posterior. **J.** Bursa del macho, **K.** Espinas redondas en la bursa

***Gnathostoma procyonis* Chandler, 1942. Figura 5**

General: (basada en cuatro machos y dos hembras). Gusanos de tamaño medio. Cuerpo ensanchado en la mitad posterior. Bulbo cefálico armado con 9 anillos de ganchos (**figura 5 C, D**) completos y 1 incompleto (**figura 5A**). Un par de labios trilobulados más anchos que largos, sobresaliendo en el extremo anterior del bulbo cefálico (**figura 5B**). Dos papilas simples en cada labio y un pequeño anfidio entre cada par de papilas. Cuatro bayonetas en el bulbo. Mitad anterior del cuerpo cubierta por espinas grandes y mitad posterior armada con pequeñas espinas muy juntas entre sí, semejantes a bordes aserrados. Las espinas varían de forma y tamaño según la región del cuerpo de los gusanos. Papila cervical localizada en el primer cuarto del cuerpo. Sacos cervicales iniciando desde las bayonetas y sobrepasando el anillo nervioso. Esófago anterior muscular y posterior glandular.

Macho: Cuerpo 17-19.2 (18.22 ± 1.01 , n=4) de largo por 1.2-1.32 (1.26 ± 0.05 , n=4) de ancho máximo. Bulbo cefálico 0.26-0.28 (0.27 ± 0.014 , n=2) de largo por 0.64-0.66 (0.65 ± 0.014 , n=2) de ancho; labios 0.088-0.095 (0.091 ± 0.005 , n=2) de largo por 0.176-0.178 (0.1765 ± 0.0007 , n=2) de ancho. Ganchos del bulbo 0.019-0.024 (0.022 ± 0.0015 , n=8) de largo por 0.0045-0.0067 (0.0055 ± 0.006 , n=4) de ancho. Espinas situadas posteriormente al bulbo de tamaño medio de 0.024-0.031 (0.028 ± 0.002 , n=10) de largo y 0.013-0.019 (0.016 ± 0.0016 , n=10) de ancho, con 3 a 5 puntas de aproximadamente del mismo tamaño (**figura 5E**). Espinas al nivel de la papila cervical de tamaño similar, con 0.030-0.039 (0.035 ± 0.002 , n=10) de largo por 0.028-0.034 (0.030 ± 0.002 , n=10) de ancho; el número de puntas es de 3 a 4 con la punta central hasta cuatro veces más grande que las laterales, la cual puede ser bifurcada o presentar una o dos pequeñas puntas accesorias (**figura 5F**). Espinas en la región media del esófago más largas [(0.043-0.047 (0.045 ± 0.0014 , n=10))] con la base de la lámina más delgada que en la parte distal [(0.017-0.020 (0.019 ± 0.0086 , n=10))], presentando 3 a 4 puntas; la punta media más de cuatro veces mayor a las laterales, presentando una punta accesorio (raramente dos) (**figura 5G**). Espinas de la unión esófago-intestino más pequeñas con respecto a las anteriores [(0.042-0.044 (0.043 ± 0.0008 , n=10))] de largo por 0.015-0.018 (0.016 ± 0.001 , n=10) de ancho, todas presentan 3 puntas, la central es más larga pero no notablemente (**figura 5H**). Por debajo de esta región, el tamaño y número de puntas se reduce; primero a dos puntas hasta convertirse en espinas simples. Posterior a la región ecuatorial del

cuerpo, las pequeñas espinas simples se juntan aparentando pequeñas sierras entre las estrias de la cutícula (**figura 5I**), las cuales al aproximarse a la región posterior, se vuelven menos prominentes. La papila cervical y el anillo nervioso se localizan en las hileras de espinas del cuerpo 12-13 y 19-23 respectivamente. El poro excretor se localiza a la altura de las hileras 26-27. Los sacos cervicales miden 1.1-1.8 ($1.37 \pm 0.30, n=4$). El esófago abarca un 18-21.17 % ($19.65 \pm 1.3, n=4$) de la longitud del cuerpo; con una longitud de 3.4-3.8 ($3.57 \pm 0.17, n=4$). La región muscular 0.44-0.49 ($0.46 \pm 0.02, n=4$) y la glandular 2.96-3.33 ($3.1 \pm 0.16, n=4$). Las espículas son desiguales con ápices romos. La espícula izquierda 0.45-0.40 ($0.42 \pm 0.02, n=4$) y la derecha 1.35-1.41 ($1.41 \pm 0.06, n=4$), representando un 7.4-7.9% ($7.74 \pm 0.199, n=4$) de la longitud total del cuerpo. La extremidad caudal (**figura 5J**) es lobulada 0.68-0.92 ($0.8 \pm 0.0113, n=4$) de ancho, con una superficie totalmente cubierta por espinas pequeñas simples, con excepción de la región alrededor de la apertura cloacal. Alas con 4 pares de papilas pedunculadas laterales (dos precloacales, una adcloacal y otro postcloacal). Cuatro pares de papilas cloacales sésiles (uno pericloacal y tres poscloacales).

Hembra. Cuerpo con 20.9-23.1 ($21.5 \pm 1.05, n=2$) de largo con 1.35-1.45 ($1.39 \pm 0.04, n=2$) de ancho máximo. Bulbo cefálico con 0.28-0.0.29 ($0.285 \pm 0.07, n=2$) de largo por 0.18-0.19 ($0.185 \pm 0.007, n=2$). Ganchos del bulbo con 0.21-0.24 ($0.0225 \pm 0.007, n=8$) de largo y 0.049-0.051 ($0.005 \pm 0.003, n=5$) de ancho. La forma de las espinas en el cuerpo corresponden con la descrita para los machos. Extremo posterior con bordes aserrados hasta la región de la cloaca. Papila cervical localizada en la hileras 12-13 de espinas del cuerpo. Apertura de la vulva localizada en al inicio de la mitad posterior del cuerpo a 10.1-1.12 ($1.11 \pm 0.17, n=2$) del extremo posterior. Huevos con un tapón polar con 0.058-0.064 ($0.060 \pm 0.002, n=6$) de largo por 0.033-0.35 ($0.034 \pm 0.003, n=5$) (**figura 5K,L**). El ano se encuentra a 0.26-0.297 ($0.28.5 \pm 0.02, n=2$) del extremo posterior.

Comentarios. El análisis del material depositado en la colección parasitológica del HWML registrado cómo *Gnathostoma* sp. (24074, 24156, 24213, 24224, 24238, 24250, 24272, 24294, 24306, 24312, 24467 y 24676) y *G. spinigerum* (23916, 23917, 23925, 23931, 23943, 23963, 23970, 23983, 23984, 24012, 24019, 24029, 24033, 24038, 24049, 24052, 24056 y 24524), reveló que pertenecen en realidad a *G. procyonis*. De la misma forma los registros 31234, 31238 de la USNPC registrados cómo *Gnathostoma* sp. son asignados aquí a *G. procyonis*. La base para realizar esta transferencia es que dicho material presenta los rasgos diagnósticos de la misma, como son: la forma de las espinas a nivel de la papila cervical y la región media del esófago, la región posterior del cuerpo

con estrías aserradas y un tapón polar en los huevos. Descritos por Chandler (1942) originalmente.

De acuerdo con trabajos previos (Almeyda–Artigas *et al.* 1994; Almeyda-Artigas *et al.* 2000a; Bertoni-Ruíz *et al.*, 2005) esta especie se distribuye únicamente en EUA y los registros en México corresponden a *G. lamothei* (Bertoni-Ruiz, *et al.*, 2005).

Hospedero: *Procyon lotor lotor*

Distribución: E.U.A.

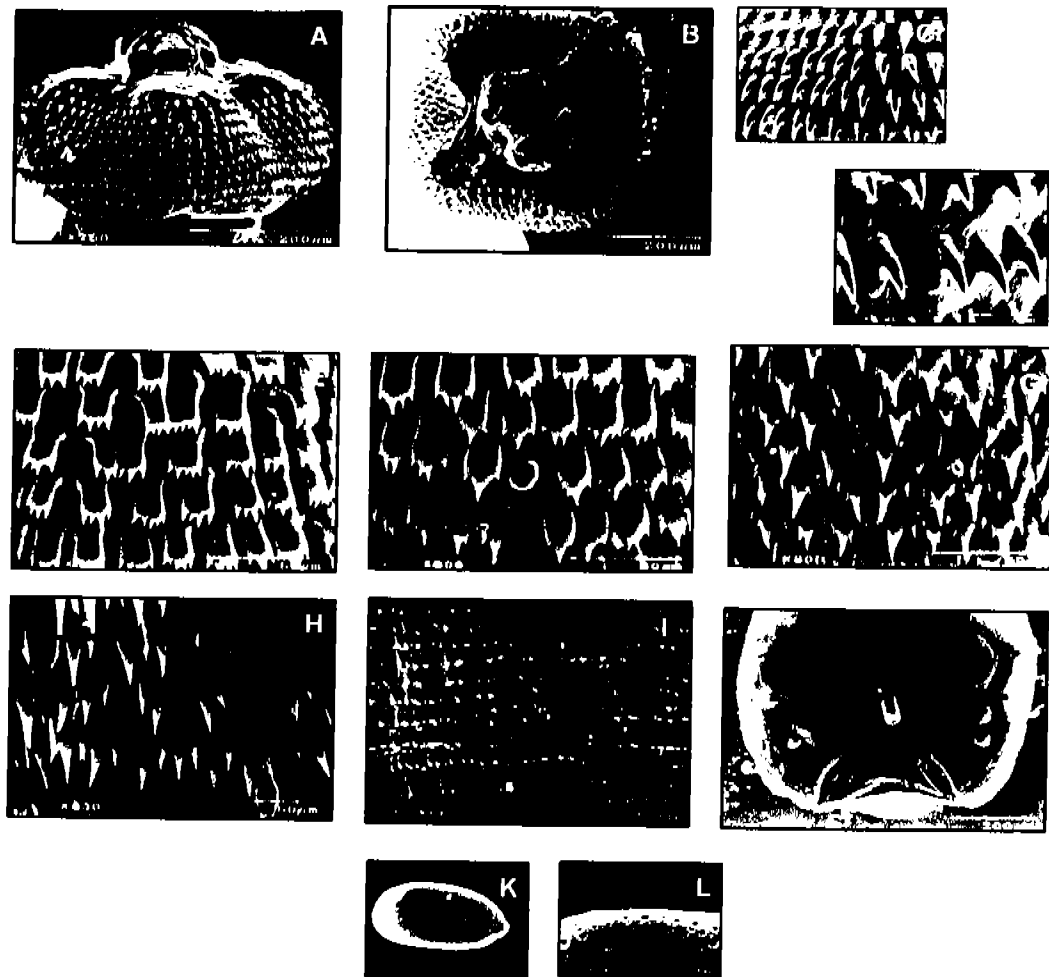


Figura 4. Características de *G. procyonis*. **A, B.** Bulbo cefálico, **C.** Ganchos vista frontal, **D.** Ganchos vista lateral, **E.** Espinas inmediatas al bulbo, **F.** Espinas de la región de la papila cervical, **G.** Espinas en la región media del esófago, **H.** Espinas en la unión esófago-intestino. **I.** Cutícula con estrias aserradas en la mitad posterior. **J.** Bursa del macho, **K.** Huevo, **L=** Textura de la cascara del huevo.

***Gnathostoma socialis* Leidy, 1858 (sin. *Cheirachantus socialis*). Figura 6**

General: (basada en dos machos y dos hembras). Gusanos medianos. Bulbo cefálico armado con 9-10 anillos de ganchos completos y 1 incompleto (**figura 6A**). Un par de labios trilobados, con una anchura mayor que el largo, sobresaliendo en el extremo anterior del bulbo cefálico. Dos papilas simples en cada labio y un pequeño anfidio localizado entre cada par de papilas. Con cuatro bayonetas en el bulbo. Mitad anterior del cuerpo cubierta por espinas, mitad posterior desnuda. Las espinas varían de forma y tamaño según la región del cuerpo de los gusanos. Papila cervical localizada en el primer cuarto del cuerpo. Los sacos cervicales se extienden desde las bayonetas hasta por debajo del anillo nervioso. Esófago dividido en una región anterior muscular y una posterior glandular.

Macho: Cuerpo con 19.81-24 (21.9 ± 2.9 , n=2) de largo y 1.2-1.4 (1.3 ± 0.14 , n=2) de ancho máximo. Bulbo cefálico con 0.25-0.29 (0.27 ± 0.028 , n=2) de largo y 0.38-0.41 (0.395 ± 0.02 , n=2) de ancho; labios con 0.128-0.132 (0.130 ± 0.035 , n=2) de largo por 0.175-0.177 (0.176 ± 0.007 , n=2) de ancho. Ganchos del bulbo con 0.016-0.019 (0.0175 ± 0.0016 , n=6) de largo por 0.0049-0.0079 (0.0047 ± 0.0006 , n=9) de ancho. Las espinas situadas posteriormente al bulbo son alargadas con 0.026-0.031 (0.027 ± 0.0018 , n=8) de largo y 0.010-0.014 (0.01181 ± 0.0013 , n=7) de ancho, con 3-4 puntas, la punta media ligeramente más larga que las laterales en ocasiones con una punta accesoria; la base de la espina más delgada que la parte distal (**figura 6B**). Las espinas al nivel de la papila cervical conservan la misma forma con 0.031-0.04 (0.030 ± 0.003 , n=6) de largo por 0.009-0.015 (0.012 ± 0.0012 , n=6) de ancho; el número de puntas es de 3-5 (**figura 6C**). Las espinas en la región media del esófago aumentan su tamaño [0.054 - 0.068 (0.061 ± 0.004 , n=6)] de largo por 0.014-0.020 (0.017 ± 0.002 , n=6) de ancho, con 3-5 puntas, punta media hasta 3 veces mayor a las laterales (**figura 6D**). Al nivel de la unión esófago-intestino el tamaño de las espinas es similar [0.054 - 0.065 (0.058 ± 0.004 , n=6)] de largo por 0.015-0.022 (0.017 ± 0.001 , n=6) de ancho. Con 3-4 puntas pequeñas, y los bordes laterales de la lamina son más rectos y la punta central más de tres veces mayor a las laterales (**figura 6E**). Posteriormente a esta región, el tamaño y número de puntas de las espinas disminuye, hasta convertirse en espinas de una sola punta al aproximarse a la región ecuatorial, desapareciendo por completo en esta región del cuerpo. Región

posterior desnuda (**figura 6F**). La papila cervical y el anillo nervioso se localizan en las hileras de espinas del cuerpo 9-10 y 18-23 respectivamente. El poro excretor se localiza a la altura de las hileras 28-32. Los sacos cervicales miden 0.93-1 (0.96±0.049, n= 4). El esófago abarca un 16.25-16.6 % (16.4±0.2 n=2) de la longitud del cuerpo; con una longitud de 3.29-3.9 (3.5±0.43, n=2). La región muscular mide 0.5-0.52 (0.51±0.014, n=2) y la glandular 2.79-3.38 (3.08±0.41, n=2). Las espículas son desiguales con ápices romos. La espícula izquierda mide 0.31-0.42 (0.36±0.077, n=2) y la derecha 0.60-0.67 (0.78±0.26, n=2), representando un 3.02-4.04% (3.5±0.71, n=2) de la longitud total del cuerpo. La extremidad caudal es lobulada, con 0.59-0.68 (0.63±0.063, n=2) de ancho, con una superficie totalmente cubierta por espinas simples. Alas con cuatro pares de papilas pedunculadas laterales (dos precloacales, uno adcloacal y uno postcloacal). Cuatro pares de papilas cloacales sesiles (uno precloacal, uno pericloacal y uno poscloacales) (**figura 6G**).

Hembra. Cuerpo con 30.0-32 (31±1.4, n=2) de largo con 2.04-2.1 (2.25±0.21) de ancho máximo. Bulbo cefálico con 0.18-0.21 (0.185±0.032, n=2) de largo por 0.32-0.35 (0.335± 0.025, n=2). Ganchos del bulbo con 0.018-0.021 (0.0195±0.0017, n=6) de largo por 0.0048-0.0078 (0.0049±0.0016, n=6) de ancho. La forma de las espinas en el cuerpo corresponden con la descrita para los machos. Extremo posterior desnudo. Papila cervical localizada en la hileras 10-11 de espinas del cuerpo. Apertura de la vulva localizada cerca de la región ecuatorial a 13.8-14.2 (14±0.049, n=2). Huevos con un tapón polar con 0.075-0.067 (0.07±0.003, n= 4) de largo por 0.030-0.44 (0.036±0.006, n=4). El ano se encuentra a 0.30-0.35 (0.32± 0.035, n= 2) del extremo posterior.

Comentarios. Esta especie se describió originalmente como *Cheiracanthus socialis* (Leidy, 1858) parasitando a *Mustela vison* en E.U.A. Baylis y Lane (1920) en su revisión del género, consideraron que esta especie era sinónimo de *G. spinigerum* con base en las escasas características que se mencionan en la descripción original (Leidy, 1858). Por otra parte, esta especie no fue validada en la revisión realizada por Miyazaki (1960), ya que este autor también la consideró como sinónimo de *G. spinigerum* aunque señaló que podría tratarse de una especie diferente por su distribución en América del Norte y el tipo de hospedero que parasita, considerando necesaria su reexaminación. Anderson (1964) realizó una redesccripción de esta especie con algunos de los ejemplares depositados en la USNPC y aunque describe algunas de sus estructuras, no concluyó tajantemente de que se trataba de una especie válida debido al mal estado de los

ejemplares. Miyazaki en 1991 la excluyó de su nueva revisión del género sin hacer comentarios al respecto. De acuerdo con las observaciones realizadas en este trabajo, así como con el resultado de los análisis filogenéticos, en los que se sitúa alejada de *G. spinigerum*, podemos aseverar que *G. socialis* es una especie independiente y válida. La ausencia de espinas en la parte posterior del cuerpo la hacen diferente de *G. binucleatum*, *G. miyazakii*, *G. procyonis* y *G. americaum*; así como la cutícula lisa en la parte posterior, la distingue de *G. lamothei*. En este sentido, con la que podría guardar semejanza es con *G. turgidum*, sin embargo puede distinguirse claramente de esta última que tiene una forma muy particular de las espinas y puede presentar más de cinco puntas mientras que en *G. socialis* el número de puntas nunca es mayor a cinco, además cuenta con un tapón polar en los huevos mientras que *G. turgidum* tiene dos. El estudio de material depositado en la USNPC designado como *Gnathostoma* sp. (40574, 44714, 47717), nos permitió asignarlo a *G. socialis*, de la misma forma que aquel registrado como *G. spinigerum* (49112).

Hospedero: *Mustela vison*

Distribución original: E.U.A

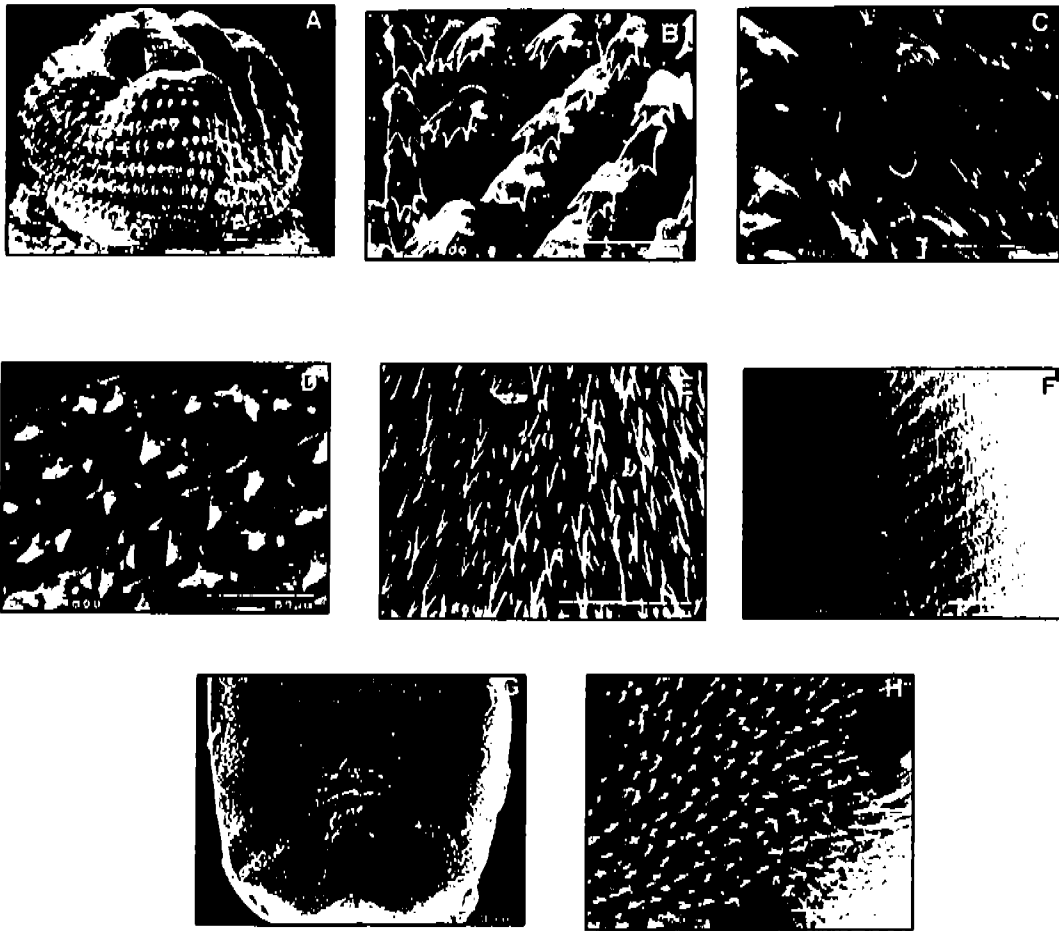


Figura 6. Características de *G. socialis*. **A.** Bulbo cefálico. **B.** Espinas inmediatas al bulbo. **C.** Espinas de la región de la papila cervical. **D.** Espinas en la región media del esófago. **E.** Espinas en la unión esófago-intestino. **F.** Cutícula lisa de la mitad posterior. **G.** Bursa del macho, **H.** Espinas de la bursa

Gnathostoma turgidum Stossich, 1902 (Sin. *Gnathostoma didelphis*, *G. brasiliense*).

Figura 8

General: (basada en dos machos y dos hembras). Gusanos muy grandes, probablemente la especie de mayor longitud del género. Cuerpo de forma cilíndrica sin ensanchamiento notable en la región posterior. Bulbo cefálico armado con 8 anillos de ganchos (**figura 7C, D**). completos y dos incompletos (**figura 7A**). Un par de labios trilobulados, más anchos que largos, sobresaliendo en el extremo anterior del bulbo cefálico (**figura 7B**). Dos papilas simples en cada labio y un pequeño anfidio entre cada par de papilas. Cuatro bayonetas en el bulbo. Mitad anterior del cuerpo cubierta por espinas, que varían de forma y tamaño según la región del cuerpo. La mayoría de las espinas con puntas en los bordes laterales, excepto las inmediatas al bulbo y las de la región media del cuerpo. Papila cervical en el primer cuarto del cuerpo, muy cercana al cuello. Sacos cervicales iniciando desde las bayonetas y sobrepasando el anillo nervioso. Esófago anterior muscular y posterior glandular.

Macho: Cuerpo 39.8-41.5 (4.06 ± 0.12 , n=2) de largo por 1.61-1.74 (1.67 ± 0.09 , n=2) de ancho máximo. Bulbo cefálico 0.60-0.64 (0.62 ± 0.3 , n=2) y 0.83-0.85 (0.84 ± 0.01 , n=2) de ancho; labios 0.09-0.12 (0.105 ± 0.02 , n=2) de largo por 0.27-0.28 (0.275 ± 0.007 , n=4) de ancho. Ganchos del bulbo 0.015-0.020 (0.018 ± 0.001 , n=10) de largo por 0.006-0.009 (0.008 ± 0.006 , n=10) de ancho. Espinas posteriores al bulbo cortas [0.049-0.057 (0.053 ± 0.003 , n=10)] y angostas [0.018-0.026 (0.022 ± 0.003 , n=10)], con 3 a 9 puntas del mismo tamaño (**figura 7E**); espinas al nivel de la papila cervical similares a las anteriores, pero de tamaño mayor [0.051-0.059 (0.056 ± 0.003 , n=10) de largo por 0.028-0.034 (0.030 ± 0.002 , n=10) de ancho] y con más puntas (5-10) (**figura 7F**). Espinas en la región media del esófago largas [0.079-0.095 (0.089 ± 0.005 , n=10)] y ensanchadas en su porción distal [0.051-0.061 (0.055 ± 0.003 , n=10)], con 5-8 puntas de tamaño similar (**figura 7G**). Al nivel de la unión esófago- intestino, la forma se mantiene aunque su tamaño es mayor [0.079-0.1 (0.088 ± 0.006 , n=10) de largo por 0.053-0.063 (0.057 ± 0.002 , n=10)], con 5-10 puntas (**figura 7H**); entre esta intersección y la región media, la forma de las espinas varía, siendo más anchas en su parte distal y sin puntas en los bordes laterales. Posterior a esta región, el tamaño y número de puntas disminuye, primero de 2 a 3 puntas, hasta convertirse en espinas de una sola punta al aproximarse a la región ecuatorial, para desaparecer por completo en esta región. La mitad posterior del cuerpo presenta la

cutícula lisa (**figura 7I**). La papila cervical y el anillo nervioso se localizan en las hileras de espinas 9-10 y 24-26, respectivamente. El poro excretor no fue observado. Los sacos cervicales miden 2.8-4 (3.4±0.84). El esófago abarca 21.5-23.51% (22.5% ±1.4 n=2) del cuerpo, con una longitud de 7.85-9.64- (8.74±1.26, n=2). La región muscular mide 1.6-2 (1.8±0.28) y la glandular 6.94-7.64 (6.94±0.98, n=2). Espículas desiguales con ápices romos; la izquierda mide 0.88-1 (0.94±0.08, n=2) y la derecha 1.97-2.2 (2.08±0.16, n=2), representando 4.82- 5.3 % (5.6%) de la longitud total del cuerpo. Extremo caudal lobulado, 1.92 -1.96 (1.94±0.028, n=2) de ancho; superficie totalmente cubierta por espinas pequeñas simples, excepto en la parte superior e inferior de la abertura cloacal. Alas con cuatro pares de papilas pedunculadas laterales (dos precloacales, uno adcloacal y uno postcloacal). Cuatro pares de papilas cloacales sesiles (uno precloacal y tres poscloacales). (**figura 7J**)

Hembra. Cuerpo con 66.8-71.9 (6.68±0.71, n=2) de largo con 2.05-2.18 (2.11±0.09) de ancho máximo. Bulbo cefálico con 0.7-0.8 (0.75±0.07, n=2) de largo por 0.88-0.91 (0.89± 0.02, n=2). Ganchos del bulbo con 0.017-0.029 (0.023±0.008, n=5) y 0.007-0.01 de ancho (0.008±0.002, n=5). La forma de las espinas en el cuerpo corresponden con la descrita para los machos. Extremo posterior desnudo. Papila cervical localizada en la hilera 10 de espinas del cuerpo. Apertura de la vulva localizada en la al inicio de la mitad posterior del cuerpo a 2.78- 3.04 (2.91±0.18, n=2) del extremo anterior. Huevos con dos polos con 0.048-0.055 (0.051±0.005, n= 6) de largo por 0.031-0.39 (0.035±0.005, n=5). El ano se encuentra a 0.33-0.42 (0.37± 0.06, n= 2) del extremo posterior.

Comentarios: La validez de esta especie dentro del género *Gnathostoma* se sustenta en una combinación de caracteres: espinas con puntas en los bordes laterales, cutícula en la porción posterior desnuda y dimensiones del cuerpo. Esta especie es la que cuenta con la distribución más amplia de las especies del género en América (Estados Unidos, México, Argentina). Al haberse encontrado en diferentes países se han descrito varias especies que han caído posteriormente en sinonimia con *G. turgidum* y en algunos casos estos sinónimos han sido ampliamente utilizados, como *G. didelphis*. En este trabajo fue posible revisar ejemplares de *G. didelphis* (USNPC 8552, 44710, 58600,77171), *G. oligomucronatum* (USNPC 88148, 58535.02) y de *G. turgidum*, la presente descripción se basó solamente en estos últimos (CNHE 4739, USNPC 26821,30794). En el caso de los ejemplares nombrados como *G. didelphis* se concluyó su pertenencia a *G. turgidum* debido a que la forma y la disposición de las espinas, así como

otras características como la forma de los ganchos del bulbo, el número de anillos de ganchos y extremo posterior del cuerpo desnudo, coinciden con la descripción de *G. turgidum*. No obstante, el tamaño del cuerpo generalmente fue menor, muy probablemente debido a que se trata de organismos jóvenes en la mayoría de los casos. En el caso de la segunda especie nominal también es morfológicamente indistinguible de *G. turgidum*.

Un ejemplar de *G. didelphis* depositado en la USNPC (077171) encontrado en el hígado de un oso (*Ursus americanus*), amplía el espectro hospedatorio de *Gnathostoma turgidum*, el cual típicamente se encuentra parasitando marsupiales con algunos registros en armadillos.

Hospederos: *Didelphis azarae*, *D. marsupialis*, *D. virginiana*, *Dasybus novemcinctus*, *Ursus americanus*

Distribución: E.U.A, México, Brasil, Argentina.

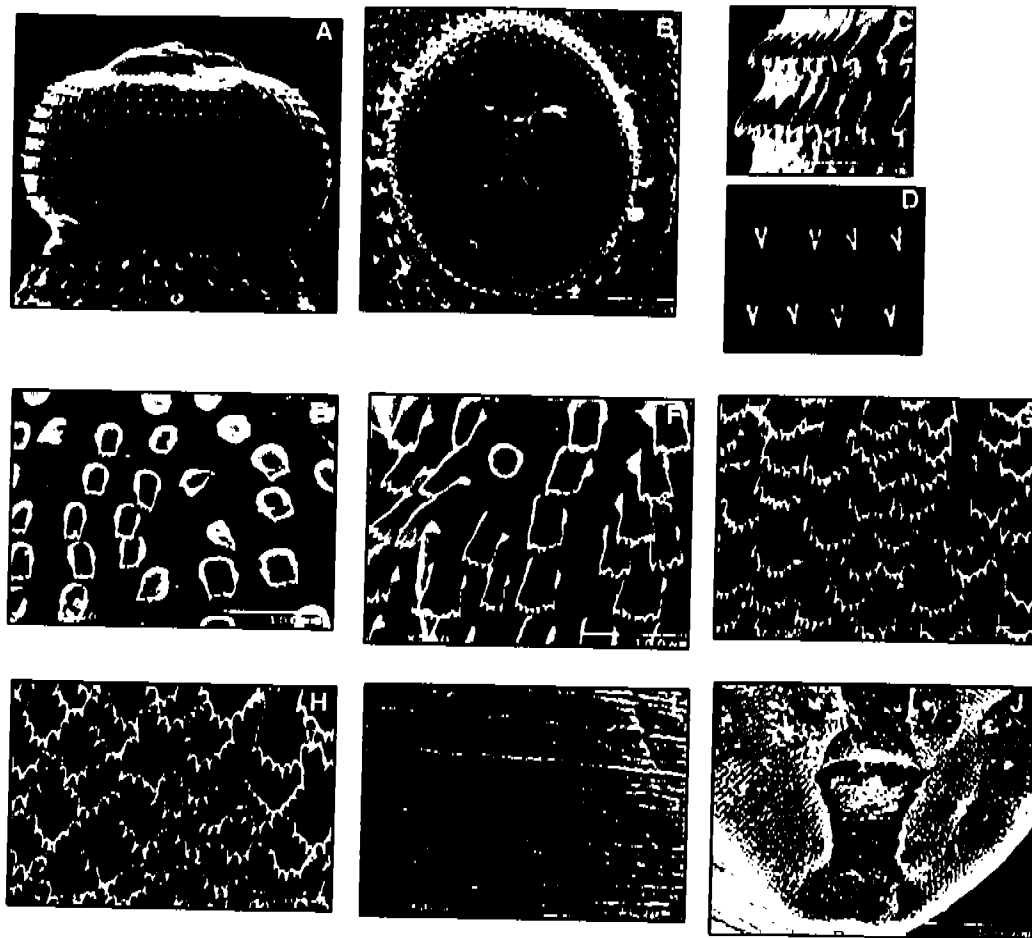


Figura 7. Características de *G. miyazakii*. **A, B.** Bulbo cefálico, **C.** Ganchos vista frontal, **D.** Ganchos vista lateral, **E.** Espinas inmediatas al bulbo, **F.** Espinas de la región de la papila cervical, **G.** Espinas en la región media del esófago, **H.** Espinas en la unión esófago-intestino. **I.** Cutícula lisa de la mitad posterior, **J.** Bursa del macho

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

Este trabajo se realizó buscando posibles respuestas a preguntas concretas que involucran la historia evolutiva y el análisis de diferentes aspectos taxonómicos de las especies actuales del género *Gnathostoma*. A continuación se abordarán dichas preguntas a la luz de los resultados obtenidos en nuestro análisis.

¿Las especies del género *Gnathostoma* presentan una historia en común con sus hospederos definitivos?

Los árboles obtenidos (figuras 2, 3) sugieren que el origen del género *Gnathostoma* se encuentra ligado a los mamíferos carnívoros y a su historia de radiación y distribución geográfica, la cual tuvo su auge principalmente en el eoceno y oligoceno temprano. Dichos procesos pudieron jugar un papel muy importante en la aparición del género y en gran medida en su dispersión y especiación.

El orden Carnivora se ha dividido en dos subórdenes: Canimorfia y Felimorfia (Hunt y Flynn, 2005); la mayoría de las especies del género *Gnathostoma* se encuentran parasitando al primer suborden. El origen de los carnívoros ha sido discutido ampliamente (Wang *et al.*, 2004, 2005; Hunt y Flynn, 2005), postulándose que éste ocurrió en los continentes del norte (región holártica), aunque no se sabe a ciencia cierta si ocurrió en Norteamérica o en Eurasia. Se tiene el conocimiento de que en América del Norte fue donde sucedió la mayor parte de la historia y diversificación de los canidos verdaderos (lobos, perros, zorros, etc.) con varias colonizaciones a Eurasia y posteriormente a América del Sur. En cambio el grupo de canimorfios (arctoideos) que engloba a los mustélidos, úrsidos y prociónidos, no tiene un origen claro ya que fósiles igualmente antiguos y muy emparentados, se han encontrado en Eurasia y Norteamérica, lo que implicaría una diversificación anterior a lo que data su registro (mioceno). No obstante, en Norteamérica se ha encontrado una diversidad de fósiles de mustélidos mayor, por lo que su origen parece más probable en esta región (Wang *et al.*, 2004).

Por lo tanto, la historia de *Gnathostoma*, podría estar exhibiendo un patrón similar al que mostraron los antiguos carnívoros: con un origen en el hemisferio norte (con mayor probabilidad en Norteamérica) asociado con un mamífero carnívoro y colonización posterior tanto de Eurasia como de América del Sur. Al darse procesos de especiación, algunas de estas nuevas especies acompañaron a sus hospederos carnívoros y migraron de América a Europa y Asia y viceversa, con la aparición del paso de Bering. Debieron

ocurrir cambios de hospedero de manera paralela, principalmente a mamíferos de distintos órdenes, de manera tal, que aún con la subsecuente extinción de muchos de éstos, el género *Gnathostoma* pudo subsistir y contar con una amplia distribución geográfica y más aún, un amplio espectro hospedatorio.

Este intercambio de faunas a través del paso de Bering y la aparición del Istmo de Panamá y por otra parte el aislamiento de taxones tras la última glaciación, seguramente influyeron en la historia evolutiva del género. Estos hechos pueden explicar porqué algunas especies de *Gnathostoma* están emparentadas aún cuando se distribuyen en continentes diferentes o regiones alejadas; tal es el caso de *G. socialis* (EUA) y *G. nipponicum* (Japón) ambas parásitas de mustélidos, de la misma forma que *G. miyazakii* (Canadá y EUA) y *G. vietnamicum* (Viet-Nam) parásitas de mustélidos lutrinos y *G. americanum* (Brasil) y *G. binucleatum* (México) parásitas de félidos. El caso en el que especies que no se encuentren tan emparentadas entre sí, aún cuando sus hospederos sí lo están, nos habla de que *Gnathostoma* ha tenido la capacidad de colonizar en más de una ocasión a hospederos de un mismo grupo taxonómico, lo cual está representado con *G. spinigerum* y *G. binucleatum* (ambos de félidos y cánidos) que se encuentran alejadas en el árbol (figuras 2, 3).

La especie *Gnathostoma turgidum* que se distribuye ampliamente en el continente americano, parece haber experimentado un cambio hacia los marsupiales, situación que se repitió posteriormente con otras especies del género a roedores y suidos. La amplia distribución de *G. turgidum* queda explicada con el patrón de dispersión que tuvieron los marsupiales didélfidos cuyos representantes ancestrales en Norteamérica se extinguieron a mediados del mioceno (Marshall *et al.*, 1990) quedando limitada su distribución a Sudamérica, dándose posteriormente una nueva migración de éstos hacia Norteamérica, por lo cual hoy podemos encontrar en esta región a *Didelphis virginiana*, el cual es uno de los hospederos más frecuentes de esta especie de parásito. La presencia *G. turgidum* en otros taxones de hospederos como edentados (armadillos) y ursidos (osos) nos habla de que dicha especie tiene la capacidad de cambiar fácilmente de hospedero sin que esto conlleve un proceso de especiación.

En estos términos podríamos decir que la historia de este género de nemátodos ha seguido un patrón general ligado a los mamíferos; pero no obedece a un patrón de coespeciación general, es decir, no todas las especies han evolucionado a la par de sus hospederos, evidenciado por el hecho de que en ambos cladogramas hay clados cuyas especies parasitan a hospederos no emparentados o que se distribuyen en áreas

opuestas. No obstante, podemos intuir que en casos de especies hermanas con un mismo género de hospedero, pudieron suceder eventos de coespeciación.

Que no en todos los casos se agrupen las especies de nematodos de acuerdo con el grupo de hospedero al que parasitan, no es una condición necesaria. A partir de la introducción de la sistemática filogenética en el estudio de los parásitos se ha evidenciado que éstos pueden mostrar sus propias vías evolutivas, que pueden ir o no ligadas a las de sus hospederos. En el caso particular de *Gnathostoma* la evidencia obtenida hasta el momento indica que los cambios de hospedero han jugado un papel muy importante en la evolución del género. Es necesario realizar una filogenia que incluya los datos morfológicos y moleculares (probablemente utilizando varios genes) de todas las especies conocidas, para contar con un marco filogenético más robusto y reafirmar dichas evidencias.

¿Las especies asiáticas y americanas son monofiléticas respectivamente?

Como fue observado en las filogenias morfológica y molecular, las especies que se distribuyen en cada uno de los continentes no tienen un origen común. Más bien a partir de un ancestro que probablemente apareció en América del Norte se derivaron las especies que habitan las áreas geográficas actuales. Eventos posteriores como glaciaciones con grandes migraciones de mamíferos a través de los continentes, aparición del Istmo de Panamá, entre otros, pudieron influir en que especies cercanamente emparentadas se encuentren actualmente distribuidas en áreas disjuntas de ambos continentes.

¿Qué relación hay entre las especies que tienen un mismo taxón de hospedero?

En términos generales, en la filogenia morfológica la agrupación de taxones en su mayoría coincidió con el grupo de hospederos a nivel de taxones terminales, por lo que podemos decir que la relación entre las especies que comparten un mismo taxón de hospedero a este nivel es estrecha. Hay pares de especies que comparten un género de hospedero, por ejemplo, *Procyon*, *Mustela*, *Lontra* y *Sus* (figura 9). No obstante, cada uno de estos casos parece haber sido el resultado de una colonización independiente al grupo de hospederos, ya que los grupos hermanos de parásitos habitan en taxones no hermanos de hospederos, por lo que es evidente que no se ha llevado a cabo un proceso de cofilogenia entre las especies de *Gnathostoma* y sus hospederos. Sin embargo, es

probable, que en casos de especies hermanas que cuentan el mismo género de hospedero (pero no la misma especie) podrían haberse llevado al cabo procesos de coespeciación. Asimismo, es evidente que se han presentado procesos de especiación más rápidos en los gusanos que en sus hospederos, tal es el caso de *G. lamothei* y *G. procyonis* parásitas de *Procyon lotor* o *G. hispidum* y *G. doloresi* parásitas de *Sus scrofa*.

¿Las especies que parasitan al hombre tienen una historia en común?

Las especies que se han registrado como parásitas del hombre (*G. spinigerum*, *G. hispidum*, *G. doloresi*, *G. nipponicum* y *G. binucleatum* (Miyazaki, 1991; Almeyda-Artigas, 1991; León-Régagnon *et al.*, 2002)) no se encuentran formando un solo clado (**figura 9**). La fase que puede infectar al humano es la larva de tercer estadio avanzado (L₃A). La principal forma de infección con estas larvas, es a través de la ingestión de carne de los hospederos intermediarios o paraténicos (peces, anfibios, reptiles y aves) cruda o insuficientemente cocida. Lo anterior nos lleva a pensar que no es difícil que cualquier especie de *Gnathostoma* que cuente en su ciclo de vida con un hospedero intermediario o paraténico, potencialmente comestible por el hombre, pueda ser capaz de infectarlo, sin que se encuentren relacionadas filogenéticamente. Esta hipótesis deberá corroborarse cuando esta fase larvaria esté bien caracterizada en todas las especies del género, especialmente en las americanas, y sus ciclos de vida debidamente descritos.

¿Cuántas especies componen al género *Gnathostoma*?

En este trabajo se incluyó a *G. lamothei*, taxón recientemente descrito y se revalidó a *G. socialis*, con base en la revisión de los ejemplares así como en los resultados obtenidos de la filogenia. Por lo tanto, la composición actual del género es de 13 especies (**Tabla 4**), a diferencia de lo expuesto por Miyazaki (1991) y Almeyda-Artigas (1991) quienes reconocieron solo a 11.

No es posible concluir tajantemente sobre la composición del género *Gnathostoma* debido a que hay aspectos que deben cubrirse tales como:

- Revisar especies tales como *G. americanum*, la cual no se encuentran bien caracterizada y cuyo estatus está definido únicamente con base en su descripción original.

- Así mismo es necesario realizar muestreos en diferentes países con la finalidad de encontrar nuevos registros del género en ambos continentes, así como en África y Australia, que se caracterizan por tener hospederos potenciales de *Gnathostoma* y por haber tenido una historia biogeográfica en común con América del sur en diferentes periodos.

Finalmente, y a pesar de que faltan algunos aspectos por cubrirse para realizar una hipótesis más robusta de las relaciones entre las especies de *Gnathostoma*, este trabajo constituye un primer acercamiento a la filogenia del género y puede sentar las bases para estudios taxonómicos y filogenéticos posteriores.

Tabla 4. Composición actual del género *Gnathostoma* en el mundo

Especie de <i>Gnathostoma</i>	Hospedero original (familia)	Áreas de distribución
1. <i>G. spinigerum</i> Owen, 1836	<i>Panthera tigris</i> (F)	Asia
2. <i>G. socialis</i> Leidy, 1858	<i>Mustela vison</i> (M)	América
3. <i>G. hispidum</i> Fedtschenko, 1872	<i>Sus scrofa</i> (S)	Asia y Europa
4. <i>G. turgidum</i> Stossich, 1902	<i>Didelphis azare</i> (D)	América
5. <i>G. doloresi</i> Tubangui, 1925	<i>Sus scrofa</i> (S)	Asia
6. <i>G. americanum</i> Travaos, 1925	<i>Felis tigrina</i> (F)	América
7. <i>G. nipponicum</i> Yamaguti, 1941	<i>Mustela sibirica</i> (M)	Asia
8. <i>G. procyonis</i> Chandler, 1942	<i>Procyon lotor lotor</i> (P)	América
9. <i>G. miyazakii</i> Anderson, 1964	<i>Lontra c. canadensis</i> (M)	América
10. <i>G. malaysiae</i> Miyazaki y Dunn, 1965	<i>Rattus tiomanicus</i> (Mu)	Asia
11. <i>G. vietnamicum</i> Le-van-Hoa, 1965	<i>Lontra elioti</i> (M)	Asia
12. <i>G. binucleatum</i> Almeyda-Artigas, 1991	<i>Leopardus pardalis</i> (F)	América
13. <i>G. lamothei</i> Bertoni et al., 2005	<i>Procyon lotor hernandezii</i> (P)	América

F=Felidae, M=Mustelidae, S=Suidae, D=Didelphidae, P= Procyonidae, Mu= Muridae

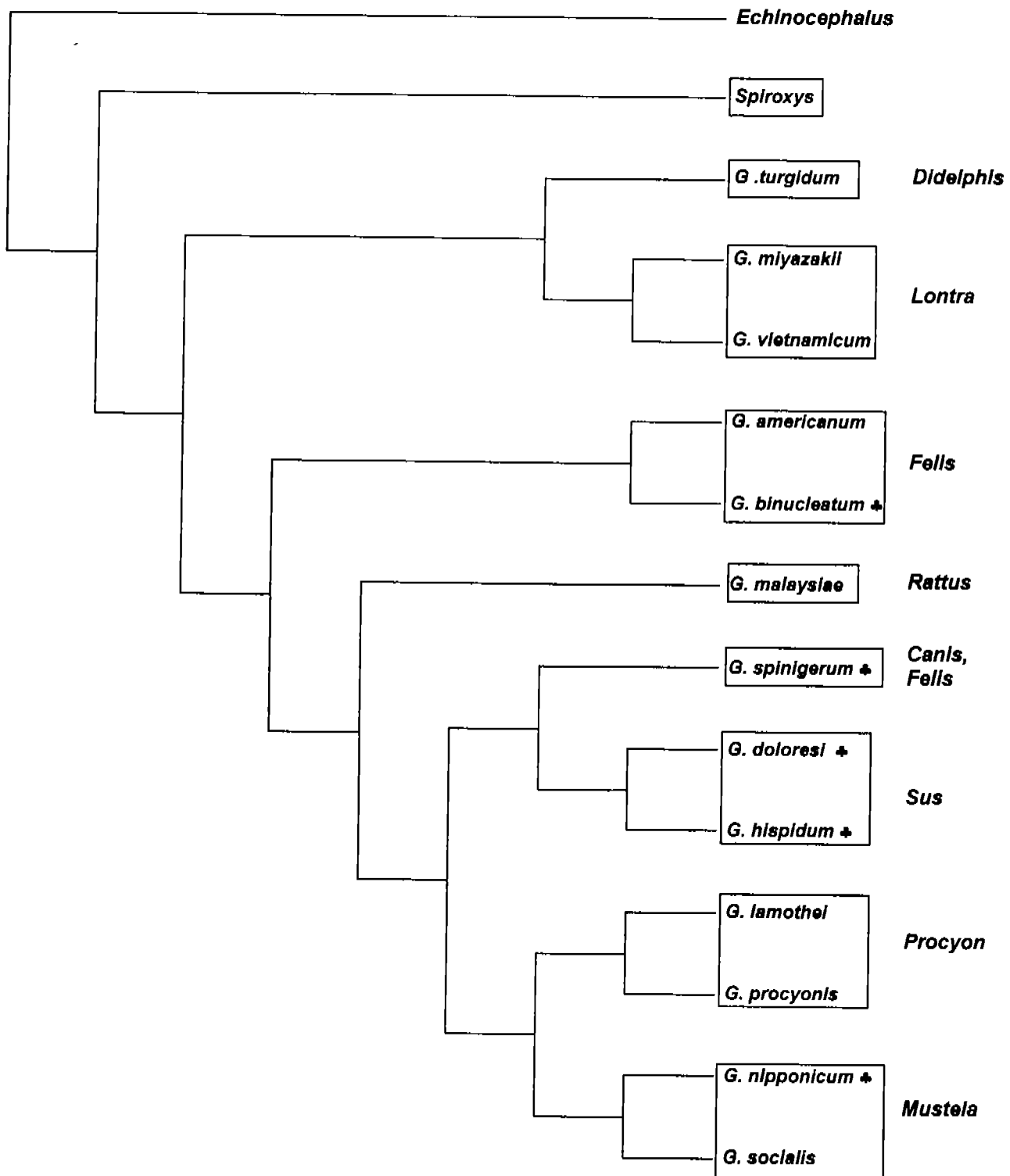


Figura 9. Árbol más parsimonioso basado en caracteres morfológicos mostrando asociación de las especies del género *Gnathostoma* con sus hospederos. Las especies que se han registrado como parásitas del hombre se encuentran señaladas con *.

BIBLIOGRAFÍA

AKAHANE H., SANO T. & MAKO T. 1986.

Morphological differences in cross sections on de advanced third stage larvae of *Gnathostoma spinigerun*, *G. hispidum* and *G. doloresi*. Japanese Journal of Parasitology 35 465-467.

ALMEYDA-ARTIGAS. J. 1991.

Hallazgo de *Gnathostoma binucleatum* n. sp. (Nematoda: Spirurida) en felinos silvestres y el papel de peces dulceacuícolas y oligoalinos como vectores de la Gnathostomiasis humana en la cuenca baja del Río Papaloapan, Oaxaca-Veracruz, México. Anales Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM 18 (2): 137-155.

ALMEYDA-ARTIGAS, J., ACOSTA, V., ALONZO-DÍAZ, L. CASTAÑEDA, M., & ZÁRATE, V., 1994.

First record of *Gnathostoma procyonis* Chandler, 1942 in Mexico, and a note on larval *Gnathostoma binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991 (Nematoda:Spirurida). Researchs and Reviews in Parasitology 54(2): 93-98.

ALMEYDA-ARTIGAS, J., BARGUES M. D.& MAS-COMA, S. 2000a.

ITS-2 rDNA secuencing of *Gnathostoma* species (Nematoda) and elucidation of the species causing Gnathostomiasis in the Americas. Journal of Parasitology 86(3): 357-544.

ALMEYDA-ARTIGAS, J., BARGUES M. D. & MAS-COMA S. 2000b.

rDNA of *Gnathostoma* species (Nematoda): ITS-2 microsatellites and 5.8S gene secondary structure. Researchs and Reviews in Parasitology 60 (1-2): 51-56

ANDERSON, R. C. 1964.

Gnathostoma miyazakii n. sp. from otter (*Lutra c. canadensis*) with comments on *G. sociale* (Leidy, 1958) of mink (*Mustela vison*). Canadian Journal of Zoology 42 (2): 249-254.

BAYLIS, H. A. & LANE, C. 1920.

A revision of nematode family Gnathostomatidae. Proceedings Zoological Society, London: 245-311.

BERTONI, R. F, GARCIA-PRIETO L, OSORIO-SARABIA D. & LEÓN-RÉGAGNON V. 2005.

- A new species of *Gnathostoma* (Nematoda: Gnathostomatidae) in *Procyon lotor hernandezii* from Mexico. *Journal of Parasitology* 91(5): 1143-1149.
- BROOKS, D. & MCLENNAN, D. 1993.**
Parascript. Parasites and the language of evolution. Smithsonian Institution Press, Washington and London. 419 p.
- CABALLERO Y CABALLERO, E. 1958.**
Estudios helmintológicos de la región oncocercosa de México y de la República de Guatemala. Nematoda 10ª parte. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México* 9: 61-76.
- CAMPBELL, J. D., GASSER & CHILTON, B. 1995.**
Differences in a ribosomal DNA sequence of *Strongylus* species allows identification of single eggs. *Journal of Parasitology* 25 (3):359-365.
- CHANDLER, A. C. 1942.**
The helminths of racoons in east Texas. *Journal of Parasitology* 28: 255-268.
- DAENGSVANG, S. 1980.**
A monograph on the genus *Gnathostoma* and gnathostomiasis in Thailand. SEAMIC. Southeast Asian Medical Information Center. Tokyo: 85 pp.
- DÍAZ-CAMACHO, S. P., WILLMS, K., RAMOS, M., DE LA CRUZ-OTERO, M. C., NAWA & AKAHANE, H. 2002**
Morphology of *Gnathostoma* spp. isolated from natural host in Sinaloa, Mexico. *Parasitology Research* 88(7):639-645
- FITCH, D. , BUGAJ, B. & EMMONS, W. 1995.**
18S ribosomal RNA gene phylogeny for some Rhabditidae related to *Caenorhabditis*. *Molecular Biology and Evolution* 12 (2): 346-358.
- HALL, T. A. 1999.**
Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98
- HENNIG, W. 1966.**
Phylogenetic systematics. University of Illinois Press, Urbana, Illinois. 263 p.
- HILLIS, D., MABLE, B., LARSON, A., DAVIS, S. & ZIMMER, E. 1996**
Nucleic Acids IV. Sequencing and Cloning. In. Hillis, D., Moritz, C. & Mable, B. (eds.) *Molecular Systematics*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts. 321-381.

HUNT, W. & FLYNN, J. J. 2005.

Phylogeny of the Carnivora: Basal relationships among the carnivoramorphans and assessment of the positions of "miacoidea" relative to Carnivora. *Journal of Systematic Paleontology* 3(1): 1-28.

KOGA M., AKAHANE, H. OGATA, O. LAMOTHE-ARGUMEDO. R., OSORIO-SARABIA, D., GARCÍA, P. L. & MARTÍNEZ, C. J. M. 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

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., MEDINA, R., LÓPEZ-JÍMENEZ, S. & GARCÍA-PRIETO, L. 1989.

Hallazgo de la forma infectiva de *Gnathostoma* sp. en peces de Temascal Oaxaca, México. *Anales del Instituto de Biología UNAM Serie Zoológica* 60(3):311-320.

LAMOTHE A. R., AKAHANE H., OSORIO S. D. & GARCÍA-PRIETO, L. 1998.

Hallazgo de *Gnathostoma turgidum* Stossich, 1902 en *Didelphys virginiana* de Temascal, Oaxaca, México. *Anales del Instituto de Biología UNAM Serie Zoológica* 69 (2): 225-229.

LEÓN-RÉGAGNON, V., OSORIO-SARABIA, D., GARCÍA-PRIETO, L., AKAHANE, H., LAMOTHE-ARGUMEDO, R., KOGA, M., MESSINA, M. & ALVAREZ-GUERRERO, C. 2002.

Study of the etiological agent of gnathostomosis in Nayarit, Mexico. *Parasitology international* 51(2): 201-204.

LEÓN-RÉGAGNON, V., OSORIO-SARABIA. D., GARCÍA-PRIETO. L., LAMOTHE-ARGUMEDO. R., BERTONI, R. F. & OCEGUERA, F. A. 2005.

New host records of the nematode *Gnathostoma* sp. in Mexico. *Parasitology International* 54 (1): 51-53.

LEIDY, J. 1858

Cheiracanthus socialis in the stomach of mink (*Mustela vison*). *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 2, 25(4)

MARSHALL, L. G., CASE, J. A. & WOODBURNE. 1990.

- Phylogenetic relationships of the families of marsupials. Chapter 10. En: Current Mammalogy. Volume 2. Hugh H. Genoways. Plenum pres. New Cork: 198 p
- MARTINEZ-SALAZAR, E. & LEÓN-RÉGAGNON, V 2005.**
Confirmation of *G. binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991, advanced third-stage Larvae in Tres Palos Lagoon, Mexico, by morphological and molecular data. Journal of Parasitology 91(4): 962-965.
- MIYAZAKI, I. 1960.**
On the genus *Gnathostoma* and gnathostomiasis, with special reference to Japan. Progress of Medical Parasitology in Japan. Experimental Parasitology 9(3):338-370.
- MIYAZAKI, I. 1991.**
An illustrated book of helminthic zoonoses. International Medical Foundation of Japan. Fukuoka, Japón. 494 p.
- NADLER, S.A. 1992.**
Phylogeny of some ascaridoid nematodes, inferred from comparison of 18S and 28S sequences. Molecular Biology and Evolution 9 (5):932-944.
- OLLAGUE, W. 1985.**
Paniculitis nodular migratoria eosinofilica. Nueva enfermedad de Ecuador y América del Sur. Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social. 84p.
- RUIZ, J. M. 1952.**
Sobre um novo *Gnathostoma* assinalado no Brasil (Nematodo: Gnathostomatidae). Memorias do Instituto Butantan 24 (1): 37-44.
- SCHUH, R. T. 2000.**
Biological Systematics. Principles and Applications. Ithaca, New York. Cornell University Press. 215p.
- SMITH, E. & GUTBERLET, L. 2001.**
Generalized Frequency Coding: A Method of Preparing Polymorphic Multistate Characters for Phylogenetic Analysis. Systematic Biology 50 (2): 156-169.
- SWOFFORD, D. L. 2002.**
PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods) version 4.0b 10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

THOMPSON, J. D., HIGGINS. P.G & GIBSON, J.J. 1994.

Clustal W: improving sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weithing, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Researchs* 22: 4673-4680.

TRAVASSOS, L. P. 1923.

Contribuções para o conhecimento da fauna helmintologica brasileira. XVIII. Sobre as especies brasileiras do genero *Gnathostoma* Owen, 1836. *Scientia Medica*, Anno III, No 7: 1-12

WANG. X, MCKENNA M.C. & DASHZEVEG D. 2005.

Amphicticeps and *Amphicynodon* (Arctoidea, Carnivora) from Hsand Gol formation, Central Mongolia and phylogeny of Basal Arctoids with comments on zoogeography. *American Museum Novitates*. New York No. 3483. 57 pp

WANG, X., QIU, Z. & WANG, B. 2004

A new leotarctine (Carnivora: Mustelidae) from early Miocene of the Northern Tibetan Plateau: implications for the phylogeny and zoogeography basal mustelids.

WIENS, J. 1995.

Polymorphic characters in phylogenetic systematics. *Systematic Biology* 44 (2): 482-500.

WILEY, E. 1981

Phylogenetics: The theory and practice of the phylogenetics systematics. John Wiley. New York: 456 p

Apéndice 1. Ejemplares revisados de la colecciones USNPC y HWML

COLECCIÓN	NUMERO DE CAT.	NOMBRE DE REGISTRO	EN ESTE TRABAJO
HWML	23656	<i>G. procyonis</i>	<i>G. procyonis</i>
HWML	23916	<i>G. spinigerum</i>	<i>G. procyonis</i>
HWML	23917	<i>G. spinigerum</i>	<i>G. procyonis</i>
HWML	23925	<i>G. spinigerum</i>	<i>G. procyonis</i>
HWML	23931	<i>G. spinigerum</i>	<i>G. procyonis</i>
HWML	23943	<i>G. spinigerum</i>	<i>G. procyonis</i>
HWML	23963	<i>G. spinigerum</i>	<i>G. procyonis</i>
HWML	23970	<i>G. spinigerum</i>	<i>G. procyonis</i>
HWML	23983	<i>G. spinigerum</i>	<i>G. procyonis</i>
HWML	23984	<i>G. spinigerum</i>	<i>G. procyonis</i>
HWML	24012	<i>G. spinigerum</i>	<i>G. procyonis</i>
HWML	24019	<i>G. spinigerum</i>	<i>G. procyonis</i>
HWML	24029	<i>G. spinigerum</i>	<i>G. procyonis</i>
HWML	24033	<i>G. spinigerum</i>	<i>G. procyonis</i>
HWML	24038	<i>G. spinigerum</i>	<i>G. procyonis</i>
HWML	24049	<i>G. spinigerum</i>	<i>G. procyonis</i>
HWML	24052	<i>G. spinigerum</i>	<i>G. procyonis</i>
HWML	24056	<i>G. spinigerum</i>	<i>G. procyonis</i>
HWML	24063	<i>G. spinigerum</i>	<i>G. procyonis</i>
HWML	24074	<i>Gnathostoma</i> sp.	<i>G. procyonis</i>
HWML	24213	<i>Gnathostoma</i> sp.	<i>G. procyonis</i>
HWML	24224	<i>Gnathostoma</i> sp.	<i>G. procyonis</i>
HWML	24238	<i>Gnathostoma</i> sp.	<i>G. procyonis</i>
HWML	24250	<i>Gnathostoma</i> sp.	<i>G. procyonis</i>
HWML	24272	<i>Gnathostoma</i> sp.	<i>G. procyonis</i>
HWML	24294	<i>Gnathostoma</i> sp.	<i>G. procyonis</i>
HWML	24306	<i>Gnathostoma</i> sp.	<i>G. procyonis</i>
HWML	24312	<i>Gnathostoma</i> sp.	<i>G. procyonis</i>
HWML	24467	<i>Gnathostoma</i> sp.	<i>G. procyonis</i>
HWML	24502	<i>G. procyonis</i>	<i>G. procyonis</i>
HWML	24524	<i>G. spinigerum</i>	<i>G. procyonis</i>
HWML	24676	<i>Gnathostoma</i> sp.	<i>G. procyonis</i>
USNPC	8552	<i>G. didelphis</i>	<i>G. turgidum</i>
USNPC	17856	<i>G. spinigerum</i>	<i>G. spinigerum</i>
USNPC	25636	<i>G. spinigerum</i>	<i>G. spinigerum</i>
USNPC	25654	<i>G. hispidum</i>	<i>G. hispidum</i>
USNPC	25655	<i>G. spinigerum</i>	<i>G. spinigerum</i>
USNPC	30164	<i>G. doloresi</i>	<i>G. doloresi</i>
USNPC	31106	<i>G. procyonis</i>	<i>G. procyonis</i>
USNPC	31234	<i>Gnathostoma</i> sp.	<i>G. procyonis</i>
USNPC	31248	<i>Gnathostoma</i> sp.	<i>G. procyonis</i>
USNPC	35519	<i>Gnathostoma</i> sp.	<i>Gnathostoma</i> sp.
USNPC	40574	<i>Gnathostoma</i> sp.	<i>G. socialis</i>
USNPC	44710	<i>G. didelphis</i>	<i>G. turgidum</i>
USNPC	44714	<i>Gnathostoma</i> sp.	<i>G. socialis</i>
USNPC	47048	<i>G. navali</i>	<i>G. socialis</i>
USNPC	47717	<i>Gnathostoma</i> sp.	<i>G. socialis</i>
USNPC	49112	<i>G. spinigerum</i>	<i>G. socialis</i>
USNPC	50699	<i>G. spinigerum</i>	<i>G. spinigerum</i>
USNPC	52111	<i>G. spinigerum</i>	<i>G. spinigerum</i>

USNPC	56641	<i>G. procyonis</i>	<i>G. procyonis</i>
USNPC	56832	<i>G. procyonis</i>	<i>G. procyonis</i>
USNPC	58535	<i>G. oligomucronatum</i>	<i>G. turgidum</i>
USNPC	67529	<i>G. hispidum</i>	<i>G. hispidum</i>
USNPC	67786	<i>G. hispidum</i>	<i>G. hispidum</i>
USNPC	74372	<i>G. miyazakii</i>	<i>G. miyazakii</i>
USNPC	77171	<i>G. didelphis</i>	<i>G. turgidum</i>
USNPC	84150	<i>G. miyazakii</i>	<i>G. miyazakii</i>
USNPC	88148	<i>G. oligomucronatum</i>	<i>G. turgidum</i>
USNPC	88151	<i>G. neoprocyonis</i>	<i>G. lamothel</i>
USNPC	88152	<i>G. binucleatum</i>	<i>G. binucleatum</i>

Apéndice 2. Matrices utilizadas en el análisis morfológico y con el método GFC.

Matriz de caracteres binarios y multiestado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
<i>G. spinigerum</i>	0	1	1	1	4	1	1	0	1	1	3	3	3	3	4	1	3
<i>G. hispidum</i>	0	1	1	1	4	1	2	1	2	3	2	3	3	5	3	5	3
<i>G. doloresi</i>	1	1	2	1	2	1	2	1	3	3	1	4	1	5	1	4	3
<i>G. nipponicum</i>	0	2	1	1	2	1	1	0	2	2	2	3	2	4	2	4	1
<i>G. malaysiae</i>	1	1	2	2	?	1	1	1	4	1	3	3	3	3	3	3	?
<i>G. vietnamicum</i>	1	1	1	1	4	1	1	1	3	1	5	1	5	1	3	1	3
<i>G. americanum</i>	0	1	2	2	3	1	1	1	3	1	4	1	4	1	4	1	3
<i>G. binucleatum</i>	0	1	1	0	4	2	1	0	1	3	4	1	4	1	4	1	3
<i>G. lamothei</i>	2	3	1	2	3	1	1	0	3	1	3	3	3	4	3	4	2
<i>G. procyonis</i>	2	2	1	2	3	1	1	1	1	1	3	4	3	4	3	4	2
<i>G. turgidum</i>	0	2	2	2	3	1	1	1	3	1	3	1	5	1	5	1	3
<i>G. mlyazakii</i>	0	1	1	2	3	2	3	1	1	1	1	1	3	1	6	1	4
<i>G. socialis</i>	0	2	1	2	3	1	1	1	2	3	2	3	2	4	2	4	4
<i>Echinocephalus</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Spyroxis</i>	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Matriz "a" de caracteres binarios, multiestado y polimorficos.

	uno	dos	tres	cuatro	cinco	seis	siete	ocho	nueve	diez	
	once	doce	trece	catorce	quince	dieciseis	diecisiete	dieciocho	diecinueve	veinte	
Aunop	Adosp	Atresp	Acuatrop	Acincop	Aseisp	Bunap	Bdiezp	Boncep	Bdocep	Bdiezp	Bunap
	Asietep	Aochop	Anueve	Adiezp	Aoncep	Bunap	Bdiezp	Boncep	Bdocep	Bdiezp	Bunap
	Bdosp	Btresp	Bcuatrop	Bcincop	Bseisp	Bsietep	Bdiezp	Boncep	Bdocep	Bdiezp	Bunap
	Bochop	Bnuevep	Bdiezp	Boncep	Bdocep	Cunap	Cdiezp	Concep	Cdocep	Cdiezp	Cunap
	Cdosp	Ctresp	Ccuatrop	Ccincop	Cseisp	Csietep	Cdiezp	Concep	Cdocep	Cdiezp	Cunap
	Cochop	Cnuevep	Cdiezp	Concep	Cdocep	Dunap	Ddiezp	Doncep	Ddocep	Ddiezp	Dunap
	Ddosp	Dtresp	Dcuatrop	Dcincop	Dseisp	Dsietep	Ddiezp	Doncep	Ddocep	Ddiezp	Dunap
	Dochop	Dnuevep	Ddiezp	Doncep	Ddocep	Ddiezp	Ddiezp	Doncep	Ddocep	Ddiezp	Dunap
spinigerum	0	1	1	1	4	1	1	0	1	1	3
3	3	3	4	1	3	0	3	23	4	0	0
0	0	0	0	0	0	3	23	4	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	1	29	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
spinigerum	0	1	1	1	4	1	1	0	1	1	3
3	3	3	4	1	3	0	0	25	5	0	0
0	0	0	0	0	0	0	25	5	0	0	0
0	0	0	0	0	0	5	25	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	2	28	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
spinigerum	0	1	1	1	4	1	1	0	1	1	3
3	3	3	4	1	3	0	3	15	12	0	0
0	0	0	0	0	0	3	15	12	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
spinigerum	0	1	1	1	4	1	1	0	1	1	3
3	3	3	4	1	3	0	14	13	3	0	0
0	0	0	0	0	0	14	13	3	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
spinigerum	0	1	1	1	4	1	1	0	1	1	3
3	3	3	4	1	3	0	0	8	18	0	0
0	0	0	0	0	0	0	8	18	4	0	0
0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	6	24	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hispidum	0	1	1	1	4	1	2	1	2	3	2
3	3	5	3	5	3	0	0	0	0	0	14
10	6	0	0	0	0	0	27	3	0	0	0
0	0	0	0	0	0	1	29	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
doloresi	1	1	2	1	2	1	2	1	3	3	1
4	1	5	1	4	3	0	0	20	10	0	0
0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
doloresi	1	1	2	1	2	1	2	1	3	3	1
4	1	5	1	4	3	0	0	23	4	3	0
0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0

0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0
0	0	0	0								
nipponicum	0	2	1	1	2	1	1	0	2	2	2
3	2	4	2	4	1	0	0	7	15	8	0
0	0	0	0	0	0	0	7	16	7	0	0
0	0	0	0	0	0	0	20	8	2	0	0
0	0	0	0	0	0	0	23	7	0	0	0
0	0	0	0								
malaysiae	1	1	2	2	?	1	1	1	4	1	3
3	3	3	3	3	?	8	9	13	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	27	3	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	12	18	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	18	12	0	0
0	0	0	0								
vietnamicum	1	1	1	1	4	1	1	1	3	1	5
1	5	1	3	1	3	0	0	8	15	7	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	12
9	0	0	0	0	0	0	0	0	6	6	6
6	6	0	0	0	0	0	0	14	16	0	0
0	0	0	0								
americanum	0	1	2	2	3	1	1	1	3	1	4
1	4	1	4	1	3	0	0	30	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	14	16	0	0	0
0	0	0	0	0	0	26	4	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	27	3	0	0	0	0
0	0	0	0								
binucleatum	0	1	1	0	4	2	1	0	1	3	4
1	4	1	4	1	3	3	20	5	2	0	0
0	0	0	0	0	4	9	17	0	0	0	0
0	0	0	0	0	11	19	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	27	3	0	0	0	0	0
0	0	0	0								
binucleatum	0	1	1	0	4	2	1	0	1	3	4
1	4	1	4	1	3	0	22	8	0	0	0
0	0	0	0	0	2	13	15	0	0	0	0
0	0	0	0	0	6	23	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	25	5	0	0	0	0	0
0	0	0	0								
lamothei	2	3	1	2	3	1	1	0	3	1	3
3	3	4	3	4	2	0	0	3	1	26	0
0	0	0	0	0	0	0	0	9	15	5	1
0	0	0	0	0	0	0	12	18	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	27	1	2	0	0
0	0	0	0								
lamothei	2	3	1	2	3	1	1	0	3	1	3
3	3	4	3	4	2	1	2	16	11	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	1	12	17	0
0	0	0	0	0	0	0	9	14	6	1	0
0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0
0	0	0	0								
procyonis	2	2	1	2	3	1	1	1	1	1	3
4	3	4	3	4	2	0	0	7	14	9	0
0	0	0	0	0	0	0	0	6	23	1	0
0	0	0	0	0	0	0	22	6	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0
0	0	0	0								

procyonis	2	2	1	2	3	1	1	1	1	1	3
4	3	4	3	4	2	0	1	24	5	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	4	17	9	0
0	0	0	0	0	0	0	26	4	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0
0	0	0	0								
procyonis	2	2	1	2	3	1	1	1	1	1	3
4	3	4	3	4	2	0	0	7	10	13	0
0	0	0	0	0	0	0	3	8	19	0	0
0	0	0	0	0	0	0	25	1	4	0	0
0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0
0	0	0	0								
turgidum	0	2	2	2	3	1	1	1	3	1	3
1	5	1	5	1	3	0	0	0	0	1	9
11	4	5	0	0	0	0	0	0	0	0	3
13	5	6	3	0	0	0	0	0	0	2	6
12	8	1	1	1	0	0	0	0	0	2	4
7	14	2	1								
turgidum	0	2	2	2	3	1	1	1	3	1	3
1	5	1	5	1	3	0	0	0	0	3	8
8	6	5	0	0	0	0	0	0	0	1	6
8	7	4	2	2	0	0	0	0	0	2	8
10	6	2	2	0	0	0	0	0	0	2	4
7	14	2	1								
turgidum	0	2	2	2	3	1	1	1	3	1	3
1	5	1	5	1	3	0	0	0	0	4	6
8	4	4	2	2	0	0	0	0	0	1	6
8	7	4	2	2	0	0	0	0	3	4	12
9	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3
11	10	3	1								
turgidum	0	2	2	2	3	1	1	1	3	1	3
1	5	1	5	1	3	0	0	0	0	10	6
8	3	3	0	0	0	0	0	0	4	5	4
5	5	4	3	0	0	0	0	0	3	4	12
9	2	0	0	0	0	0	0	0	0	4	12
10	6	0	0								
miyazakii	0	1	1	2	3	2	3	1	1	1	1
1	3	1	6	1	4	0	3	17	6	4	0
0	0	0	0	0	0	0	1	12	16	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	8	10	6	6
0	0	0	0	0	0	0	0	8	12	8	2
0	0	0	0								
miyazakii	0	1	1	2	3	2	3	1	1	1	1
1	3	1	6	1	4	0	1	17	6	6	0
0	0	0	0	0	0	0	0	13	15	2	0
0	0	0	0	0	0	0	1	6	11	7	5
0	0	0	0	0	0	0	3	11	11	5	0
0	0	0	0								
socialis	0	2	1	?	3	1	1	1	2	3	2
3	2	4	2	4	4	0	0	27	3	0	0
0	0	0	0	0	0	0	2	26	2	0	0
0	0	0	0	0	0	0	16	14	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	26	4	0	0	0
0	0	0	0								
Echinocephalus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Spiroxys	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Matriz "C" obtenida a partir del programa "GFC fastmorfology" analizada en PAUP.

>Echinocephalus

yaayaayaayaayaaaayaayaayayaaaayaayaayaaaayaayaayaaaayaayaayaaaay
aaaayaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaayaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaa yaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa yaaaaaa yaaaaa
yaayaayaayaayaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaa yaaaaaa yaaa yaa yaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaa yaa yaa ya yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaa yaaa ya
aa aaa aa aa aaaa aa aaa a aaaa aaa aaaaa aaaa aaaaa aaaaa aaaaa aaaaa
aaaa
aaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaa
aaaaaa aaaaa aa aa aaaa aaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaa aaaaaaa aaaaaa aa aa aaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaa aaaaaaa aaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaa aaaaaaa aa aa a
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaa
aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaa aaa a

>Spiroxys

yaa yaaa yaa yaa yaaaa yaa yaaa ya yaaaa yaaa yaaaa yaaaa yaaaa
yaaaa
yaaaaaa yaaaaaa yaaaa yaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaa yaaaa
yaa
yaa yaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaa yaaaaaa yaaa yaa yaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaa yaa yaa ya yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaa yaaa ya
aa aaa aa aa aaaa aa aaa a aaaa aaa aaaaa aaaa aaaaa aaaaa aaaaa aaaaa
aaaa
aaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaa

aaaaaa aaaaa aa aa aaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaa aaaaaaa aaa aa aaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaa aaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaa aa aa a
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaa
aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaa aaa a

>americanum

yaa ayaa aay aay aaaya aya ayaa ay aaaya ayaa aaaya ayaaa aaaya
ayaaaa
aaaayaa ayaaaa aaaya yaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaay yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa yaaaaaa yaaaa
yaa
yaa yaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaayaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaayaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa yaaaaaaa yaaaaaa yaaa yaa yaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaay aaaayaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaa yaa yaa ya yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaay aaayaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaa yaaa ya
aa yaa yy yy yyya ya yaa y yyya yaa yyya yaaa yyya yaaaa yyyaa yaaaa
yyya
aaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyy
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaa
aaaaaa aaaaa aa aa aaaa aaaaaaaaaaaaaa yyyyyyyyyyyyyyaaaaaaaaaaaaaa
yyyyyyyyyyyyyyyyyaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaa aaaaaaa aaa aa aaaaaaaaaaaaa
yyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyy yyyyaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaa aaaaaaa aaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaa aaaaaaaa aa aa a
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyy
yyyaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaa
aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaa aaa a

>binucleatum

yaa ayaa aya yaa aaay aay ayaa ya ayaaa aaay aaaya ayaaa aaaya
ayaaaa
aaaayaa ayaaaa aaaya maamaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaamam
aaaaamaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa maamaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa yaaaaaa yaaaa
yaa
yaa amam aaaaaaaaaamaama aaaaaaaaaaaaaamamaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa yaaaaaaa yaaa yaa aaaaaamaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaamaamaa mmaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa

yaaaaaaaa yaa yaa ya aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaamam
aaamaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaa yaaa ya

aa yaa ya aa yyyy yy yaa a yaaa yyy yyyya yaaa yyyya yaaaa yyyaa yaaaa
yyya
mmmaaaaa yyyyyyyyyyyyyyyyyyyymm yyyyymmmaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
mmaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaa
aaaaaa aaaaa aa aa yymm yyyyyyyymmma yyyyyyyyyyyyyyyymmaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaa aaaaaaa aaaaaaa aaa aa yyyyyymmmmm
yyyyyyyyyyyyyyyyyyyyymmmaaa maaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaa aaaaaaa aaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaa aaaaaaa aa aa a
yyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyymm yymmaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaa
aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaa aaa a

>doloresi

aya ayaa aay aya aayaa aya aaya ay aaaya aaay ayaaaa aaaaay ayaaaa
aaaaay
ayaaaa aaaaaya aaaya yaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaamaaaaaaaaa aaaaamaaaaamaaaaaaa
maaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaa yaaaaa yaaaa
yaa
yaa yaaaa yaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaay
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaa yaaa yaa yaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaay
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaa yaaa ya
ya yaa yy ya yyaa ya yya y yyya yyy yaaaa yyy yaaaa yyyyy yaaaa yyyya
yyya
aaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yyyyyyyyyyyyyyyyyyyymmmaaaaaaa
yyyyymmmmmmaaaaaaa mmaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaa
aaaaaa aaaaa aa aa aaaa aaaaaaaaaaaaa yyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyy
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaa aaaaaaa aaaaaaa aaa aa aaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyy
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaa aaaaaaa aaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaa aaaaaaa aa aa a
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyy aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaa
aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaa aaa a

>hispidum

yaa ayaa aya aya aaaay aya aaya ay aayaa aaay aayaaa aaaya aaayaa
aaaaay
aaayaaa aaaaay aaaya yaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaay aaaaaaaaaaya aaaaay yaaaaa
yaa
yaa yaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaayaaa
aaayaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaa yaaaaa yaa yaa yaaaaaaaaaaaa
ayaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaya
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaa yaa yaa ya yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaay
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaa yaaa ya

aa yaa ya ya yyyu ya yya y yyaa yyy yyaaa yyya yyyaa yyyyy yyyaaa yyyyy
yyu
aaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yyyyyyyyyyyyyy
yyyyyyyyyya
yyyyyy aaaaa aa aa aaaa aaaaaaaaaaaaaa yyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyaaa
yyuaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaa aaaaaa aaa aa aaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyya
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaa aaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaa aa aa a
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyy aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaa
aaaaaaa
aaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaa a

>lamothei

aaay aaay aya aay aaaya aya ayaa ya aaaya ayaa aaayaa aaaya aaayaa
aaaaya
aaayaaa aaaaaya aayaa mmaaaaaaa mmaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaamaaaaaaaaaaaaaamaaaaaaaaaaaaaa amaaaaaaaaaamaaaaaa
maaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaam yaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa yaaaaaa yaaaaa
yaa
yaa yaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
amaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaamaaaaaaaaaaaaa aaaaamaaaaaaaaaaam
mmaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaa yaaaaa yaa yaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaamaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaamaam maamaaaaaa mmaaaaaa yaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaa yaa yaa ya yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaamaam
mmaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa mmaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaa yaaa ya

yy yyy ya yy yyu ya yaa a yyu yaa yyyaa yyu yyyaa yyyyy yyyaaa yyyu
yya
maaaaaaa mmaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yyummmmmmmmmmmmaaaaaaaaaaaaa
ymmmmmmmmmmaaaaaa mmmmmmmmmmmmmmmmmmmmmmmmmmmmmmm aaaaaaaaaaaaa

aaaaaaaaaa
aaaaaa aaaaa aa aa aaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
ymmmmmmmmmmaaaaaaaaaaaaaaaaaa yyyyyyyyyyyymmmmaaaaaaa yyyyymmmmmmmmmmmmmm
maaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaa aaaaaa aaa aa aaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yyyyyyyyyymmmmaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yyyyyyyyyyyyyyyyymmmmm
mmmmmmmaaaaaa maaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaa aa aa a
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyymmm maaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa mmaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaa a

>malaysiae

aya ayaa aay aay ????? aya ayaa ay aaaa ayaa aaayaa aaaya aaayaa
aaayaa
aaayaaa aaayaa ????? aaaaaaaay aaaaaaaayaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaayaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa yaaaaa yaaaa
yaa
yaa yaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaayaaa
aaayaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaa yaaaaaa yaaa yaa yaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaayaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaay yaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaa yaa yaa ya yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaay aaaaaaaaaaaaaayaaaa yaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaa ya
ya yaa yy yy ???? ya yaa y yyy yaa yyyaa yyya yyyaa yyyaa yyyaaa yyyaa
???

yyyyyyyy yyyyyyyyyyaaaaaaaaaaaaa yyyyyyyyyyyyyyaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaa
aaaaaa aaaaa aa aa aaaa aaaaaaaaaaaaaa yyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyaaa
yyyaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaa aaaaaa aaa aa aaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yyyyyyyyyyyyyyaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyy
aaaaaaaaaaaa aaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaa aa aa a
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yyyyyyyyyyyyyyyyyyy yyyyyyyyyyyaaa
aaaaaaa
aaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaa a

>miyazakii

yaa ayaa aya aay aaaya aay aay ay ayaaa ayaa ayaaaa ayaaa aaayaa
ayaaa
aaaaay ayaaaa aaaa yaaaaaaaa ammaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaayaaaaaaaaaaaaa aaaaayaaaaaaaaaaaaa
aaammaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa yaaaaaa yaaaaa
yaa
yaa yaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaa mmaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaammaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaammaaaaaa ammaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaa yaaaaa yaa yaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa mmaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaamm aaaaamm aaaaammaaaaaa yaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaa yaa yaa ya yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa maamaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaamaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaammaaaaa aaaaamaam mamaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaa yaaa ya
aa yaa ya YY YYYa YY YYY y yaaa yaa yaaa yaaa yyyaa yaaa yyyyyy yaaa
yyyy
aaaaaaaa ymmaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa YYYYYYYYYYYYYYYYYYyaaaaaaaaaaaaa
YYYYYYyaaaaaaaaaaaaa yyyymmaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaa
aaaaaa aaaaa aa aa aaaa aaaaaaaaaaaaaa maaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
YYYYYYYYYYYYYmaaaaaaaaaaaaaa YYYYYYYYYYYYYYmaaaaaa ymaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaa aaaaaa aaa aa aaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa maaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yyyyyyymmaaaaaaaaaa
YYYYYYYYYYym yyyyyym yyyyymaaaaaa aaaaaaaaaaaaa aaaaaaa aa aa a
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
mummaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yyyyyyyymmaaaaaa yyyyyyyymmaaaa
yyyyymmm
mmaaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaa a

>nipponicum

yaa aaya aya aya aayaa aya ayaa ya aayaa aaya aayaaa aaaya aayaaa
aaaaya
aayaaa aaaaya ayaaa yaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaayaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaayaaa
aaaaaaaaayaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa yaaaaa yaaaa
yaa
yaa yaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaayaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaayaaaaaaaaaaaaa aaaaaayaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaa yaaaaaa yaa yaa yaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaayaaaaaaaa
aaaaaaaaayaaaaaaaaaaaaa ayaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaa yaa yaa ya yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaayaaaaaaaa
aaaaaaaaayaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaa yaaa ya
aa yya ya ya yyaa ya yaa a yyaa yya yyaaa yyya yyaaa yyyya yyaaa yyyya
yaaa
aaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yyyyyyaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
YYYYYYYYYYYYYYyaaa YYYYYYYyaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaa
aaaaaa aaaaa aa aa aaaa aaaaaaaaaaaaaa yyyyyyaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
YYYYYYYYYYYYYYYYYYyaaaaaaaaaaaa YYYYYYyaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaa aaaaaa aaa aa aaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa YYYYYYYYYYYYYYYYYYyaaaaaaaaaaaa
yyyyyyyaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaa aaaaaa aaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaa aaaaaaa aa aa a
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
YYYYYYYYYYYYYYYYYYYYyaaaaaaaa yyyyyyaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaa

>procyonis

aay aaya aya aay aaaya aya ayaa ay ayaaa ayaa aaayaa aaaay aaayaa
aaaaya
aaayaaa aaaaya aayaa yaaaaaaaaa qiaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaa qaaaaaaaaaaaaaaaaaiaaaaaa aaaaaiaaaaaiaaaaaa
iaaaaaaaaaiaaaaaiaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaa yaaaaaa yaaaaa
yaa
yaa yaaaa yaaaaaaaaaaaaaaa qaiaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaiaiaiaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaiaiaaaai iaaaaaaaaaiaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaa yaaaaaa yaaa yaa yaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaiaaiiaaaa
aiaaiaiaaaaaaaaaaaaaa qaaiiaaaaaaaa yaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaa yaa yaa ya yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaay
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaa yaaa ya

yy yya ya yy yyya ya yaa y yaaa yaa yyyaa yyyu yyyaa yyyua yyyaaa yyyya
yyaa
aaaaaaaaa iaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yyyyyyyiiiiiiiiiiiiiiiiiaaaaaa
yyyyyyqqqqqiiiiiaaaa qqqqqqqqiiiiiaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaa
aaaaaa aaaaa aa aa aaaa aaaaaaaaaaaaaa iiaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yyyyyqqliaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yyyyyyyyyyyyyyyyyyyqqiiii qiiiiiiiaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaa aaaaaa aaa aa aaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yyyyyyyyyyyyyyyyyyyqqqiaaaa
yqqqiaaaaaaaaaaaaaa
iiiiiaaaaaaa aaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaa aa aa a
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyy aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaa a

>socialis

yaa aaya aya ??? aaaya aya ayaa ay aayaa aaay aayaaa aaaya aayaaa
aaaaya
aaayaaa aaaaya aaay yaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaayaa aaayaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaa yaaaaaa yaaaaa
yaa
yaa yaaaa yaaaaaaaaaaaaaaa aayaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaay aayaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaa yaaaaaa yaaa yaa yaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaayaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaayaaaa yaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaa yaa yaa ya yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaayaaaa
aaaayaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaa yaaa ya

aa yya ya ?? yyya ya yaa y yyaa yyy yyyaa yyya yyyaa yyyua yyyaaa yyyya
yyu
aaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyyaa
yyuaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaa

aaaaaa aaaaa aa aa aaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
YYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYY yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaa aaaaaa aa aa aaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa YYYYYYYYYYYYYYYYYYaaaaaaaaaaaaa
YYYYYYYYYYYYYYYYYaaaa
aaaaaaaaaaaaa aaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaa aa aa a
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
YYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYaaaa yyyyaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaa a

>spinigerum

yaa ayaa aya aya aaaay aya ayaa ya ayaaa ayaa aaayaa aaaya aaayaa
aaayaa
aaaayaa ayaaaa aaaya yaaaaaaaa kaakaaaaaaaaafaaaaaaaa
aaaaaaaaafaaaafafaaaaaaafafaaaaa aaafffaaaaaafaaaaf
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaa yaaaaa yaaaa
yaa
yaa yaaaa kaakaaaaaaaaaf aaaaaaaaaafaaaafafaaaaaaafafaaaaa
aaafffaaaaaafaaaafafaaaaaa uaaafaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaa yaaaaaa yaaaaa yaaa yaa yaaaaaaaaaaaa
uaaaafaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaafaaaau
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa yaaaaaa yaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaa yaa yaa ya yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
kfaaaafaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaafaaaffk
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaa yaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaa yaaa ya

aa yaa ya ya yyyu ya yaa a yaaa yaa yyyaa yyya yyyaa yyyaa yyyaa yaaaa
yyya
aaaaaaaa pppeeeeeeeeeeeeeaaaaaa yyyyyyyuuuuuppkkkkkkkffaaaa
yyupkkkkkkkkfffff aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaa
aaaaaa aaaaa aa aa aaaa pppeeeeeeeee yyyyyyyuuuuuppkkkkkkkffaaaa
yyupkkkkkkkkfffffaaaaaaa eeeeeeeeeeeeeeeeeeeee aaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaa aaaaaa aaa aa aaaaaaaaaaa
eeeeeeeeeeeeeeeeeeeeaaaaaa YYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYuuuuu
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaa aaaaaaa aaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaa aaaaaaa aa aa a
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa pkeeeeeeeeeeeeeeeeeeeee
YYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYuuupk aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaa
aaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaa aaa a

>turgidum

yaa aaya aay aay aaaya aya ayaa ay aaaya ayaa aaayaa ayaaa aaaaay
ayaaa
aaaaya ayaaaa aaaya yaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
agaggaagaaagaaaaaaaaaaaaa aaaaamaggaaaaa aaaaaaasaag aaagmag aaaggm
sag
sag yaaaa yaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa saaagaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa gmaagaaaaaaaaaaaa

aaaggmaaaaaa aaaaagaamaaaaag aaaaamam aaaaasag aamm mam yaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa maamaaaaaaaaa aamamaaa aaaaaagagaaam aaaaaaaamgag
aamaaaagag mgg mgg sg yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aasagaaaa aaagmaaaaaaag
aaaaaaamaagg
aaaaaagaagaam gamg gs

aa yya yy yy yyya ya yaa y yyya yaa yyyaa yaaa yyyyy yaaaa yyyyya yaaa
yyya
aaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yssmggggggaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yyyyyymmgaaaaa
YYYYYYYYggg
YYysgg YYysm gg gg aaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa ggggaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa sggggaaaaaaaaaaaaa
YYysmmaaaaaa YYYYYSSSGGGG YYYYYmm yyygg ym mm aaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
mmmaaaaaaa yymnaaa yyyyyyssmmmm yyyyyyyymgg ymmmmgg mg mg g
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaa
yggaaaa
YYysggggggggg YYYYYYmmmg yyyyyysssmmm ssg s

>vietnamicum

aya ayaa aya aya aaaay aya ayaa ay aaaya ayaa aaaaay ayaaa aaaaay
ayaaa
aaayaaa ayaaaa aaaya yaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaayaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaayaaa
aaaaaaaaayaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaa yaaaaa yaaaa
yaa
yaa yaaaa yaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaayaaaaaa
aaaaaaaaaaaaay aaaaaaaayaaaa yaaaaaa yaaaaa yaa yaa yaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaayaaaa aaaaaaya aaaaayaaaaa aaaaayaaaaa
aaaaaaya yaa yaa ya yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaayaaaa aaaaaaaaaaaaaaaay yaaaaaaa yaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaa
yaaaaaaaaaaaaa yaaa ya
ya yaa ya ya yyy y yaa y yyya yaa yyyyy yaaa yyyyy yaaaa yyyaaa yaaa
yyya
aaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yyyyyyyyaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
YYYYYYYYYYYYYYyaaa yyyyyyaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaa
aaaaaa aaaaa aa aa aaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa yyyyyyyyaaaaaa
YYYYYYYYYYYYYY YYYYYYYyaaa aaaaaa aaaaaa aaa aa aaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
YYYYYYyaaaa YYYYYy yyyyyyaaaaa yyyyyyaaaaa yyyyyyaa aa aa a
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa YYYYYYYYYYYYYyaaa YYYYYYYYYYYYYY
aaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaa a

APENDICE 3. Técnicas de biología molecular

DIGESTIÓN DE TEJIDOS

1. Fragmentar el tejido y colocarlo en un tubo eppendorf de 1.5 ml
1. Adicionar al tubo 500 μ l de buffer STE, 20 μ l de proteinasa K (25 mg/ml) y 75 μ l de SDS al 10%.
2. Agitar perfectamente e incubar durante 12 horas a 55°C. Agitar ocasionalmente durante el periodo de incubación.

EXTRACCIÓN DE DNA CON MÉTODO FENOL/CLOROFORMO

Marcar tres tubos por muestra para este proceso

En la campana de extracción.

1. Agregar 600 ml de fenol al tubo que contiene el tejido digerido. Mezclar e incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Cada vez que se separen las fases debe mezclarse.
2. Centrifugar a 13,000 rpm por 5 minutos.
3. Remover cuidadosamente la primera fase (fase acuosa) con una micropipeta y transferir aun tubo eppendorf limpio (marcado previamente). Tener cuidado de no alterar la interfase.
4. Repetir pasos de 1-3.
5. Agregar 600 μ l de Cloroformo y mezclar suavemente e incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos. Mezclar cada vez que las fases se separen.
6. Centrifugar a 13.000 rpm por 3 minutos
7. Remover la fase acuosa y transferir a un tubo limpio con cuidado de no alterar la interfase.

Fuera de la campana

8. Agregar 1/10 del volumen de la muestra (aproximadamente 45 μ l) de 2M NaCl y 2.5 volúmenes de alcohol 96% frío (-20 °C).
9. Precipitar el DNA a -20 °C de 12 a 24 horas.
10. Secar totalmente el botón de DNA en una centrifuga al vacío. Resuspender en 50-100 μ l de agua ddH₂O (dependiendo el tamaño del tejido).

Técnica de PCR

Preparar una mezcla maestra con las siguientes proporciones.

Primer 1 [5pm]	1.0 μ l x (número de muestras + el control)
Primer 2 [5pm]	1.0 μ l x (número de muestras + el control)
Buffer	2.5 μ l x (número de muestras + el control)
dNTPs	25 μ l x (número de muestras + el control)
MgCl ₂	0.8 μ l x (número de muestras + el control)
Taq. Polimerasa	Dependiendo de la marca μ l x (numero de muestras + el control): 0.4 bioselec 0.2 Invitrogen 0.125 Biogenica

- Hacer una suma del volumen total de líquidos y dividirlo entre el número de muestras más el control y repartir en tubos de 0.2 ml (marcados previamente).
- Agregar a cada tubo (excepto el control):
- Templado de ADN 1.0 μ l (como mínimo, esto puede variar según la concentración de ADN).
- Completar el volumen de cada tubo a 25 μ l con ddH₂O y esterilizada. Llevar las muestras al Termociclador.

Purificación de Productos de PCR utilizando el Kit QIAquick PCR purification (QIAGEN).

1. Agregar 5 volúmenes de buffer PB (125 μ l) por un volumen de producto de PCR (25 μ l).
2. Mezclar en el vortex.
3. Colocar una columna QIAquick dentro de un tubo colector de 2 ml.
4. Aplicar la mezcla en el centro de la columna.
5. Centrifugar de 30 a 60 segundos a 13000 rpm.
6. Desechar el líquido del tubo colector.
7. Colocar la columna en el tubo colector.
8. Adicionar 750 μ l de Buffer PE en el centro de la columna.

9. Centrifugar de 30 a 60 segundos a 13000 rpm
10. Desechar el líquido del tubo colector
11. Colocar la columna en el tubo colector
12. Centrifugar nuevamente un minuto a 13000 rpm
13. Colocar la columna sobre un tubo eppendorf de 1.5 ml limpio y marcado
14. Adicionar de 30 a 50 μ l de buffer EB o agua bidestilada
15. Centrifugar a 13000 rpm durante un minuto.
16. Mantener el tubo con el producto purificado a -20°C .

CUANTIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN CON BYG DYE TERMINATOR

Ya cuantificados los productos.

Preparar en tubos de 0.2 ml la siguiente mezcla:

- | | |
|-----------------------|---|
| 1. Byg dye | 4 μ l |
| 2. Buffer 5x | 4 μ l |
| 3. Producto PCR | cantidad calculada en μ l |
| 4. Primer 10 pmol | 0.5 μ l |
| 5. ddH ₂ O | cantidad calculada en μ l para tener un volumen total de 20 μ l |

PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE LA REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN CON COLUMNAS CENTRISEP

1. Verificar que todo el polvo (cephadex) se encuentre en el fondo de la columna. Dar algunos golpes pequeños de no ser así.
2. Agregar 8 μ l de agua ddH₂O y tapar la columna, mezcla con el vórtex.
3. Dejar el gel hidratándose en la columna por dos horas a temperatura ambiente. Cuidar que no queden burbujas en el gel de ser así dar golpes a la columna hasta que la burbuja emerja.

Apéndice 4. Caracteres morfológicos elegidos para el análisis filogenético

Carácter 1. Forma del cuerpo



0= Cilíndrica



1= Ensanchada posteriormente

Carácter 2. Cobertura de espinas en el cuerpo



0= 0%



1= 80-100%



2= 50% con el resto de la cutícula lisa



3= 50% con el resto de la cutícula con ornamentaciones diferentes a espinas

Carácter 3. Forma del huevo



0= sin tapones polares



1= con un tapón polar

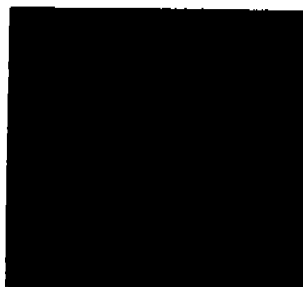


2= con dos tapones polares

Carácter 4. Textura de la cascara del huevo



0= lisa

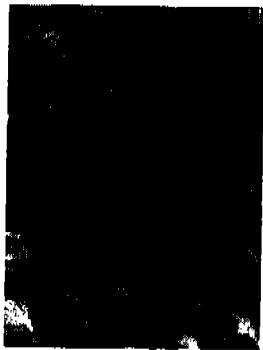


1= con excavaciones profundas



2= con excavaciones discretas

Carácter 5. Forma de los ganchos del bulbo cefálico



0= conicos simples



1= forma de gorro (base gruesa con punta grande y roma)

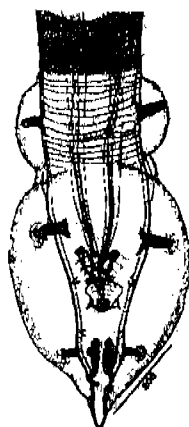


2= forma de garra



3= forma de espina de rosal (base gruesa con punta pequeña y aguda)

Carácter 6. Forma de la bursa del macho



0= bilobada



1= lobada simple



2= lobada con
apéndice distal

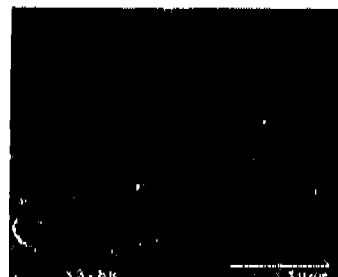
Carácter 7. Forma de las espinas en la bursa del macho el macho



0= cónicas

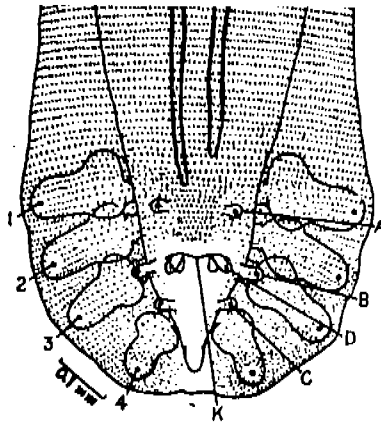


1= elongadas

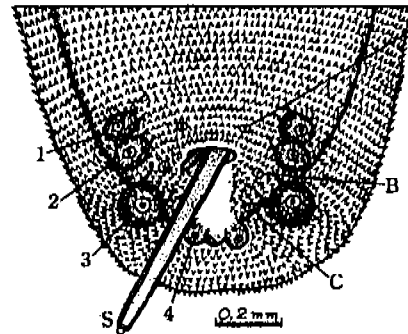


2= redondas

Carácter 8. Cambio en el tamaño de los cuatro pares de papilas pedunculadas en el macho

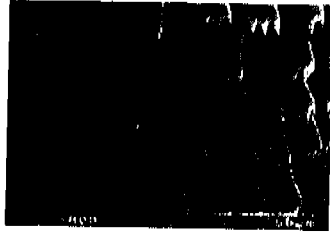


0= descendente

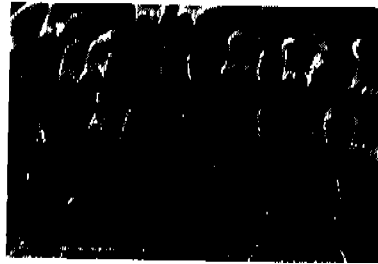


1= ascendente hasta el tercer par,
descendiendo en el cuarto.

Caracteres 10, 12, 14, 16. Tamaño de los dientes en las espinas



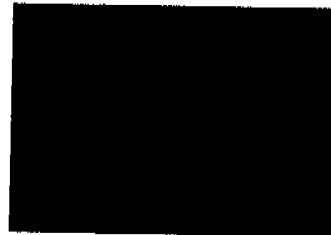
1= dientes aproximadamente iguales



2= dientes laterales mayores a los centrales

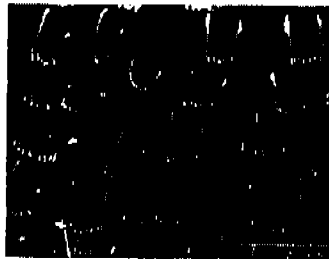


3= dientes centrales hasta una vez mayores a los laterales



4= dientes centrales hasta tres veces mayores a los laterales

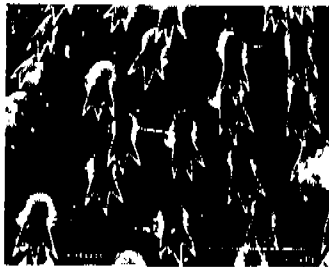
Caracteres 9, 11,13 y 15. Forma de las espinas



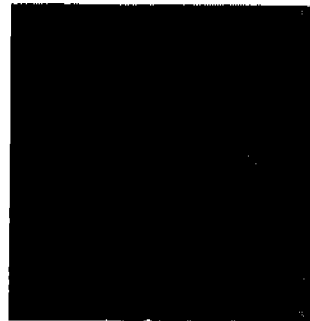
1= isométricas paralelas



2= isométricas divergentes con
constreñimiento prominente

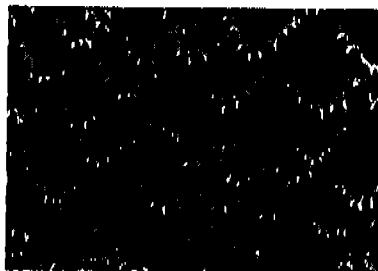


3= isométricas divergentes con
constreñimiento discreto

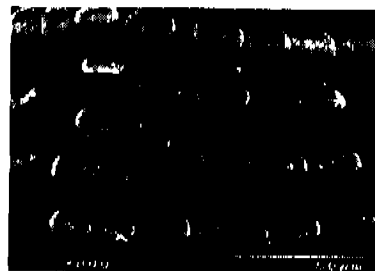


4= isométricas convergentes

Caracteres 13 y 15. Forma de las espinas

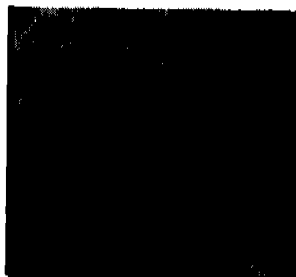


5= Isométricas con puntas en los bordes laterales



6= Isométricas bordes redondeados

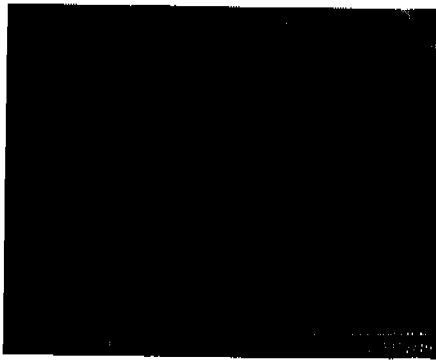
Caracteres 14 y 16. Tamaño de los dientes



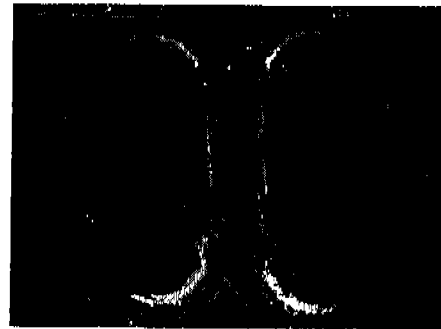
5= dientes centrales más de tres veces mayores a los laterales

Carácter 17. Forma de los labios

0= con tres lobulos aproximadamente iguales



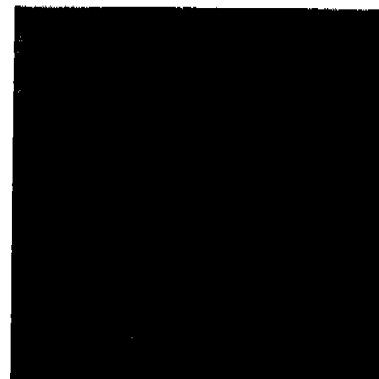
1= con tres lobulos con lóbulo central pequeño y laterales grandes



2= con tres lobulos con lóbulo central grande y laterales pequeños



3= con un lobulo con borde interno con tres lobulos



4= con un lobulo con borde interno liso

Apéndice 5. Alineamiento de secuencias del gen 28S de siete especies de *Gnathostoma* y *Spiroxys* sp.

.....
	5	15	25	35	45	
55						
Spiroxis, -----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Gspiniger, AAGCGGAGGA Gn14spini, -----	CGTAGACCTC	AACTCAGACG	TGATTACCCG	CTGAATTTAA	GCATATAACT	
Gturgidum, -----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Gbinuclea, AAGCGGAGGA Gn06binuc, -----	CGTAGACCTC	AACTCAGACG	TGATTACCCG	CTGAATTTAA	GCATATAACT	
Gn16binuc, -----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Gn21binuc, -----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Ghispidum, AAGCGGAGGA Gn42hispi, -----	-GTAGACCTC	AACTCAGACG	TGATTACCCG	CTGAATTTAA	GCATATAACT	
Gn37nipponi, -----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Gnnipponi, AAGCGGAGGA G43lamoth, -----	CGTAGACCTC	AACTCAGACG	TGATTACCCG	CTGAATTTAA	GCATATAACT	
Gdoloresi, AAGCGGAGGA Gn27dolor, -----	CGTAGACCTC	AACTCAGACG	TGATTACCCG	CTGAATTTAA	GCATATAACT	
.....
	65	75	85	95	105	
115						
Spiroxis, -----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Gspiniger, GCGCT Gn14spini, GCGCT	AAGTAAACTA	ACGAGGACTC	TCGTAGTAAC	GGCGAGTGAA	CGGAGATATG	TCCA-
Gturgidum, GCGCT	-----	-----	-----	-----GAA	CGGAGATATG	TCCA-
Gbinuclea, GCGCT Gn06binuc, GCGCT	AAGTAAACTA	ACGAGGACTC	TCGTAGTAAC	GGCGAGTGAA	CGGAGATATG	TCCA-
Gn16binuc, GCGCT	-----	-----	-----	-----GAA	CGGAGATATG	TCCA-

```

Gn21binuc, -----GAA CGGAGATATG TCCA-
GCGCT
Ghispidum, AAGTAAACTA ACGAGGACTC TCGTAGTAAC GGCGAGTGAA CGGAGATATG TCCA-
GCGCT
Gn42hispi, -----CTA ACCAGGACTC TCGTAGTAAC GGCGAGTGAA CGGAGATATG TCCA-
GCGCT
Gn37nippo, -----
-----
Gnnipponi, AAGTAAACTA ACGAGGACTC TCGTAGTAAC GGCGAGTGAA CGGAGATATG TCCA-
GCGCT
G43lamoth, -----A ACCAAGATTT CCCTAGAAAC GGGGACTGAA AGGAAGTATT
TCCAAGCGTT
Gdoloresi, AAGTAAACTA ACGAGGACTC TCGTAGTAAC GGCGAGTGAA CGGAGATGTG TCCA-
GCGCT
Gn27dolor, -----GAA CGGAGATGTG TCCA-
GCGCT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
125      135      145      155      165
175
Spiroxis, -----
-----
Gspiniger, GAATCCTGCA ACCGTCGGTT GTGTGGAGCT GTAGCGTATA GGTGCGGCTT
TCGGCATAAC
Gn14spini, GAATCCTGCA ACCGTCGGTT GTGTGGAGCT GTAGCGTATA GGTGCGGCTT
TCGGCATAAC
Gturgidum, GAATCCTGCA ACCGTCGGTT GTGTGGAGCT GTAGCGTATA GGTGCGGCTT
TCGGTGTACG
Gbinuclea, GAATCCTGCA ACCGTCGGTT GTGTGGAGCT GTAGCGTATA GGTGCGGCTT
TCGGCGTGCG
Gn06binuc, GAATCCTGCA ACCGTCGGTT GTGTGGAGCT GTAGCGTATA GGTGCGGCTT
TCGGCGTGCG
Gn16binuc, GAATCCTGCA ACCGTCGGTT GTGTGGAGCT GTAGCGTATA GGTGCGGCTT
TCGGCGTGCG
Gn21binuc, GAATCCTGCA ACCGTCGGTT GTGTGGAGCT GTAGCGTATA GGTGCGGCTT
TCGGCGTGCG
Ghispidum, GAATCCTGCA ACCGTCGGTT GTGTGGAGCT GTAGCGTATA GGTGCGGCTT
TCGGCGTACG
Gn42hispi, GAATCCTGCA ACCGTCGGTT GTGTGGAGCT GTAGCGTATA GGTGCGGCTT
TCGGCGTACG
Gn37nippo, -----
-TACG
Gnnipponi, GAATCCTGCA ACTGTCCGTT GTGTGGAGCT GTAGCGTATA GGTGCGACTT
TCGGCATAAC
G43lamoth, GAATCCTGCA ACCGTCGGTT GTGTGGAGCT GTAGCGTTTA GGTGCGGCTT
TCGGTGTACG
Gdoloresi, GAATCCTGCA ACCGTCGGTT GTGTGGAGCT GTAGCGTATA GGTGCGGCTT
TCGGCGTACG
Gn27dolor, GAATCCTGCA ACCGTCGGTT GTGTGGAGCT GTAGCGTATA GGTGCGGCTT
TCGGCGTACG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
185      195      205      215      225
235

```

Spiroxis, TAGACCTGTA	-----C	TTGAGTGGGA	CCACAGTCCA	TAGAAGGTGC
Gspiniger, AGACCTGTGC	ATGCTCGACC	GAAGTTCCCT	TGATTGGGAC	CACTGTCCGA
Gn14spini, AGACCTGTGC	ATGCTCGACC	GAAGTTCCCT	TGATTGGGAC	CACTGTCCGA
Gturgidum, AGACCTGTGC	ATGCTCGACC	GAAGTTCCCT	TGATTGGGAC	CACTGTCCGT
Gbinuclea, AGACCTGTGC	ATGCTCGACC	GAAGTTCCCT	TGATTGGGAC	CACTGTCCGG
Gn06binuc, AGACCTGTGC	ATGCTCGACC	GAAGTTCCCT	TGATTGGGAC	CACTGTCCGG
Gn16binuc, AGACCTGTGC	ATGCTCGACC	GAAGTTCCCT	TGATTGGGAC	CACTGTCCGG
Gn21binuc, AGACCTGTGC	ATGCTCGACC	GAAGTTCCCT	TGATTGGGAC	CACTGTCCGG
Ghispidum, AGACCTGTGC	ATGCTCGACC	GAAGTTCCCT	TGATTGGGAC	CACTGTCCGG
Gn42hispi, AGACCTGTGC	ATGCTCGACC	GAAGTTCCCT	TGATTGGGAC	CACTGTCCGG
Gn37nippo, AGACCTGTGC	ATGCTCGACC	GAAGTTCCCT	TGATTGGGAC	CACTGTCCGG
Gnnipponi, AGACCTGTGC	ATGCTCGACC	GAAGTTCCCT	TGATTGGGAC	CACTGTCCGG
G43lamoth, AGACCTGTGC	ATGCTCGACC	GAAGTTCCCT	TGATTGGGAC	CACTGTCCGG
Gdoloresi, AGACCTGTGC	ATGCTCGACC	GAAGTTCCCT	TGATTGGGAC	CACTGTCCGG
Gn27dolor, AGACCTGTGC	ATGCTCGACC	GAAGTTCCCT	TGATTGGGAC	CACTGTCCGG

....
245	255	265	275	285

295 Spiroxis, GAGCGCAGCC	CGAGT	GaGCG	ATTTGCGCGG	TTGGTTGCTC	CTTGAGTCG	GGTGCCTGA
Gspiniger, AACGCAGCCC	GGTCGAGCGG	AATGTGCTGG	TTGCCGTTCC	TTGGAGTCGG	GTTGCCTGGG	
Gn14spini, AACGCAGCCC	GGTCGAGCGG	AATGTGCTGG	TTGCCGTTCC	TTGGAGTCGG	GTTGCCTGGG	
Gturgidum, AACGCAGCCC	GGTCGAGCGG	AGTGTGCTGG	TTGCCGTTCC	TTGGAGTCGG	GTTGCCTGGG	
Gbinuclea, AACGCAGCCC	GGTCGAGCGG	AGTGTGCTGG	TTGCCGTTCC	TTGGAGTCGG	GTTGCCTGGG	
Gn06binuc, AACGCAGCCC	GGTCGAGCGG	AGTGTGCTGG	TTGCCGTTCC	TTGGAGTCGG	GTTGCCTGGG	
Gn16binuc, AACGCAGCCC	GGTCGAGCGG	AGTGTGCTGG	TTGCCGTTCC	TTGGAGTCGG	GTTGCCTGGG	
Gn21binuc, AACGCAGCCC	GGTCGAGCGG	AGTGTGCTGG	TTGCCGTTCC	TTGGAGTCGG	GTTGCCTGGG	
Ghispidum, AACGCAGCCC	GGTTGAGTGG	AGTATGCTGG	TTGCCGTTCC	TTGGAGTCGG	GTTGCCTGGG	
Gn42hispi, AACGCAGCCC	GGTTGAGTGG	AGTATGCTGG	TTGCCGTTCC	TTGGAGTCGG	GTTGCCTGGG	
Gn37nippo, AACGCAGCCC	GGTCGAGCGG	AATGTGCTGG	TTGTCGTTCC	TTGGAGTCGG	GTTGCCTGGG	

Gnnipponi, AACGCAGCCC	GGTCGAGCGG	AATGTGCTGG	TTGTCGTTCC	TTGGAGTCGG	GTTGCCTGGG
G43lamoth, AACGCAGCCC	GGTCGAGCGG	AGTATGCTGG	TTGTCGTTCC	TCGGAGTCGG	GTTGCCTGGG
Gdoloresi, AACGCAGCCC	GGTTGAGCGG	AGTGTGCTGG	TTGCCGTTCC	TTGGAGTCGG	GTTGCCTGGG
Gn27dolor, AACGCAGCCC	GGTTGAGCGG	AGTGTGCTGG	TTGCCGTTCC	TTGGAGTCGG	GTTGCCTGGG

....
305	315	325	335	345

355 Spiroxis, TAGCAAACAA	CAAAGAGGGT	GGTAAACCTC	ATCTAAGGCT	AAATATTGCC	ACGAGACCGA
Gspiniger, AGCGAACAAG	GAAGATGGTG	GTA AACCTCA	TCTAAGACTA	AGTATCGACA	CGAGACCGAT
Gn14spini, AGCGAACAAG	GAAGATGGTG	GTA AACCTCA	TCTAAGACTA	AGTATCGACA	CGAGACCGAT
Gturgidum, AGCGAACAAG	GAAGATGGTG	GTA AACCTCA	TCTAAGACTA	AGTATCGACA	CGAGACCGAT
Gbinuclea, AGCGAACAAG	GAAGATGGTG	GTA AACCTCA	TCTAAGACTA	AGTATCGACA	CGAGACCGAT
Gn06binuc, AGCGAACAAG	GAAGATGGTG	GTA AACCTCA	TCTAAGACTA	AGTATCGACA	CGAGACCGAT
Gn16binuc, AGCGAACAAG	GAAGATGGTG	GTA AACCTCA	TCTAAGACTA	AGTATCGACA	CGAGACCGAT
Gn21binuc, AGCGAACAAG	GAAGATGGTG	GTA AACCTCA	TCTAAGACTA	AGTATCGACA	CGAGACCGAT
Ghispidum, AGCGAACAAG	GAAGATGGTG	GTA AACCTCA	TCTAAGACTA	AGTATCGACA	CGAGACCGAT
Gn42hispi, AGCGAACAAG	GAAGATGGTG	GTA AACCTCA	TCTAAGACTA	AGTATCGACA	CGAGACCGAT
Gn37nippo, AGCGAACAAG	GAAGATGGTG	GTA AACCTCA	TCTAAA ACTA	AGTATCGACC	CAAGACCGAT
Gnnipponi, AGCGAACAAG	GAAGATGGTG	GTA AACCTCA	TCTAAGACTA	AGTATCGACA	CGAGACCGAT
G43lamoth, AGCGAACAAG	GAAGATGGTG	GTA AACCTCA	TCTAAGACTA	AGTATCGACA	CGAGACCGAT
Gdoloresi, AGCGAACAAG	GAAGATGGTG	GTA AACCTCA	TCTAAGACTA	AGTATCGACA	CGAGACCGAT
Gn27dolor, AGCGAACAAG	GAAGATGGTG	GTA AACCTCA	TCTAAGACTA	AGTATCGACA	CGAGACCGAT

....
365	375	385	395	405

415 Spiroxis, CGTGAAACCG	GTACCGTGAG	GGAAAGTTGC	AAAGA ACTTT	GAAGAGAGAG	TTCAAGAGGG
Gspiniger, GTGAGACCGA	TACCGTAAGG	GAAAGTTGCA	AAGTACTTTG	AAAAGAGAGT	TCAAGAGAAC
Gn14spini, GTGAGACCGA	TACCGTAAGG	GAAAGTTGCA	AAGTACTTTG	AAAAGAGAGT	TCAAGAGAAC
Gturgidum, GTGAGACCGA	TACCGTAAGG	GAAAGTTGCA	AAGTACTTTG	AAAAGAGAGT	TCAAGAGAAC

Gbinuclea, GTGAGACCGA	TACCGTAAGG	GAAAGTTGCA	AAGTACTTTG	AAAAGAGAGT	TCAAGAGAAC	
Gn06binuc, GTGAGACCGA	TACCGTAAGG	GAAAGTTGCA	AAGTACTTTG	AAAAGAGAGT	TCAAGAGAAC	
Gn16binuc, GTGAGACCGA	TACCGTAAGG	GAAAGTTGCA	AAGTACTTTG	AAAAGAGAGT	TCAAGAGAAC	
Gn21binuc, GTGAGACCGA	TACCGTAAGG	GAAAGTTGCA	AAGTACTTTG	AAAAGAGAGT	TCAAGAGAAC	
Ghispidum, GTGAGACCGA	TACCGTAAGG	GAAAGTTGCA	AAGTACTTTG	AAAAGAGAGT	TCAAGAGAAC	
Gn42hispi, GTGAGACCGA	TACCGTAAGG	GAAAGTTGCA	AAGTACTTTG	AAAAGAGAGT	TCAAGAGAAC	
Gn37nippo, GTGAGACCGA	TACCGTAAGG	GAAAGTTGCA	AAGTACTTTG	AAAAGAGAGT	TCAAGAGAAC	
Gnnipponi, GTGAGACCGA	TACCGTAAGG	GAAAGTTGCA	AAGTACTTTG	AAAAGAGAGT	TCAAGAGAAC	
G43lamoth, GTGAGACCGA	TACCGTAAGG	GAAAGTTGCA	AAGTACTTTG	AAAAGAGAGT	TCAAGAGAAC	
Gdoloresi, GTGAGACCGA	TACCGTAAGG	GAAAGTTGCA	AAGTACTTTG	AAAAGAGAGT	TCAAGAGAAC	
Gn27dolor, GTGAGACCGA	TACCGTAAGG	GAAAGTTGCA	AAGTACTTTG	AAAAGAGAGT	TCAAGAGAAC	
.....
475	425	435	445	455	465	
Spiroxis, GATATAAGCG	CCGAGAAGGA	AACGGATAGA	GTTGACGAAA	CCTAaCGGCA	TTCAACTGAC	
Gspiniger, -GTCC	TAGGGTGGAA	GCGAATTGAG	CCAACAGACG	GCGACGGTAT	TCAACCGGTG	GCTT-
Gn14spin1, -GTCC	TAGGGTGGAA	GCGAATTGAG	CCAACAGACG	GCGACGGTAT	TCAACCGGTG	GCTT-
Gturgidum, -GTCC	TAGGGTGGAA	GCGAATTGAG	CCAACAGACG	GCGACGGTAT	TCAACCGGTG	GCTT-
Gbinuclea, -GTCC	TAGGGTGGAA	GCGAATTGAG	CCAACAGACG	GCGACGGTAT	TCAACCGGCG	GCTT-
Gn06binuc, -GTCC	TAGGGTGGAA	GCGAATTGAG	CCAACAGACG	GCGACGGTAT	TCAACCGGCG	GCTT-
Gn16binuc, -GTCC	TAGGGTGGAA	GCGAATTGAG	CCAACAGACG	GCGACGGTAT	TCAACCGGCG	GCTT-
Gn21binuc, -GTCC	TAGGGTGGAA	GCGAATTGAG	CCAACAGACG	GCGACGGTAT	TCAACCGGCG	GCTT-
Ghispidum, -GTCC	TAGGGTGGAA	GCGAATTGAG	CCAACAGACG	GCGACGGTAT	TCAACCGGTT	GCTT-
Gn42hispi, -GTCC	TAGGGTGGAA	GCGAATTGAG	CCAACAGACG	GCGACGGTAT	TCAACCGGTT	GCTT-
Gn37nippo, -GTCC	TAGGGTGGAA	GCGAATTGAG	CCAACAGACG	GCGACGGTAT	TCAACCGGTG	GCTT-
Gnnipponi, -GTCC	TAGGGTGGAA	GCGAATTGAG	CCAACAGACG	GCGACGGTAT	TCAACCGGTG	GCTT-
G43lamoth, -GTCC	TAGGGTGGAA	GCAAATTGAG	CCAACAGACG	GCGACGGTAT	TCAACCGGTG	GCTT-
Gdoloresi, -GTCC	TAGGGTGGAA	GCGAATTGAG	CCAACAGACG	GCGACGGTAT	TCAACCGGTT	GTTT-
Gn27dolor, -GTCC	TAGGGTGGAA	GCGAATTGAG	CCAACAGACG	GCGACGGTAT	TCAACCGGTT	GTTT-

	485	495	505	515	525
535					
Spiroxis,	CGGCTGTAAc	TCACTAAAAC	T-CTACGAGA	TAGTGGCGTG	GTTGGTgtcg
AGCGTTGGGG					
Gspiniger,	GAATGCGACT	CGTGACGATC	-GCTCACTTC	GGTGGCACGT	TT-GCGTCGA
GTGTTCGGTC					
Gn14spini,	GAATGCGACT	CGTGACGATC	-GCTCACTTC	GGTGGCACGT	TT-GCGTCGA
GTGTTCGGTC					
Gturgidum,	GGGCGCGACT	CGTGACGATC	AGCTCGTTTC	GGCGGCTCGT	TT-GCGTCGA
GTGTTcGGTC					
Gbinuclea,	GGATGCGACT	CGCGACGGTC	-GTTCGCTTC	GGCGGCACGT	TG-GCGTCGA
GTGTTCGGTC					
Gn06binuc,	GGATGCGACT	CGCGACGGTC	-GTTCGCTTC	GGCGGCACGT	TG-GCGTCGA
GTGTTCGGTC					
Gn16binuc,	GGATGCGACT	CGCGACGGTC	-GTTCGCTTC	GGCGGCACGT	TG-GCGTCGA
GTGTTCGGTC					
Gn21binuc,	GGATGCGACT	CGCGACGGTC	-GTTCGCTTC	GGCGGCACGT	TG-GCGTCGA
GTGTTCGGTC					
Ghispidum,	GAATGCGACT	CGCGGCGATC	-GCTCGCTTC	GGCGGCACGC	TT-GCGTCGA
GTGTTCGGTC					
Gn42hispl,	GAATGCGACT	CGCGGCGATC	-GCTCGCTTC	GGCGGCACGC	TT-GCGTCGA
GTGTTCGGTC					
Gn37nippo,	GGATGCGACT	CGCGACGGTC	-GCTCGCTTC	GGCGGCACGT	TTCGTGTGCGA
GTGTTCGGTC					
Gnnipponi,	GGATGCGACT	CGCGACGGTC	-GCTCGCTTC	GGCGGCACGT	TC-GTGTGCGA
GTGTTCGGTC					
G43lamoth,	GAATGCGACT	CGTGGCGGTC	-GCTCGCTTC	GGCGGCACGT	TT-GCGTCGA
GTGTTCGGTC					
Gdoloresi,	GAATGCGACT	CGTGACGGTC	-GCTCGCTTC	GGCGGCACGT	TT-GCGTCGA
GTGTTCGGTC					
Gn27dolor,	GAATGCGACT	CGTGACGGTC	-GCTCGCTTC	GGCGGCACGT	TT-GCGTCGA
GTGTTCGGTC					

	545	555	565	575	585
595					
Spiroxis,	CTTTTGCCGC	TGGTgtATtt	atCGCCGTGt	TGCGTCGTTG	TCGTGAGAGG
AACTGAGTTT					
Gspiniger,	TCCTGCTGCT	GGTGTATTTA	TCGTGCTTTT	GCGTTGCGGG	CGTCTTTTGT
GTGGGCGTTG					
Gn14spini,	TCCTGCTGCT	GGTGTATTTA	TCGTGCTTTT	GCGTTGCGGG	CGTCTTTTGT
GTGGGCGTTG					
Gturgidum,	ACCTGCTGCT	GGTGTATTTA	TCGTGCTTTT	GCGTTGCGGG	CGTCTTCTGT
GTGGGCGCTG					
Gbinuclea,	CCTTGCTGCT	GGTGTATTTA	TCGTGCTTTT	GCGTTGCGGG	CGTCTTCTGT
GTGGGCGCTG					
Gn06binuc,	CCTTGCTGCT	GGTGTATTTA	TCGTGCTTTT	GCGTTGCGGG	CGTCTTCTGT
GTGGGCGCTG					
Gn16binuc,	CCTTGCTGCT	GGTGTATTTA	TCGTGCTTTT	GCGTTGCGGG	CGTCTTCTGT
GTGGGCGCTG					
Gn21binuc,	CCTTGCTGCT	GGTGTATTTA	TCGTGCTTTT	GCGTTGCGGG	CGTCTTCTGT
GTGGGCGCTG					

Ghispidum, ATGGGCGTTG	TCCTGTTGCT	GGTGTATTTA	TCGTCGTTTT	GCGTTGCGGG	CGTCTTTTGT
Gn42hispi, ATGGGCGTTG	TCCTGTTGCT	GGTGTATTTA	TCGTCGTTTT	GCGTTGCGGG	CGTCTTTTGT
Gn37nippo, GTGGGCGCTG	TCCTACTGCT	GGTGTATTTA	TCGTCGTTTT	GCGTTGCGGG	CGTCTTCTGT
Gnipponi, GTGGGCGCTG	TCCTACTGCT	GGTGTATTTA	TCGTCGTTTT	GCGTTGCGGG	CGTCTTCTGT
G43lamoth, TCGGGCGCTG	TCCTGCTGCT	GGTGTATTTA	TCGTCGTTTT	GCGTTGCGGG	CGTCTTCTGT
Gdoloresi, GTGGACGCTG	TCCTGCTGCT	GGTGTATTTA	TCGTCGTTTT	GCGTTGCGGG	CGTCTTTTGT
Gn27dolor, GTGGACGCTG	TCCTGCTGCT	GGTGTATTTA	TCGTCGTTTT	GCGTTGCGGG	CGTCTTTTGT

Apéndice 6.

A new species of *Gnathostoma* (Nematoda: Gnathostomatidae) in *Procyon lotor hernandezii* from Mexico.

A NEW SPECIES OF GNATHOSTOMA (NEMATODA: GNATHOSTOMATIDAE) IN PROCYON LOTOR HERNANDEZII FROM MEXICO

Florencia Bertoni-Ruiz, Lule García-Prieto, David Osorio-Sarabia, and Virginia León-Règagnon*

Laboratorio de Helmintología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-153, CP 04510 México, D.F., México. e-mail: vleon@ibiologia.unam.mx

ABSTRACT: *Gnathostoma lamothei* n. sp., inhabiting the stomach of *Procyon lotor hernandezii* Wagler, 1831, in Tlacotalpan, Veracruz State, and Río Sapó, Oaxaca, Mexico, is described. This new species differs from all other congeners by having the posterior half of the body surface covered by rows of tiny round bosses instead of spines, or lacking ornamentations. Sequences of the ITS2 of the ribosomal DNA of *G. lamothei* n. sp. are compared with sequences of other species of the genus recorded in Mexico; they show a wide divergence (<50%) with *Gnathostoma binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991, and *Gnathostoma turgidum* Stossich, 1902, and high similarity with *Gnathostoma* sp. I sequence (99.2%). On the basis of morphometric traits and sequences, previous records of *Gnathostoma* sp. I (= *Gnathostoma procyonis* of Almeyda-Artigas et al., 1994, not Chandler, 1942, and *Gnathostoma neoprocyonis nomen nudem*) in Mexico are referred to as the new species.

Gnathostoma Owen, 1836, includes 11 species, mainly distributed in Asia and the Americas (Almeyda-Artigas, 1991; Miyazaki, 1991). In their adult stage, these nematodes are parasites of mammals, particularly carnivores, marsupials, and pigs (Miyazaki, 1991). In Mexico, 3 species have been recorded to date: *Gnathostoma turgidum* Stossich, 1902, from opossums (*Didelphis virginiana* Kerr, 1792, *Didelphis marsupialis* L., and *Philander opossum* L.), *Gnathostoma binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991, from canids and felids (*Felis pardalis* L., *Felis catus* L., and *Canis familiaris* L.), and *Gnathostoma procyonis* Chandler, 1942, from raccoons (*Procyon lotor hernandezii* Wagler, 1831) (Lamothe-Argumedo, 1997). On the basis of ribosomal DNA (rDNA) sequences, Almeyda-Artigas et al. (2000a, 2000b) concluded that previous records of *G. procyonis* in Mexico correspond to an undescribed species, referring to it as "*Gnathostoma* sp. I." This material was deposited in the U.S. National Parasite Collection (USNPC), under the name *Gnathostoma neoprocyonis* (088149.00, 088150.00, and 088151.00). However, no morphological description of this species is available.

As part of a study on gnathostomiasis in Mexico, we collected specimens of an undescribed species of this genus. The main goal of this study was to describe it and clarify some reports of *Gnathostoma* in Mexico, using morphological features and sequences of rDNA.

MATERIALS AND METHODS

In May 2003, 30 raccoons (*P. lotor hernandezii*) were collected near Laguna Herrera (18°39'28"N, 95°40'25"W), 5 km north from Tlacotalpan City, Veracruz State, Mexico, and 3 in Río Sapó (18°16'54"N, 96°38'03"W), San José Independencia, Oaxaca, Mexico (January 2004). Hosts were shot by local hunters and dissected within the following 4 hr, and viscera were placed in 70% ethanol. Worms collected from the stomachs were preserved in 70% ethanol. Specimens were cleared using Amman's lactophenol and temporarily mounted for morphological study. Measurements are presented as the range, with the mean, standard deviation, and sample size in parentheses and expressed in millimeters, unless otherwise stated. Figures were drawn with the aid of a drawing tube. Specimens for scanning electron microscopy (SEM) were dehydrated using gradual ethanol series and dried to the critical point with carbon dioxide. Dry specimens were mounted on metal specimen stubs, coated with a gold-palladium mixture, and examined with an SEM Hitachi S2460N. The following abbreviations are used: CMNPA, Parasite

Collection, Canadian Museum of Nature, Ottawa, Ontario, Canada; CNHE, Colección Nacional de Helmintos, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México; and HWML, Harold W. Manter Laboratory, University of Nebraska-Lincoln, Lincoln, Nebraska. For comparative purposes, the following specimens were examined: *G. procyonis* HWML 23656, 23916–17, 23925, 23931, 23943, 23963, 23983–84, 23989, 24033, and 24052; USNPC 031106, 031234, and 031248; *G. neoprocyonis* USNPC 088151.00 (male and female); and *Gnathostoma miyazakii* CMNPA 1979-0150 and USNPC 74372.00 and 84150.00.

Specimens for molecular analyses were preserved in 100% ethanol. Standard phenol-chloroform extraction methods were used to recover DNA from single specimens. Laboratory protocols followed Hillis et al. (1996) and Palumbi (1996). Polymerase chain reaction (PCR) was used for amplifying the DNA sample; parameters and settings followed manufacturer's recommendations and Palumbi (1996). Amplification and sequencing of the ITS2 of the rDNA were performed using the primers NEWS2 (forward) 5'TGTGTCGATGAAGAACGCAG and ITS2-RIXO (reverse) 5'TTCTATGCTTAAATTCAGGGG (Almeyda-Artigas et al., 2000a). The amplification program consisted of 1 min at 94 C, followed by 35 cycles of 30 sec at 92 C, 30 sec at 50 C, and 1 min at 72 C, followed by 4 min at 72 C for final elongation. Products of PCR were sequenced directly on an ABI Prism 310 automated DNA sequencer. Sequences were aligned by eye with *G. binucleatum* (GenBank Z97072), *G. turgidum* (GenBank Z97175), and *Gnathostoma* sp. (GenBank Z97172) sequences, and a pairwise distance matrix was obtained using the computer program Bioedit (Hall, 1999).

DESCRIPTION

Gnathostoma lamothei n. sp. (Figs. 1–5)

General: Based in 5 adult males and 1 complete and 2 incomplete females. Medium size worms; body slightly widened posteriorly. Cephalic bulb armed with uncinata hooks in 8–9 transverse, complete rows + 2 incomplete rows. One pair of trilobulate lips, wider than large, protrude in the anterior end of cephalic bulb. Two simple papillae on each lip. One small amphid located between each pair of papillae. Ballonets 4 in number. Anterior half of body covered with cuticular spines. Spines varying in shape and size according to region and sex of worms. Cervical papilla located at the first quarter of body. Cervical sacs extend from ballonets to near nervous ring. Esophagus divided in anterior muscular (small) and posterior glandular sections.

Male: Body 13.2–18.9 (16.1 ± 2.6, n = 4) (14.8) long, 0.75–1.4 (1.1 ± 0.35, n = 4) (0.9) maximum width. Cephalic bulb 0.3–0.35 (0.3 ± 0.02, n = 4) (0.3) long, 0.6–0.7 (0.7 ± 0.04, n = 4) (0.6) wide; lips 0.08–0.1 (0.09 ± 0.01, n = 3) (0.1)

Received 12 November 2004; revised 13 January 2005; accepted 15 March 2005.

* To whom correspondence should be addressed.

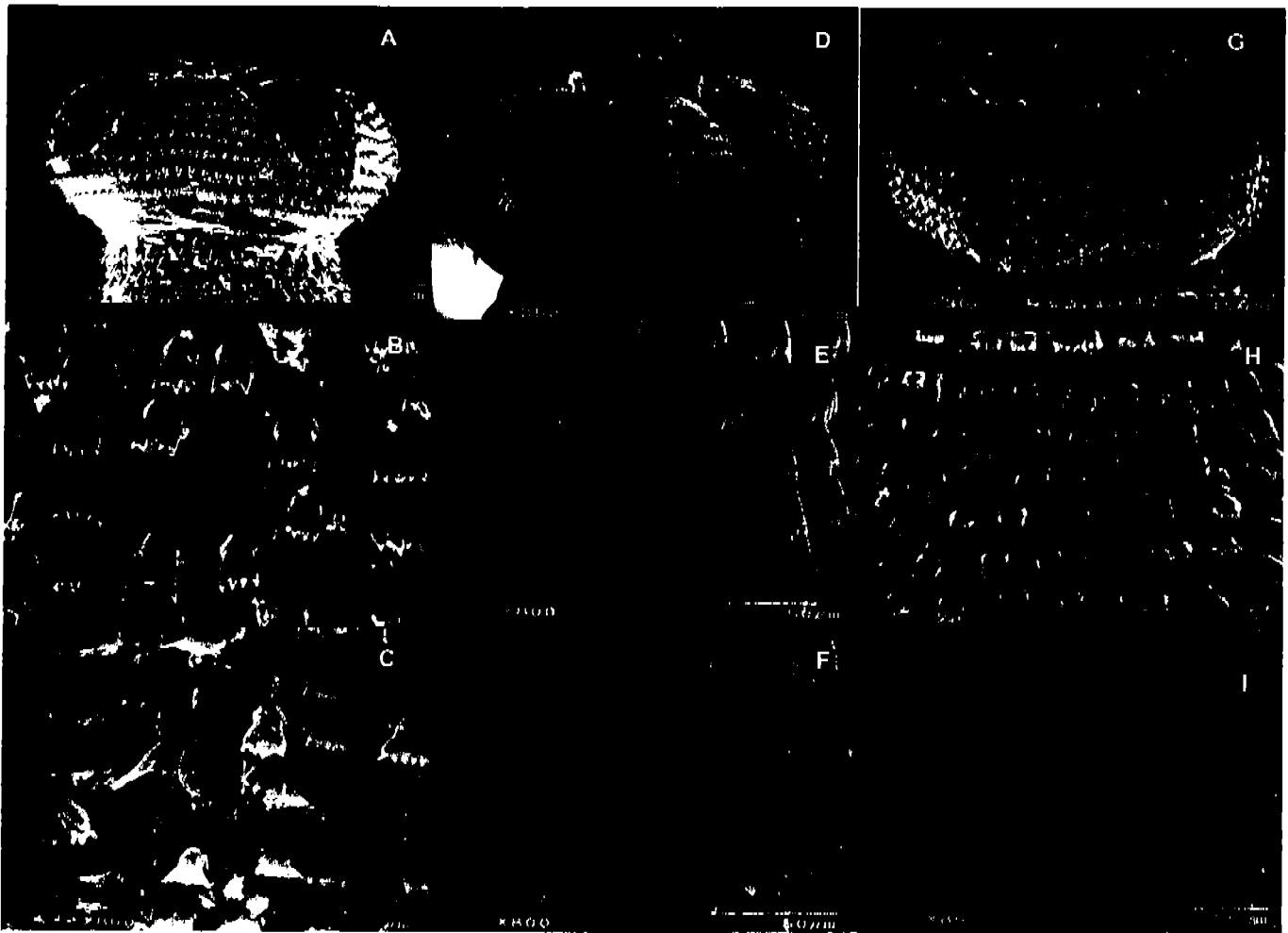


FIGURE 1. Ultrastructural comparison among males of 3 species of the genus *Gnathostoma*. *Gnathostoma lamothei* n. sp. (A–C); *G. procyonis* (D–F); *G. miyazakii* (G–I); cephalic bulb (A, D, G); body spines at neck level (B, E, H); body spines at cervical papilla level (C, F, I).

long, 0.23–0.25 (0.23 ± 0.01 , $n = 3$) (0.23) wide. Cephalic hooks 0.018–0.024 (0.021 ± 0.002 , $n = 10$) long, 0.006–0.012 (0.008 ± 0.002 , $n = 10$) width. Body spines of first few rows posterior to neck short (0.026–0.035 [0.029 ± 0.004 , $n = 17$] long) and broad (0.013–0.017 [0.014 ± 0.001 , $n = 18$] wide), with 3–6 points; spines at cervical papilla level short, 0.029–0.037 [0.032 ± 0.002 , $n = 10$] long and wide at distal region (0.015–0.018 [0.017 ± 0.008 , $n = 9$]); with 4–6 points; central points slightly longer than lateral points. Spines in mid-esophageal region longer (0.034–0.044 [0.047 ± 0.002 , $n = 15$]) than wide (0.013–0.015 [0.014 ± 0.007 , $n = 15$]), with 3 principal points (middle longer than laterals) and 1–3 secondary points. Spines at esophagus–intestinal junction, long (0.043–0.050 [0.047 ± 0.002 , $n = 8$]) and slender (0.011–0.015 [0.014 ± 0.008 , $n = 14$]), wide, with 3 points; middle point typically longer. From this region, number of points and size of spines gradually diminish posteriorly, finally disappearing at equatorial region of body. Posterior half of body covered with rows of roundish bosses located between cuticular transverse striations. Nerve ring and cervical papillae located between 21 and 22 and 7–11 rows of body spines, respectively. Excretory pore not observed. Cervical sacs 1–1.05 (1.02 ± 0.04 , $n = 3$) (1) long.

Esophagus 22.5–28.4% (25.2 ± 2.9 , $n = 3$) (22.5) of body length; long 3.3–3.7 (3.4 ± 0.2 , $n = 3$) (3.3), 0.37–0.40 (0.38 ± 0.015 , $n = 4$) (0.40) wide. Muscular region 0.35–0.4 (0.37 ± 0.03 , $n = 3$) (0.36) long; glandular region 2.9–3.3 (3.07 ± 0.25 , $n = 3$) (3) long. Spicules unequal, blunt apices. Left spicule 0.39–0.41 (0.40 ± 0.01 , $n = 3$) (0.39) long; right spicule 1.32–1.41 (1.38 ± 0.04 , $n = 4$) (1.32) long, representing 7.5–10.5% (8.9%) of total body length. Caudal extremity lobulated, 0.78–0.84 (0.81 ± 0.032 , $n = 3$) (0.83) wide; surface totally covered with minute and simple spines, except area around cloacal opening. Alae with 4 pairs of lateral, pedunculate papillae (2 precloacal and 2 postcloacal). Four pairs of umbilicated ventral papillae, delicate and sessile (1 precloacal and 3 postcloacal, with the second pair adcloacal).

Female: Body 17.8–19.6 (18.7 ± 1.25 , $n = 2$) (17.8) long, 1.22–1.29 (1.25 ± 0.035 , $n = 3$) (1.29) of maximum width. Cephalic bulb 0.28 long, 0.72 wide; lips 0.15 long, 0.25 wide. Cephalic hooks 0.018–0.026 (0.022 ± 0.0016 , $n = 28$) long, 0.006–0.009 (0.008 ± 0.0014 , $n = 10$) wide. Body spines of first few rows posterior to neck short (0.026–0.037 [0.031 ± 0.002 , $n = 11$] long) and broad (0.010–0.013 [0.011 ± 0.0008 , $n = 15$] wide), with 3–6 points; spines at cervical papilla level

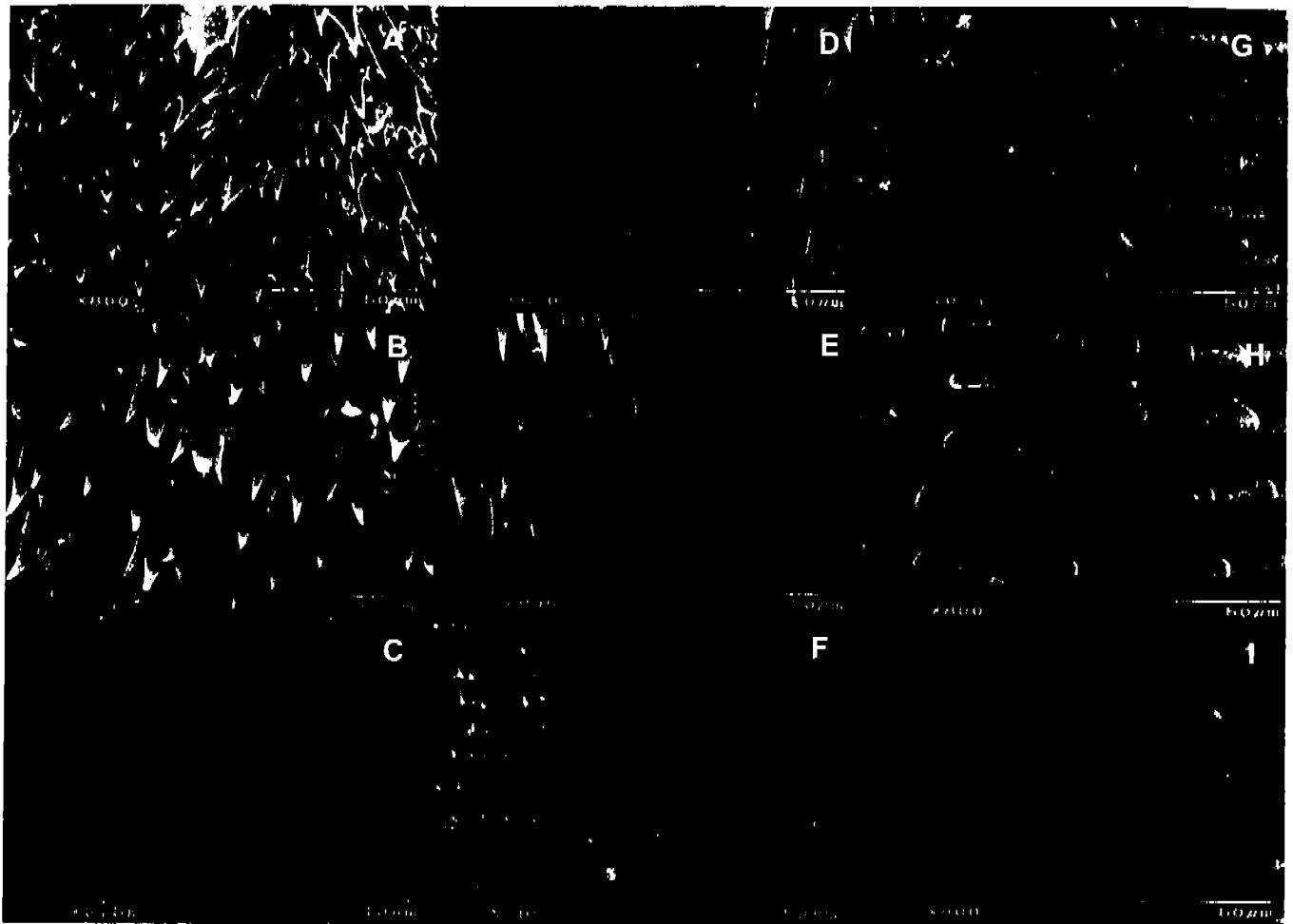


FIGURE 2. Ultrastructural comparison among males of 3 species of the genus *Gnathostoma*. *Gnathostoma lamothei* n. sp. (A–C); *G. procyonis* (D–F); *G. miyazakii* (G–I); body spines: esophagus level (A, D, G); esophagus–intestine junction (B, E, H); posterior half of body (C, F, I).

short and wide at distal region, 0.029–0.041 (0.035 ± 0.04 , $n = 7$) long, 0.013–0.019 (0.016 ± 0.01 , $n = 13$) wide; with 4–6 points; central points slightly longer than lateral points. Spines in mid-esophageal region longer 0.033–0.043 (0.040 ± 0.02 , $n = 10$) than wide 0.015–0.020 (0.018 ± 0.01 , $n = 15$), with 3 principal points (middle longer than laterals) and 1–3 secondary points. Spines at esophagus–intestinal junction, long (0.060–0.064 [0.062 ± 0.002 , $n = 7$]) (0.062) and slender

(0.06–0.07 [0.06 ± 0.003 , $n = 7$]); with 3 points; middle point typically longer. From this region, number of points and size of spines gradually diminish posteriorly; finally disappearing at equatorial region of body. Posterior half of body, covered with rows of roundish bosses located between cuticular transversal striations. Nerve ring, cervical papillae, and excretory pore located between 7 and 8, 8 and 11, and 9 and 10 rows of body spines, respectively. Cervical sacs 1.09–1.1 (1.09 ± 0.007 , $n =$



FIGURE 3. Ultrastructural comparison among caudal region of males of 3 species of the genus *Gnathostoma*. *Gnathostoma lamothei* n. sp. (A); *G. procyonis* (B); *G. miyazakii* (C).

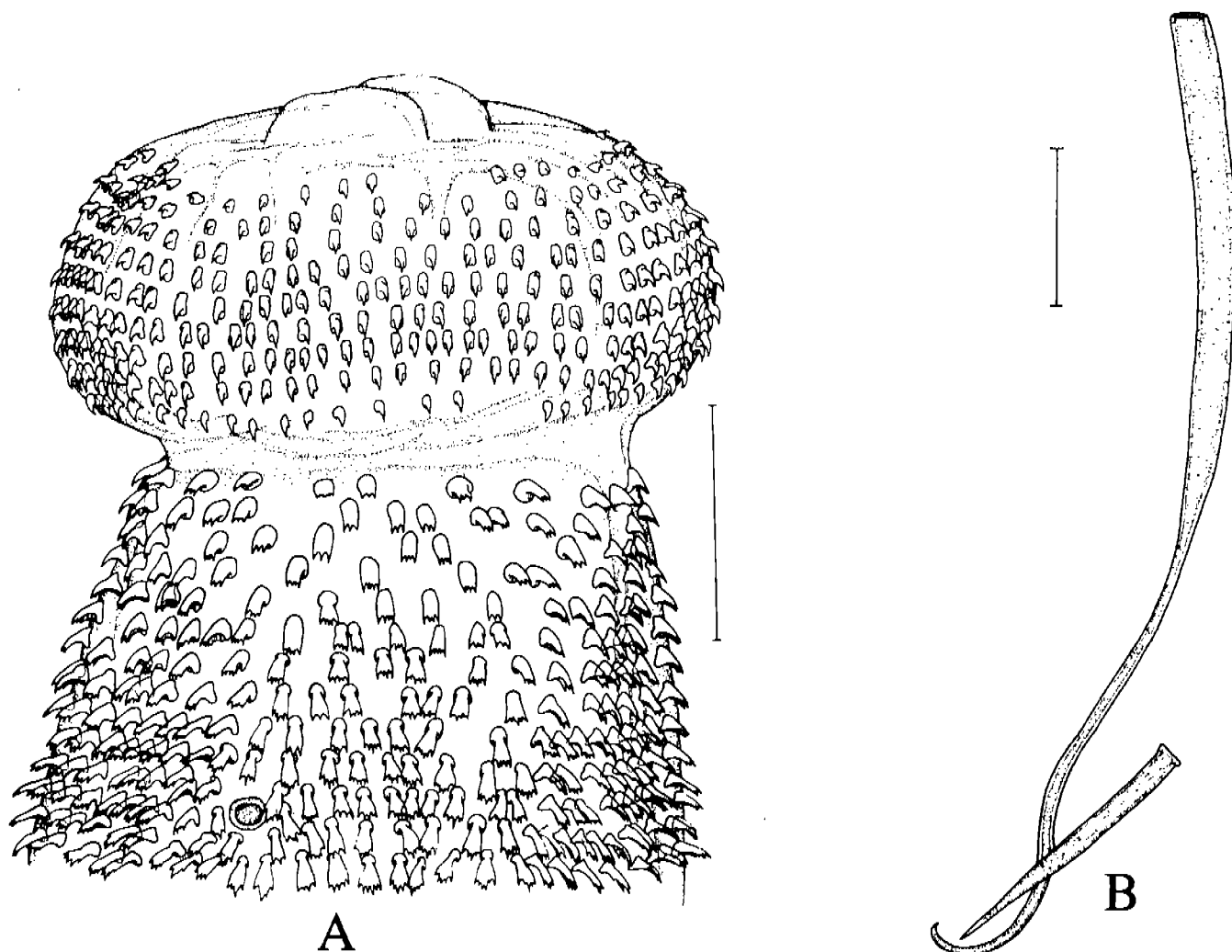


FIGURE 4. *Gnathostoma lamothei* n. sp., parasite of raccoons from Mexico. (A) Male, anterior region showing cephalic bulb and body spines at neck and cervical papilla levels; Bar = 0.5 mm. (B) Spicules, Bar = 0.2 mm.

2) (1.1) long. Vulva opening at 10.9–11.4 (11.14 ± 0.25 , $n = 3$) (10.86) from anterior extremity. Unipolar eggs 0.056–0.064 (0.59 ± 0.002 , $n = 15$) (0.59) long, 0.035–0.038 (0.037 ± 0.001 , $n = 15$) (0.38) wide, with thickened shell at pole. Numerous irregularly distributed pits on surface of eggshell. Anus 0.22–0.36 (0.28 ± 0.071 , $n = 3$) (0.36). Caudal extremity tapering to rounded apex.

Taxonomic summary

Type host: *Procyon lotor hernandezii* Wagler 1831.

Site of infection: Stomach, partially embedded in the gastric wall.

Type locality: Laguna Herrera (18°39'28"N, 95°40'25"W), Tlacotalpan, Veracruz, Mexico.

Other locality: Río Sapó (18°16'54"N, 96°38'03"W), San José Independencia, Oaxaca, Mexico.

Other records: *P. lotor hernandezii*, Tlacotalpan, Veracruz, Mexico, originally reported as *G. procyonis* (Almeyda-Artigas et al., 1994; León-Régagnon et al., 2005) and as *Gnathostoma* sp. I (Almeyda-Artigas et al., 2000a, 2000b). Specimens of *G.*

neoprocyonis of *P. lotor hernandezii* from Tlacotalpan City, La Laguneta Lagoon, Veracruz, Mexico, deposited in the USNPC with the accession numbers 088149.00 (male), 008150.00 (female), and 0.088151.00 (male and female), correspond to the new species.

Holotype: CNHE 4735 (male).

Allotype: CNHE 4421 (female).

Paratypes: CNHE 5232 (2 females, 1 male); USNPC 095893.0 (female).

Etymology: The species is named after Dr. Rafael Lamothe Argumedo in recognition of his contribution to the knowledge of gnathostomiasis in Mexico.

Remarks

In accordance with Almeyda-Artigas (1991) and Miyazaki (1991), *Gnathostoma* includes 11 species: *Gnathostoma americanum* Travassos, 1925, distributed in South America, infecting felids (Travassos, 1925); *G. binucleatum*, in Mexico and South America, infecting felids and canids (Almeyda-Artigas, 1991; Almeyda-Artigas et al., 2000a); *Gnathostoma doloresi* Tuban-

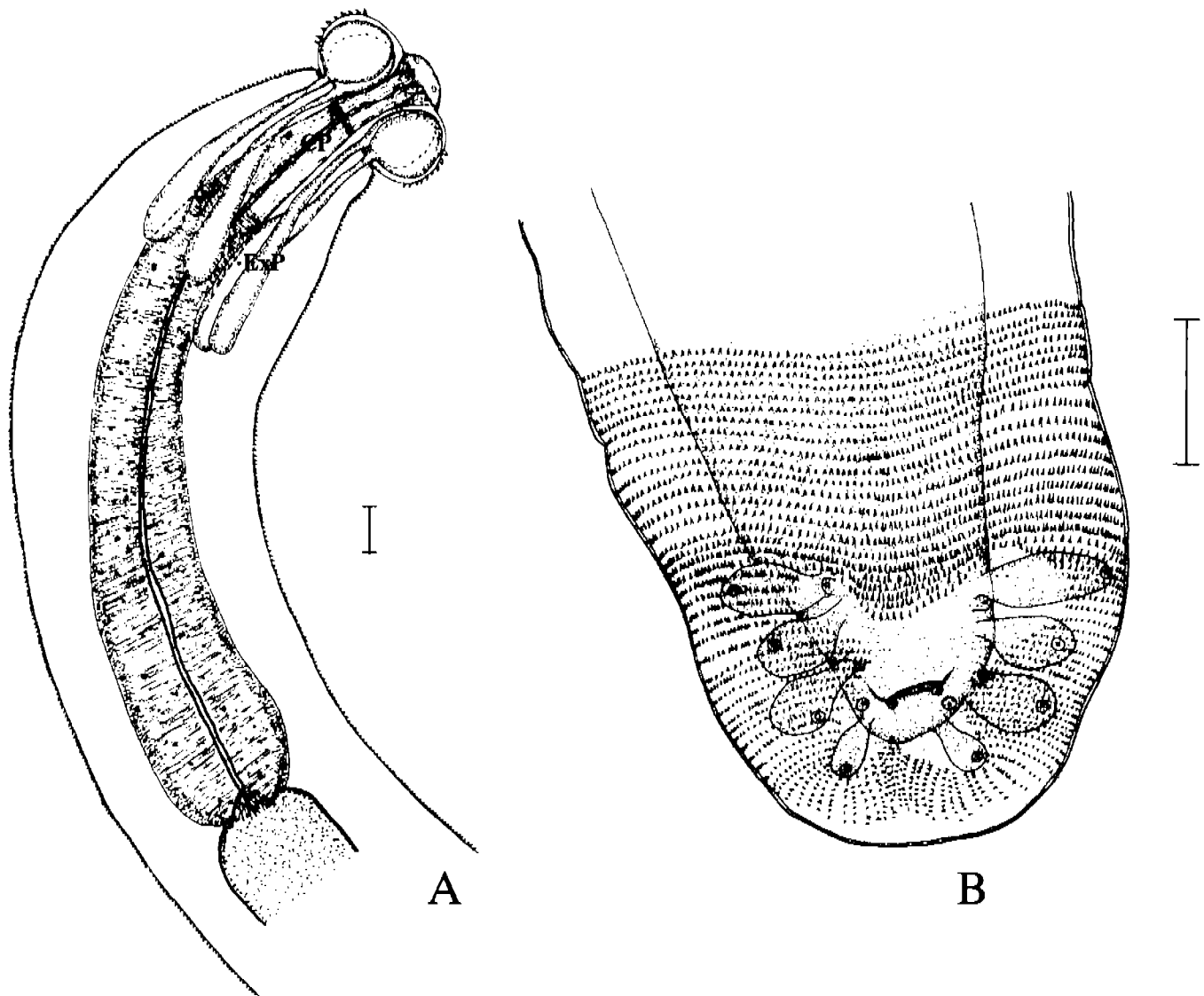


FIGURE 5. *Gnathostoma lamothei* n. sp., parasite of raccoons from Mexico. (A) Female, anterior region showing cervical sacs and ballanets, as well as esophagus divided in anterior muscular and posterior glandular sections. CP = cephalic papilla; ExP = excretory pore. Bar = 0.2 mm. (B) Caudal extremity of male; alae with 4 pairs of lateral, pedunculate papillae (2 precloacal and 2 postcloacal) and 4 pairs of umbilicated ventral papillae (1 precloacal, 1 adcloacal, and 2 postcloacal). Bar = 0.2 mm.

gui, 1925, in Asia, parasitizing swine; *Gnathostoma hispidum* Fedtschenko, 1872, from domestic and wild swine in Asia and Europe (Miyazaki, 1991); *Gnathostoma malaysiae* Miyazaki and Dunn, 1965, from 2 species of rodents in Thailand and Malaysia (Miyazaki and Dunn, 1965); *G. miyazakii* Anderson, 1964, from otters in Canada (Anderson, 1964); *G. procyonis*, from raccoons and skunks in the United States (Chandler, 1942); *Gnathostoma nipponicum* Yamaguti, 1941, from weasels in Japan (Yamaguti, 1941); *Gnathostoma spinigerum* Owen, 1836, from canids and felids in Asia; *G. turgidum* from marsupials in the Americas (Miyazaki, 1991); and *Gnathostoma vietnamicum* Le-Van Hoa, 1965, from otters in Vietnam (Le-Van Hoa, 1965).

The new species differs from all other congeners by having roundish bosses located between cuticular transversal striations in the posterior half of the body instead of spines. Particularly,

G. lamothei is distinguished from *G. americanum*, *G. nipponicum*, *G. turgidum*, and *G. vietnamicum* because these species lack cuticular ornamentation in the posterior region of the body surface. In addition, it differs from *G. americanum* and *G. turgidum*, since both species possess bipolar eggs instead of unipolar eggs as the new species. *Gnathostoma vietnamicum* can be differentiated from *G. lamothei* by the general shape of body (cylindrical in the new species and widened in the posterior region in *G. vietnamicum*), as well as by the number of rows of cephalic hooks (14–16 in the Vietnamese species vs. 8–9 in the Mexican species). It differs from *G. turgidum* because the spines covering the region between the cephalic bulb and the cervical papillae present 8–11 points, while in the new species, they show only 3–6 points.

Likewise, *G. lamothei* differs from *G. nipponicum* in the shape of those spines; in this Japanese species, some spines are

bifurcated, with 2 or 3 points in each branch, while in *G. lamothiei*, they never bifurcate. In addition, *G. nipponicum* was found in the esophagus, forming tumors located 2–3 cm apart from the stomach, while the new species is partially embedded in the gastric wall.

The entire body surface is covered with spines in the 7 remaining species, while in *G. lamothiei*, the posterior half of the body surface possesses tiny roundish bosses. Moreover, *G. doloresi* and *G. malaysiae* can be distinguished from the new species by having an eggshell provided with a caplike swelling in both poles, while in *G. lamothiei*, the eggs are unipolar. *Gnathostoma hispidum* also differs from *G. lamothiei* by having bifid spines at the esophageal region, while in the new species, these spines have 3 principal points and 1–3 secondary points.

Gnathostoma lamothiei differs from *G. binucleatum* and *G. spinigerum* by the shape, density, and spatial arrangement of individual spine types. In the new species, spines posterior to the neck are not as dense as in the other 2 species (Fig. 1B). In addition, spines at this level in *G. binucleatum* are mostly bifid, while in *G. lamothiei*, they have 3–6 points. Likewise, at the cervical papilla level, spines of *G. lamothiei* possess 4–6 points, while in *G. binucleatum* and *G. spinigerum*, the number of spine points in this region is 3 (Scholz and Ditrach, 1990; Almeyda-Artigas, 1991).

The presence of roundish bosses in the posterior part of the body is a common trait between *G. miyazakii* and *G. lamothiei*; however, in *G. miyazakii*, these structures are present only in males, while in the new species, they are present in both sexes. Likewise, in *G. lamothiei*, bosses are arranged in several rows between cuticular striations along surfaces of the posterior region, except for the caudal region, where spines are present; in contrast, males of *G. miyazakii* show transverse rows of bosses and lack spines in the caudal region (Anderson, 1964). In addition, the presence of a terminal digitiform appendage in males and a relatively long tapering tail in females of *G. miyazakii* distinguishes them from *G. lamothiei*.

Finally, *G. lamothiei* most closely resembles *G. procyonis*. Notwithstanding, the Mexican species differs from Chandler's species in several characters: (1) the right spicule is smaller in *G. lamothiei* than in *G. procyonis* (1.32–1.41 vs. 1.8–2.95, respectively), representing 8.9 and 13.1% of body length, respectively; (2) the density of spines posterior to the neck and at the cervical papilla level is smaller in the new species than in *G. procyonis* (Fig. 2B, C, respectively); and (3) in the posterior half of the body of *G. procyonis*, spines have their points reduced to short terminal prongs, which then become shortened and fused into continuous serrated ridges at the base. In *G. lamothiei*, the posterior half of the body is covered with rows of roundish bosses located between cuticular transversal striations, i.e., lack of spines (see Fig. 2C).

A 621-bp-long fragment (including the 5.8S and the ITS2 of the rDNA) was amplified. The sequence is available in GenBank with accession AY818004. The ITS2 sequence of the new species (513 bp) was compared with those of *G. binucleatum*, *G. turgidum*, and *Gnathostoma* sp. I (GenBank Z97172). It was impossible to unambiguously align the sequence of *G. lamothiei* with the sequences of *G. binucleatum* and *G. turgidum* because of the large amount of divergence among them (<50%). Alignment of the sequence of *G. lamothiei* with the sequence of *Gna-*

thostoma sp. I (Almeyda-Artigas et al., 2000a) resulted in 99.2% of similarity.

DISCUSSION

Almeyda-Artigas et al. (1994) recovered *G. procyonis* in Tlacotalpan, Veracruz, in *P. lotor hernandezii*. These authors found slight morphological differences in the specimen that they collected in Mexico (1 mature female), compared to the original description of *G. procyonis*. These differences consisted of the presence of transverse rows of "bosses" in the posterior half of the body in the Mexican material, instead of continuous serrate ridges (as described for *G. procyonis*, see Chandler [1942]). Notwithstanding, Almeyda-Artigas et al. (1994) concluded that the diagnosis of that female specimen "completely fit those given by Chandler (1942) and Miyazaki (1960) for *G. procyonis*." Subsequently, Almeyda-Artigas et al. (2000a, 2000b) conducted comparative studies of ITS2 sequences of the rDNA of species of *Gnathostoma* and concluded that previous records of *G. procyonis* in Mexico correspond to an undescribed species, referring to it as "*Gnathostoma* sp. I." This material was deposited by Almeyda-Artigas in USNPC, under the name *G. neoprocyonis*. The sequence of the ITS2 of *G. lamothiei* obtained in this study shows 99.2% similarity compared to the sequence of *Gnathostoma* sp. I (= *G. neoprocyonis*). This amount of variation is equivalent to that found among individuals of other species of *Gnathostoma* (Almeyda-Artigas et al., 2000a, 2000b; León-Règagnon et al., 2002, 2003; Kifune et al., 2004); therefore, the specimens referred to as *Gnathostoma* sp. I by Almeyda-Artigas et al. (2000a, 2000b) parasitizing *P. lotor hernandezii* in Tlacotalpan, Veracruz, actually correspond to *G. lamothiei*. To our knowledge, no description of *G. neoprocyonis* has been published. However, morphometric traits obtained from this material (USNPC 088149, 088150, and 088151.00) exactly fit the diagnosis of the new species described herein. For this reason, *G. neoprocyonis* is relegated to the status of *nomem nudem*.

ACKNOWLEDGMENTS

We deeply thank Félix Cázares, Rodrigo Rojas, María de la Luz Romero, Rogelio Rosas, and Delfina Ruiz for field assistance and Berenit Mendoza, Instituto de Biología, UNAM, for the SEM photographs. Special thanks to E. Hoberg and P. Pillit (USNPC), S. Gardner and A. Jiménez (HWML), and Judith C. Price (CMNPA) for the loan of specimens and literature. This study was supported by project IN201403 PAPIIT-UNAM, Mexico.

LITERATURE CITED

- ALMEYDA-ARTIGAS, R. J. 1991. Hallazgo de *Gnathostoma binucleatum* n. sp. (Nematoda: Spirurida) en felinos silvestres y el papel de peces dulceacuícolas y oligohalinos como vectores de la Gnatostomiasis humana en la cuenca baja del Río Papaloapan, Oaxaca-Veracruz, México. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México* 18: 37–155.
- , V. A. ACOSTA-HERNÁNDEZ, L. ALONZO-DÍAZ, M. CASTAÑEDA-SÁNCHEZ, AND 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* 60: 93–98.
- , D. M. BARGUES, AND S. MAS-COMA. 2000a. ITS-2 rDNA sequencing of *Gnathostoma* species (Nematoda) and elucidation of the species causing human Gnatostomiasis in the Americas. *Journal of Parasitology* 86: 537–544.
- , ———, AND ———. 2000b. rDNA of *Gnathostoma* species

- (Nematoda): ITS-2 microsatellites and 5.8S gene secondary structure. *Research and Reviews in Parasitology* **60**: 51–56.
- ANDERSON, R. C. 1964. *Gnathostoma miyazakii* n. sp. from the otter (*Lutra c. canadensis*) with comments on *G. sociale* (Leidy, 1858) of Mink (*Mustela vison*). *Canadian Journal of Zoology* **42**: 249–254.
- CHANDLER, A. C. 1942. The helminths of raccoons in east Texas. *Journal of Parasitology* **28**: 255–268.
- HALL, T. A. 1999. Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98NT. *Nucleic Acid Symposium Series* **41**: 95–98.
- HILLIS, D. M., B. K. MABLE, A. LARSON, S. K. DAVIS, AND E. A. ZIMMER. 1996. Sequencing and cloning. In *Molecular systematics*, D. M. Hillis, C. Moritz, and B. K. Mable (eds.). Sinauer, Sunderland, Massachusetts, p. 321–378.
- KIFUNE, T., R. LAMOTHE-ARGUMEDO, L. GARCÍA-PRIETO, A. OCEGUERA-FIGUEROA, AND V. LEÓN-RÉGAGNON. 2004. *Gnathostoma binucleatum* (Spirurida: Gnathostomatidae) en peces dulceacuícolas de Tabasco, México. *Revista de Biología Tropical* **52**: 371–376.
- LAMOTHE-ARGUMEDO, R. 1997. Hospederos definitivos, intermediarios y paraténicos de *Gnathostoma* en Veracruz y Oaxaca. *Cuadernos Mexicanos de Zoología* **3**: 22–28.
- LEÓN-RÉGAGNON, V., L. GARCÍA-PRIETO, D. OSORIO-SARABIA, E. MARTÍNEZ-SALAZAR, A. OCEGUERA-FIGUEROA, R. LAMOTHE-ARGUMEDO, S. P. DÍAZ-CAMACHO, S. NUAMTANONG, J. WAIKAGUL, H. AKAHANE, AND R. LAZO. 2003. Molecular systematics of *Gnathostoma* spp. *Bulletin of the Central Research Institute, Fukuoka University* **1**: 237–247.
- , D. OSORIO-SARABIA, L. GARCÍA-PRIETO, H. AKAHANE, R. LAMOTHE-ARGUMEDO, M. KOGA, M. MESSINA-ROBLES, AND C. ÁLVAREZ-GUERRERO. 2002. Study of the etiological agent of gnathostomiasis in Nayarit, Mexico. *Parasitology International* **51**: 201–204.
- , ———, ———, R. LAMOTHE-ARGUMEDO, F. BERTONI-RUIZ, AND A. OCEGUERA-FIGUEROA. 2005. New records of *Gnathostoma* spp. (Nematoda: Gnathostomatidae) in wild vertebrates of Mexico. *Parasitology International* **54**: 51–53.
- LE-VAN HOA. 1965. Etude d'un nouveaux gnathostome *G. vietnamicum* n. sp., chez *Lutra elioti* du Viet-Nam. *Bulletin de la Societé de Pathologie Exotique* **58**: 228–235.
- MIYAZAKI, I. 1960. On the genus *Gnathostoma* and human gnathostomiasis, with special reference to Japan. *Experimental Parasitology* **9**: 338–370.
- . 1991. An illustrated book of helminthic zoonoses. International Medical Foundation of Japan, Fukuoka, Japan, 494 p.
- , AND F. L. DUNN. 1965. *Gnathostoma malaysiae* sp. n. from rats on Tioman Island, Malaysia (Nematoda: Gnathostomidae). *Journal of Parasitology* **51**: 382–384.
- PALUMBI, S. R. 1996. Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. In *Molecular systematics*, D. M. Hillis, C. Moritz, and B. K. Mable (eds.). Sinauer, Sunderland, Massachusetts, p. 205–247.
- SCHOLZ, T., AND O. DITRICH. 1990. Scanning electron microscopy of the cuticular armature of the nematode *Gnathostoma spinigerum* Owen, 1836 from cats in Laos. *Journal of Helminthology* **64**: 255–262.
- TRAVASSOS, L. 1925. Contribuções para o conhecimento da Fauna Helminológica Brasileira XVIII. Sobre as espécies brasileiras do genero *Gnathostoma* Owen, 1836. *Sciencia Medica* **3**: 508–517.
- YAMAGUTI, S. 1941. Studies on the helminth fauna of Japan, part 35. Mammalian nematodes, II. *Japanese Journal of Zoology* **9**: 409–438.