



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS ESPECIES DEL  
GÉNERO *DIESTECOSTOMA* (HIRUDINEA:  
XEROBDELLIDAE) CON BASE EN CARACTERES  
MOLECULARES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

KARLA GISELA MARTÍNEZ FLORES



DIRECTOR DE TESIS:  
DR. ALEJANDRO FRANCISCO OCEGUERA  
FIGUEROA

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017



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.

## HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno  
Martínez  
Flores  
Karla Gisela  
55 48 56 82  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
307236256
2. Datos del tutor  
Dr  
Alejandro Francisco  
Oceguera  
Figueroa
3. Datos del sinodal 1  
Dra  
Rosario  
Mata López
4. Datos del sinodal 2  
M. en C.  
Luis  
García  
Prieto
5. Datos del sinodal 3  
M. en C.  
David Iván Guadalupe  
Hernández  
Mena
6. Datos del sinodal 4  
Biol.  
Luis Ricardo  
Salas  
Montiel
7. Datos del trabajo escrito  
Análisis filogenético de las  
especies del género *Diestecostoma*  
(Hirudinea: Xerobdellidae) con base  
en caracteres moleculares

## **Agradecimientos**

Al Dr. Ernesto Recuero y al Biol. Uriel Garduño que contribuyeron a la recolecta de ejemplares que fueron utilizados en este trabajo.

A la M. en C. Andrea Jiménez Marín, a la Dra. Laura Márquez Valdelamar y a la Biol. Ofelia Delgado del Laboratorio Nacional de la Biodiversidad LANABIO-IB-UNAM que colaboraron en el trabajo de Biología Molecular.

A la Biol. Nallely Ruiz Torres por su asistencia en los análisis de filogenéticos.

Al M. en C. Luis García Prieto por su colaboración en el proceso de depositación de los ejemplares utilizados a la Colección Invertebrados (CIN).

Al Biol. Ricardo Salas Montiel por sus acertados consejos para éste escrito y su indudable experiencia con las sanguijuelas.

Al proyecto PAPIIT IA202016.

## **Dedicatoria**

A mis padres Socorro Flores Cedillo (Coke) y Guadalupe Martínez Huerta (Lupe). A ti Coke por todo tu apoyo incondicional, empuje, valentía y fé, por enseñarme a ser noble con mis fallidas virtudes y por mostrarme la capacidad para hacer posible lo imposible. A ti Lupe por dejarme ser para crecer: “Pues no me gusta pero si te hace feliz pues ni modo”, de tu parte ha sido mi más valiosa enseñanza de vida e invaluable virtud de apoyo hacia un vuelo libre que aunque ha sido duro y en ocasiones agotador hoy en día me llena de vida junto con tu música y espontaneidad porque tú sigues aquí conmigo.

A mis hermanas Andrea (Andy) y Mónica (Cauca) Martínez Flores por sus buenos deseos y constancia. Mi más grande aspiración es crecer (en todo sentido) junto a ustedes hombro a hombro. Este esfuerzo también va para ustedes por alegrar mis días aguantando travesuras llenas de locura. Vaya que esas risas me salvaron en un sinfín de ocasiones, las quiero mucho.

A mi abuelita Andrea Cedillo García (Doñita) por todo, tú eres en gran parte lo que soy ahora como mujer. Tú lograste sobrepasar las barreras de época y trajiste a la modernidad tus virtudes para compartir. Gracias por enseñarme a escuchar, a sonreír cuando hay tormenta, a continuar por que siempre hay uno y cientos de motivos a la vez, gracias por no dejarme olvidar mis tradiciones y por tanta humildad. Va con todo

mi cariño y aprecio este esfuerzo para ti, la madre, la abuela, la mujer y la amiga. Siempre te llevo conmigo.

A mi abuelito Feliciano Flores Rojas (Dondoncito) por tu orgullo hacia nosotros, tus nietos. Por tus historias y sonrisas que nos transportan a otros tiempos para conocer el estado del hombre y su ambiente como uno. Por compartir tu amor al campo, las leyendas de los cerros, los cuentos de los árboles y charlas de carretera que en gran medida despertaron mi interés por “La vida”. Con cariño para ti abuelito por mostrarme que mis raíces van más allá de la familia y están plasmadas en la tierra, el agua y el viento y que corren en todas direcciones, te quiero.

A mis tías Elena (Elenita) y Rosario (Chayito) Flores Cedillo cuyo cariño, lealtad y esfuerzo se conjugan en un abrazo de madre. Este esfuerzo también es suyo por guiarme en el camino y acobijarme cuando lo necesité. Por sus jalones de orejas, experiencia de vida y apoyo incondicional. Son ustedes grandes ejemplos de amor, nobleza, fuerza y aliento para nosotros los más jóvenes, los privilegiados de ser sus sobrinos y ustedes más que tías, nuestras madres.

A Gabriel Flores Cedillo (Gaby) cuya capacidad, inteligencia y carisma innatos me enseñan día a día el estado máximo de pureza del hombre, todo un regalo de vida entre el estrés y la confusión superficial-moral de esta sociedad. Para ti Gaby, el más pequeño de la familia que a tus escasos 12 años me inspiras para continuar y romper los paradigmas de nosotros mismos y de otros. Porque tú al igual que yo o yo al igual que tú somos un par de almas en busca de libertad, de urgencia de exploración, sedientos de conocer más allá, siempre buscando más. Te adoro hombrecito.

A Ana Vilchis (Anita) mi hermana del alma cuya aventura comenzó en el limbo de la adolescencia loca y que hoy la vida nos regala el aliento para continuar juntas en esta batalla de vida junto con sus logros aún dentro de la misma pero mejorada locura (qué maravilla). Muchas gracias.

A Josué López (Vago) mi “bro”, eres un cabrón. Así te defino en una palabra. Eres la pura maldad, inteligencia y conciencia que dan luz a mi vida. Una combinación rara entre la vagancia, la flojera y el intelecto que asustanper ¡Qué caray! ¡Te admiro! Y como buena “cursi” no puedo terminar esta dedicatoria sin decirte “gracias por todo, vales mil”.

A Ocegüera's Team de la familia de las Suculentas por todas esas charlas de ciencia y no ciencia, fiestas y baile para recargar pila y entrarle duro a este mundo biológico que nos encanta. A Samanta por su madurez que equilibra la locura del equipo. A Zurya por sus consejos y buena conversación. A Jossué por su toque mágico de candela y sabrosura que sin duda eleva al grupo. A Yanet por tanto atrevimiento camuflado en seriedad, chiquita pero tremenda e imparable. A Ricardo por ser la mejor de las amigas y porta voz de buen juicio, inteligencia y experiencia que mantienen la prudencia de los miembros del equipo. A Nallely por lo mismo de su "unicornio wiiii" que nos regala momentos y frases memorables teñidos de un rosa gótico que nos atraviesa el alma. A Anita, nuestra suculenta adoptada por su hiperactividad, humildad y buen corazón que día a día nos inspiran.

A la mejor bandita de la Facultad de Ciencias "La mamá de los Pollitos" conformada por grandiosas personitas que pese a todo y la distancia siempre saben estar. Anita, Vero, Andreita, Frida, Gaby, Erica, Cristian y Victor gracias por su buena vibra y energía para continuar este camino juntos como familia.

A mis compañeros de la CNHE endémicos y no endémicos del laboratorio por su entusiasmo por los parásitos, actitud de colaboración y trabajo en equipo que hacen que este sitio se sienta con calor de hogar.

A mi asesor, el Dr. Alejandro Ocegüera Figueroa por su paciencia, entusiasmo y apoyo incondicional. Por ser un extraordinario investigador y un gran mentor de vida, muchas gracias.

*"We are part of the nature product of a long development journey. To some extent,  
we carry the ancient oceans in our blood..."*

**Murray Bookchin**

## Índice

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
I.I Métodos de inferencia filogenética	
A. Análisis de parsimonia	
B. Análisis de máxima verosimilitud	
I.II Generalidades de Hirudinea	
I.III Usos y aplicaciones de las sanguijuelas	
I.IV Sanguijuelas terrestres	
I.V Sanguijuelas de México	
I.VI Generalidades del género <i>Diestecostoma</i>	
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	13
<b>III. MÉTODO</b> .....	14
III.I Recolecta de ejemplares	
III.II Análisis morfológico	
III.III Análisis molecular	
1. Extracción y amplificación de DNA	
2. Edición y alineamiento de secuencias	
3. Análisis filogenético	
<b>IV. RESULTADOS</b> .....	20
IV.I Morfología	
IV.II Molecular	
1. Análisis de parsimonia	
2. Análisis de máxima Verosimilitud	
<b>V. DISCUSIÓN</b> .....	30
V.I Relación intraespecifica mediante caracteres morfológicos	
V.II Relaciones filogenéticas	
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	32
<b>VII. LITERATURA CITADA</b> .....	33
<b>VIII. ANEXOS</b> .....	39
VIII.I Anexo 1	
VIII.II Anexo 2	
VIII.III Anexo 3	

## **Análisis filogenético de las especies del género *Diestecostoma* (Hirudinea: Xerobdellidae) con base en caracteres moleculares**

### **RESUMEN**

La clasificación de los hirudíneos ha sido controvertida a lo largo de la historia y se han realizado múltiples cambios a distintos niveles, desde especie, familia a suborden, a partir de la inclusión de información molecular y métodos de inferencia filogenética robustos (Apakupakul et al., 1999; Ocegüera-Figueroa et al., 2011; Phillips et al., 2010). Particularmente problemática ha sido la clasificación de los géneros *Xerobdella* Fraunfeld, 1868, *Diestecostoma* Vaillant, 1890, *Mesobdella* R. Blanchard, 1893 y *Nesophilaemon* Nybelin, 1943 a nivel familia. Según Sawyer (1986), estos pertenecen a la familia Haemadipsidae Blanchard, 1896 por presentar una combinación de caracteres morfológicos, conductuales y geográficos. Otros autores, han sugerido que estos géneros deberían considerarse como familias independientes (Xerobdellidae Moore, 1946, Diestecostomatidae Ringuelet, 1953, Mesobdellidae Ringuelet, 1972 y Nesophilaemonidae Ringuelet, 1982 respectivamente) por su separación geográfica, disposición de las manchas oculares y nefridios, así como por la ausencia de aurículas respiratorias (Borda et al., 2008).

El presente trabajo se centra en el estudio de las sanguijuelas terrestres del género *Diestecostoma*, del cual se conocen cuatro especies: *Diestecostoma mexicana* Baird, 1869; *Diestecostoma magna* Moore, 1945 y *Diestecostoma octoannulata* Moore, 1946 distribuidas en México y *Diestecostoma trujillensis* Ringuelet, 1976 de Perú. La posición filogenética del género *Diestecostoma* ha sido motivo de intensas discusiones ya que sus miembros poseen caracteres morfológicos únicos que no han permitido relacionarlo ni diferenciarlo totalmente de otros grupos. Los análisis filogenéticos recientes con base en marcadores moleculares nucleares y mitocondriales son concluyentes al señalar que los miembros de la familia Haemadipsidae sensu Sawyer 1986, no conforman un grupo monofilético, dado que las especies del género *Haemadipsa*, junto con *Chthonobdella*, *Nesophilaemon skottsbergii*, *Idiobdella seychellensis* y *Malagabdella fallax* aparecen como un grupo independiente de *Mesobdella gemmata*, *Xerobdella lecomtei* y *Diestecostoma* spp. Para el primer clado, se

sugiere el nombre de Haemadipsidae *sensu* estricto, mientras que para el segundo, se reestablece el nombre a nivel familia de Xerobdellidae para incluir a tanto a *M. gemmata*, *Xerobdella lecomtei* y a las especies de *Diestecostoma*. En el presente estudio se realiza el análisis de la posición del género *Diestecostoma* a la luz de nueva evidencia utilizando un marcador mitocondrial (Citocromo C oxidasa o COI) y dos nucleares (18S y 28S ribosomal RNA). Además, por primera vez se investigan las relaciones filogenéticas de las especies del género y se sugiere la existencia de dos especies aún no descritas.

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **II Métodos de inferencia filogenética**

Los análisis filogenéticos permiten inferir las relaciones genealógicas o la historia evolutiva de un grupo de organismos las cuales se representan en árboles filogenéticos. Los métodos de inferencia filogenética tradicionalmente se basan en el principio de parsimonia, sin embargo de manera alternativa se han desarrollado métodos probabilísticos que incluyen la Máxima Verosimilitud (ML por sus siglas en inglés) e Inferencia Bayesiana (Baum, 2013; Morrone, 2013).

#### **A. Análisis de parsimonia**

En 1966 Henning publicó el primer método formal de inferencia filogenética llamado argumentación Hennigiana y que considera la información proporcionada por los caracteres, así como la construcción de un árbol por carácter y posteriormente su fusión en uno solo que implique el menor número de cambios (Baum, 2013; Llimpscobm, 1998; Morrone, 2013). El criterio de optimalidad ayuda en la toma de decisiones sobre cuáles son los mejores y los peores árboles resultantes. Bajo el criterio de parsimonia el mejor árbol es aquél que explica la mayoría de los caracteres observados como homología reduciendo la homoplasia al mínimo, esto es, el que involucra el menor número de cambios en el estado de carácter en un árbol determinado. El cálculo de longitud de los árboles se realiza por medio de software que examina una muestra amplia de las posibles soluciones mediante una búsqueda heurística (Baum, 2013; Morrone, 2013).

#### **B. Máxima verosimilitud**

La verosimilitud hace referencia a la probabilidad de elegir una hipótesis que mejor interprete los datos bajo un modelo de sustitución específico (Schmidt & Haeseler, 2009). Con base en esto último se asume que las secuencias genéticas evolucionan a partir de un árbol específico y las posibles hipótesis filogenéticas conforman diferentes topologías del árbol, longitud de las ramas y criterios de evolución de secuencias como las tasas de transición/transversión, de sustitución o frecuencias de bases. A cada uno de estos aspectos se les asigna un valor que los permite codificar para tratarlos en un software y de ésta manera maximizar los posibles resultados (Morrone, 2013).

### I.II Generalidades de Hirudinea

Las sanguijuelas pertenecen al phylum Annelida Lamarck, 1809 que comprende principalmente gusanos segmentados, de los cuales se han descrito más de 22 000 especies principalmente marinas (Aguado et al. 2014). Dentro del grupo se incluyen organismos que habitan en agua dulce, marinos y terrestres (Brusca & Brusca, 2003, 2016; Nielsen, 2012). Annelida tradicionalmente se divide en tres clases: Polychaeta, Oligochaeta e Hirudinea, sin embargo, análisis filogenéticos recientes muestran que Oligochaeta y Polychaeta son parafiléticos además que dentro de las filogenias de Annelida, grupos sin una segmentación corporal evidente aparecen anidados dentro del grupo, como los echiuridos, myzostomidos y siboglónidos (Aguado et al., 2014; Ocegüera-Figueroa et al., 2016; Vargas, 2014)

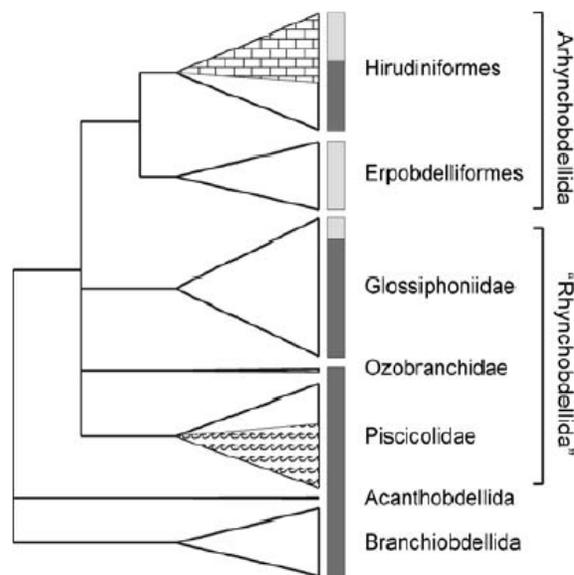
La organización corporal de la mayoría de las especies del phylum Annelida se caracteriza por el metamerismo, el cual se refleja tanto en la morfología externa como en la interna, dando lugar a la repetición de varias estructuras por segmento lo que se conoce como “homología serial”, siendo esta la condición presente en las sanguijuelas (Brusca & Brusca 2003, 2016). En los análisis filogenéticos recientes (Ocegüera-Figueroa et al., 2016; Siddall et al., 2001), consistentemente se ha recuperado un grupo fuertemente sustentado que incluye Oligochaeta, Hirudinea, Branchiobdellida y Acanthobdellida, todos ellos presentan una estructura glandular llamada clitelo, relacionada con la secreción de ootecas en la puesta de huevos y que le da nombre al grupo: Clitellata Michaelsen, 1919.

Dentro de Clitelata se incluyen 4 grupos: Oligochaeta, Hirudinea, Branchiobdellida y Acanthobdellida. Dentro de Hirudinea se incluyen las sanguijuelas o también llamadas “sanguijuelas verdaderas” sensu Sawyer, 1986. Las sanguijuelas son organismos hermafroditas con fecundación cruzada que se caracterizan por tener un cuerpo aplanado o ligeramente aplanado dorsoventralmente, por la ausencia de quetas y paradopodos y por tener un celoma reducido dispuesto en canales interconectados, además por la presencia constante de 34 somitos corporales con diferentes patrones de anillación superficial; además el extremo anterior y posterior se encuentran modificados y forman ventosas cuya función principal es la locomoción y fijación. El ciclo de vida de las sanguijuelas es directo, es decir que no presentan estados larvarios. Los huevos son depositados en el sustrato en ootecas o bien algunas especies poseen cierto grado de cuidado parental, principalmente de la familia Glossiphoniidae en las que las crías permanecen adheridas en su región ventral por varios días y son protegidas y alimentadas (Kutschera et al., 2007; Sawyer, 1986).

Se conocen más de 680 especies de hirudineos distribuidas en todos los continentes con excepción de la Antártica; la mayoría de las sanguijuelas habitan agua dulce, algunas son marinas y sólo unas cuantas anfibias y terrestres (Sket & Trontelj, 2008). Las sanguijuelas pueden ser ectoparásitas (parcial o completamente), depredadoras, detritívoras o carroñeras (Sawyer, 1986). La subclase Hirudinea se ha subdividido de acuerdo a la presencia o ausencia de una proboscis protusible en dos grupos: Rhynchobdellida Blanchard, 1894 y Arhynchobdellida Blanchard, 1894 respectivamente (Sawyer, 1986). El primer grupo incluye especies con una proboscis protusible y agrupa a los piscicólidos, ozobránquidos y glosifónidos. Los Arhynchobdellida carecen de proboscis y algunas especies tienen mandíbulas o bien una faringe larga y muscular. Las especies de Arhynchobdellida se han clasificado en dos subórdenes: Erpobdelliformes Caballero, 1952 que comprenden especies depredadoras y los Hirudiniformes Caballero, 1952 que incluyen tanto especies parásitas de vertebrados como especies depredadoras de invertebrados (Barnes, 1969; Brusca & Brusca, 2003; Fernández & Rivas, 2010; Ocegüera- Figueroa et al., 2005; Sawyer, 1986; Sket & Trontelj, 2008).

En general se reconocen tres formas de alimentación en sanguijuelas; los Rhynchobdellida, provistos con una proboscis son capaces de atravesar la piel de sus presas para succionar fluidos corporales y tejidos de invertebrados, esta estrategia se denomina liquidosomatofagia. La hematofagia, o ingesta de sangre de vertebrados es realizada tanto por especies provistas de una proboscis como por especies con mandíbulas. La tercer estrategia es la macrofagia, en la cual algunas especies de sanguijuelas ingieren completamente a sus presas y solo especies de Arhynchobdellida presentan este tipo de alimentación (Sawyer, 1986).

Existe cierta correlación filogenética con los tipos de alimentación, sin embargo es claro que estas estrategias han cambiado múltiples veces en la historia evolutiva del grupo Figura 1. (Sket & Trontelj, 2008).

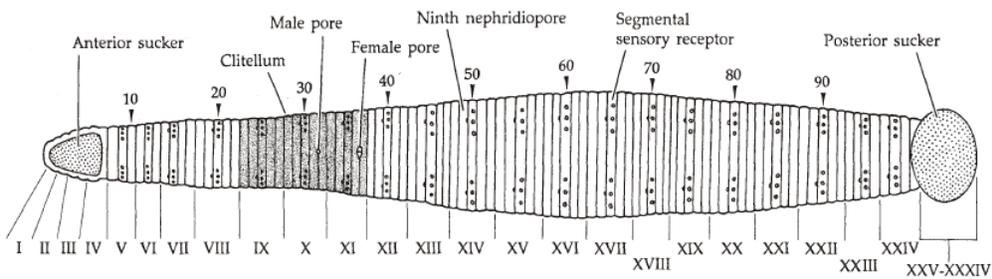


**Figura 1.** Diversidad de los grupos de hirudíneos con relación a sus hábitos alimenticios; depredadores (barra vertical blanca) y parásitos (barra vertical negra) así como sus hábitats: marino (olas), terrestre (ladrillos) y agua dulce (triángulos blancos). Tomado de Sket & Trontelj 2008.

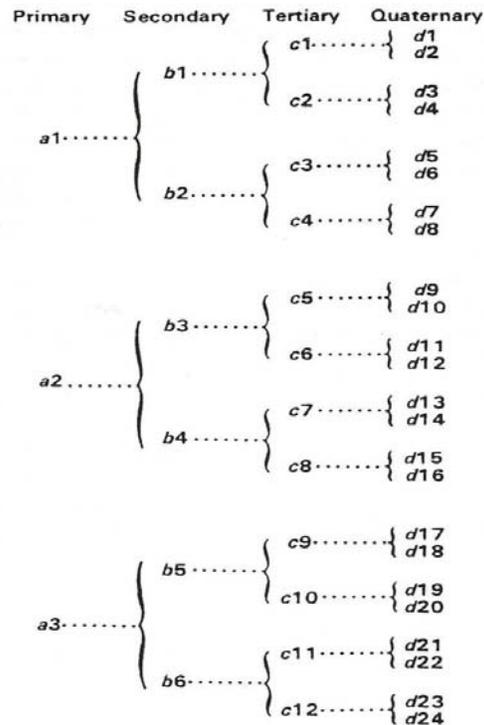
El tamaño corporal de los hirudíneos varía desde unos cuantos milímetros como algunas especies del género *Helobdella*, hasta unos 20 centímetros en

*Americobdella valdiviana* que junto con *Haementeria ghiliani* y *Megaliobdella szidati* son las especies de hirudineos más grandes (Sawyer, 1986).

El cuerpo de los hirudineos se divide en cinco regiones aunque en la mayoría de las especies esta división no es muy clara. Las sanguijuelas presentan 34 somitos, los cuales se nombran empleando números romanos (I-XXXIV): región anterior que incluye la boca y las manchas oculares (I-V), la región preclitelar (VI-VIII), región clitelar (cuya estructura se muestra únicamente durante el periodo de apareamiento y abarca los somitos IX-XI), región posclitelar (XII-XXVII) y región posterior (XXVIII-XXXIV). Cada somito a su vez se divide de manera superficial en anillos primarios, secundarios, terciarios o cuaternarios para los cuales se les asigna las letras a, b, c o d a lado de números arábigos de acuerdo al código de anillación propuesto por Moore, 1898 Figura 2 a y b (Boris & Trontelj, 2008; Sawyer, 1986; Vargas, 2014).



**Figura 2a.** Esquemización de los somitos señalados con números romanos y de los anillos superficiales detallados con números arábigos, Brusca (2003).



**Figura 2b.** Nomenclatura en el código de anillación de las subdivisiones los primeros tres anillos primarios del cuerpo de las sanguijuelas, Sawyer 1986.

### I.III Usos y aplicaciones de las sanguijuelas

El uso de las sanguijuelas por los humanos se conoce desde hace por lo menos dos siglos, siendo consideradas anteriormente como una panacea para atender múltiples enfermedades humanas. La sanguijuela *Hirudo medicinalis*, tradicionalmente conocida como sanguijuela medicinal europea es el hirudineo hematófago más conocido y estudiado de todas las especies (Trontelj & Utevsky, 2005; Vargas, 2014). El empleo de éstos animales se ha dirigido en las últimas décadas al tratamiento de hematomas; sin embargo estudios avanzados en el área médica tienen como objeto de estudio múltiples sustancias con propiedades analgésicas, vasodilatadoras, anticoagulantes y antiinflamatorias presentes en su saliva (Conniff, 1987; Sohn et al., 2001; Whitaker et al., 2004). Recientemente el uso de los hirudineos

también forma parte de tratamientos postoperatorios para el restablecimiento de la circulación sanguínea; los ejemplares utilizados se crían con fines médicos en granjas especializadas en su reproducción y conservación. El número de individuos comercializados en la actualidad no se compara con los millones de sanguijuelas utilizadas en toda Europa, siendo Rusia uno de los principales exportadores y Francia uno de los principales consumidores durante siglo XIX. Esta situación llevó a la inclusión de las sanguijuelas medicinales en la lista de especies en peligro de extinción en al menos 15 países europeos (Borda & Siddall, 2004; Elliott & Tullett 1984; Herter, 1937; Pilcher, 2004; Sket & Trontelj, 2008; Voskresenky, 1859).

Es importante mencionar que la *H. medicinalis* es la única especie oficialmente reconocida como medicinal; sin embargo se ha registrado la comercialización de *Hirudo verbana*, *Hirudo orientalis*, *Haementeria officinalis*, *Placobdella costata* y algunas especies del género *Hirudinaria* con fines médicos, lo que ha llevado a la sobreexplotación y translocación de sus poblaciones (Sket & Trontelj, 2008).

El uso y la importancia de los hirudíneos se han restringido básicamente en el área médica, sin embargo el conocimiento sobre estos animales ha sido base para estudios neurofisiológicos y de biología del desarrollo; además que ha logrado conducir el uso de los hirudíneos en diversas áreas ecológicas donde se emplean como organismos indicadores de la química del agua, presencia/ausencia de fauna y como agentes transportadores de suelo (Trontelj & Utevsky, 2005; Vargas, 2014).

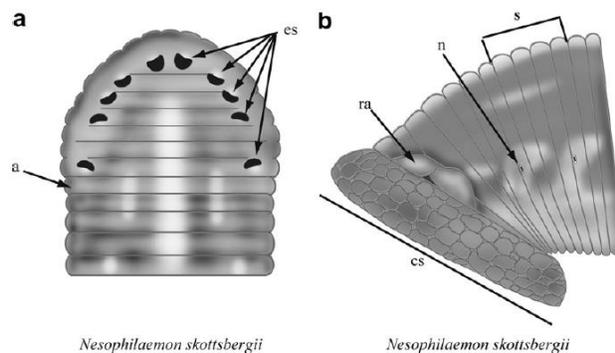
#### LIV Sanguijuelas terrestres

Arhyncobdellida incluye a los Hirudiniiformes, los cuales tradicionalmente se han dividido en las familias Americobdellidae Caballero 1956, Cyclicobdellidae Ringuelet 1972, Haemopidae Richardson 1969, Hirudinidae Whitman 1886 y Haemadipsidae Blachard 1893, las primeras tres familias incluyen especies carnívoras y las últimas dos, especies hematófagas las cuales son semiacuáticas y terrestres respectivamente (Sawyer, 1986).

Las especies de Hirudiniiformes habitan prácticamente en todas las masas continentales y algunas de las familias son endémicas en determinadas regiones como Cyclicobdellidae en Sudamérica, Americobdellidae en Chile y Haemadipsidae en el

Indo-Pacífico (Borda et al., 2008). Esta última con múltiples orígenes de acuerdo a Trontelj et al. 1999 y Borda & Siddall 2004 que se agrupan en dos clados uno en la región del Indo-Pacífico y otro que incluye especies de Europa y el Nuevo Mundo como *Xerobdella lecomtei* y *Mesobdella gemmata*. La presencia de una aurícula respiratoria caracteriza al grupo del Indo-Pacífico misma que se muestra ausente en las especies fuera de esa región, por lo que Borda et al., 2008 en su trabajo propusieron restablecer y elevar a nivel de familia a la Subfamilia Xerobdellinae Moore, 1946.

Las sanguijuelas terrestres se limitan a ambientes húmedos como bosques a grandes altitudes en la región del Indo-Pacífico y tradicionalmente se les incluye dentro de la familia Haemadipsidae *sensu* Sawyer 1986, cuyos miembros se caracterizan por tener hábitos terrestres y hematófagos, cinco pares de manchas oculares en forma de arco con el cuarto y quinto par separados por dos anillos (Figura 3a), nefridios laterales en pares con el último par debajo de las aurículas respiratorias (Figura 3b) (Borda et al., 2008).

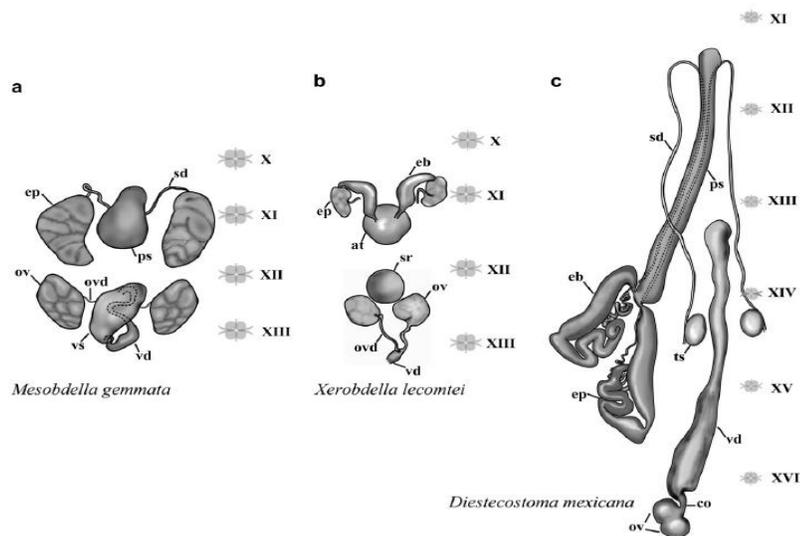


**Figura 3.** Esquemas de los caracteres diagnósticos de Hamadipsidae (a) Arco ocular; (b) Nefridio lateral. a= anillo, es=manchas oculares, cs= ventosa caudal, ra=aurículas respiratorias, n= nefrioporo, s= somita. Tomado de Borda et al. 2008.

*Xerobdella lecomtei* de Europa y *Mesobdella gemmata* de Chile son excepciones geográficas en la distribución del resto de las sanguijuelas terrestres, además de que

presentan ligeros cambios en su morfología diagnóstica como el arreglo de las manchas oculares, la posición ventral de los nefridios y la ausencia de aurículas respiratorias (Borda et al., 2008).

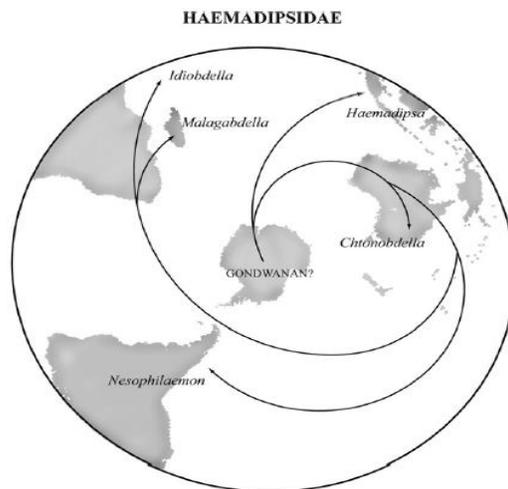
Los trabajos de Trontelj et al 1999 y Borda & Siddall 2004 demuestran que las especies de sanguijuelas terrestres europeas y chilenas no se encuentran cercanamente relacionadas con el resto de las clados que conforman a la familia Haemadipsidae. Borda et al. 2008 realizó un análisis filogenético con diversas especies de los diferentes géneros de Haemadipsidae ampliando la muestra de hirudíneos terrestres que habitan fuera del Indo-Pacífico, llegando a la misma conclusión de trabajos previos (Borda & Siddall 2004; Trontelj et al. 1999) en donde se excluyen a los géneros *Xerobdella* y *Mesobdella* de la familia Haemadipsidae agrupándolos con el género *Diestecostoma* constituyendo la familia Xerobdellidae, con una clara diferenciación morfológica en sus sistemas reproductores Figura 4 (Borda et al., 2008).



**Figura 4.** Diferencias morfológicas de sistema reproductor de los géneros *Mesobdella* (a), *Xerobdella* (b) y *Diestecostoma* (c) obtenidas de Borda et al., 2008.

En cuanto a los hábitos alimenticios de las especies de *Mesobdella* y *Diestecostoma* son reconocidos como sanguívoros, al igual que los *Haemadipsa*, sin embargo esto no ha sido comprobado en el caso de las especies de *Diestecostoma* reportadas por Caballero 1940 en donde se sugiere que podrían alimentarse de salamandras y oligoquetos mientras que *Xerobdella* y *Cylicobdella* son consideradas como depredadoras (Sket & Trontelj, 2008).

El origen de las sanguijuelas terrestres se basa en hipótesis paleogeográficas de la región del Indo-Pacífico (Moore 1924; Richardson 1975; Whitman 1886). Se piensa que la evolución de éstos organismos se dio a partir de una forma semiterrestre hematófaga de tres mandíbulas del norte de la India durante el periodo Terciario y que las aves son las responsables de su dispersión a lo largo del Indo-Pacífico (Moore, 1924), alternativamente se ha sugerido que pudieron originarse a partir de un organismo de dos mandíbulas dentro de la masa continental antes de que se diferenciara el área de Nueva Guinea y las islas adjuntas de Papua y Oceanía (Richardson, 1975) esto podría asociarse con una distribución tardía en Gondwana (Figura 5). Más recientemente se ha propuesto que estos organismos se dispersaron por medio de un ancestro de tres mandíbulas dentro de la región asiática a través de la India (Borda et al., 2008).



**Figura 5.** Borda et al. 2008 esquematiza la relación de las hipótesis filogenéticas con la biogeografía de Hemadipsidae.

#### I.V Sanguijuelas de México

En México, el primer registro de hirudineos fue en el año 1831 por Wagler, quien describió a *Liostoma coccineum* (probablemente *Haementeria officinalis* de Filippi 1849). En años posteriores se realizaron trabajos aislados, sin embargo fue el Dr. Eduardo Caballero y Caballero quien estudió el grupo intensivamente y publicó 22 artículos, siendo los trabajos de 1956 y 1959 de los más relevantes ya que en ellos abordó la taxonomía y la nomenclatura del grupo. Ringuelet 1981 publicó una clave taxonómica de especies mexicanas y Sawyer 1986 publicó 3 tomos en donde aborda diversos temas como taxonomía, embriología, ecología, fisiología y biogeografía de las sanguijuelas y, donde además reconoce a México como una región biogeográfica autónoma debido a las peculiaridad de su fauna (Oceguera-Figueroa & León-Règagnon, 2014).

El estudio del grupo quedó interrumpido por varios años hasta el 2005, a partir del cual se han publicado trabajos sobre el grupo (ver Oceguera-Figueroa & León-Règagnon, 2014). A la fecha se han registrado 32 especies de hirudineos en el país, de las cuales 22 se consideran endémicas o bien, de distribución restringida en México y Centro América. Además se reconoce que del total de especies de sanguijuelas conocidas en el mundo, México tiene alrededor del 4.5% del total (Stek & Trontelj, 2008), y se reconoce a *Limnodbdella* y a la mayoría de las especies de *Diestecostoma* como formas endémicas del país (Oceguera-Figueroa & León-Règagnon, 2014).

#### I.VI Generalidades del género *Diestecostoma*

A la fecha se han descrito cuatro especies del género *Diestecostoma*, tres de las cuales se distribuyen en México (*D. mexicana* de Baird 1869, *D. octoanulata* de Moore 1964 y *D. magna* de Moore 1945) y una cuarta especie en Perú (*D. trijullensis* de Ringuelet 1976). El nombre *Diestecostoma* fue propuesto por Vaillant 1890 como reemplazo al nombre del género *Heterobdella*, el cual había sido utilizado previamente para un grupo de trematodos, siendo *Diestecostoma mexicana* la especie tipo. En

México Caballero 1940 describió *Hygrobdella pelaezi* con ejemplares del Desierto de los Leones en la Ciudad de México y El Pico de Orizaba en los límites de Puebla y Veracruz. Moore 1946 consideró que esta especie se trataba de *Heterobdella mexicana* descrita por Baird en 1869, 70 años antes del redescubrimiento de Caballero tiempo en el que aún no se había añadido más conocimiento sobre esta especie y consideró que su nombre correcto era *Diestecostoma mexicana* (Moore, 1946).

La distribución en México de las especies de *Diestecostoma* a la fecha incluyen los estados de Ciudad de México, Estado de México, Oaxaca, Puebla y Veracruz (Oceguera-Figueroa et al., 2015; Oceguera-Figueroa A. & León-Règagnon, 2014). El estudio del género *Diestecostoma*, a pesar considerarse un grupo parcialmente endémico de México, ha sido poco estudiado y los trabajos del grupo se restringen a tres registros y a su inclusión dentro de un estudio filogenético (Borda et al, 2008; Oceguera-Figueroa A. & León-Règagnon, 2014). En estudios filogenéticos ha sido escasamente representando con solo tres especies y el establecimiento de su posición filogenética es crucial para esclarecer las relaciones filogenéticas de las sanguijuelas terrestres (Trontelj et al, 1999; Borda & Siddall, 2004; Borda et al 2008).

En los últimos años el uso de herramientas que incluyen el análisis de secuencias de DNA permiten una mejor caracterización de los hirudineos para lograr un mejor entendimiento de las relaciones filogenéticas de los diversos grupos, sin embargo quedan aún taxones escasamente representados en las filogenias, como es el caso de las especies de *Diestecostoma*, las cuales son estudiadas en el presente trabajo.

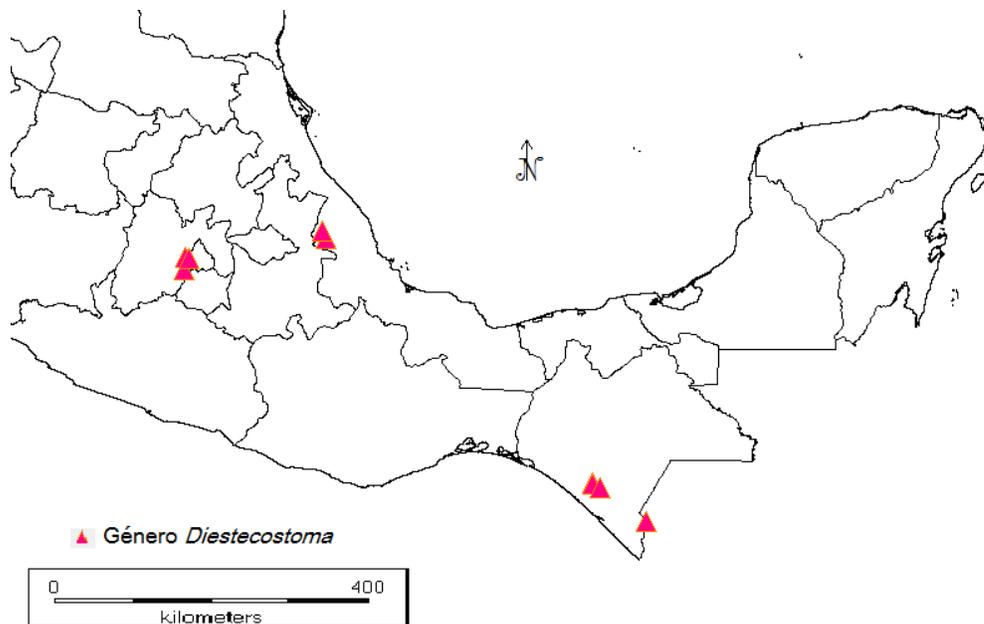
## **II. OBJETIVO**

Investigar las relaciones filogenéticas de las especies del género *Diestecostoma* con base en caracteres moleculares así como evaluar la validez de las especies mexicanas.

### III. METODOLOGÍA

#### III.I Recolecta de ejemplares

Se recolectaron ejemplares de *Diestecostoma* en cuatro estados de la República Mexicana: Ciudad de México, Chiapas, Morelos y Veracruz cuyas localidades y coordenadas se muestran en la Tabla 1 y mapa 1. Los ejemplares se encontraron debajo de piedras y troncos en putrefacción en zonas húmedas y por lo general, cerca de cuerpos de agua. Los ejemplares recolectados y colocados en envases de plástico con un poco de sustrato (trozos de madera y tierra) para ser transportados vivos al laboratorio.



**Mapa 1.** Mapa en el que se muestran los sitios de recolecta de las especies de *Diestecostoma* en 10 sitios (triángulos).

Estado	Localidad de colecta	Coordenadas
<b>Morelos</b>	Lagunas de Zempoala	-
<b>Ciudad de México</b>	Desierto de los Leones	19°15.824'N; 99°19.707'W
	Sn. Nicolás Totolapan,	19°14'41.9"N;
	Ajusco	99°15'34.9"W
<b>Chiapas</b>	Custepec, Cerro	15°43'20.1"N;
	Quetzal	92°56'36.4"W
	Custepec, Cerro	15°43'15.9"N;
	Quetzal	92°56'21.5"W
	Jaltenango	15°39'15.2"N; 92°49'29.8"W
	Tacana	
<b>Veracruz</b>	El Llanillo	19°33'15.5"N; 97°6'39.1"W
	Los Tuxtlas	18°35'08.1"N; 95°04'38.1"W
	Cruz Blanca, Villa	19°39'44.5"N;
	Aldama	97°10'29.5"W

**Tabla 1.** Localidades de recolecta

En el laboratorio los ejemplares se narcotizaron mediante la aplicación gradual de alcohol al 96% hasta que quedaron completamente inmóviles. Posteriormente con ayuda de un pincel se extendieron y conservaron alcohol al 96% en frascos de vidrio para su posterior análisis morfológico.

Los ejemplares recolectados por colaboradores no siguieron el proceso de narcotización normalmente empleado para los hirudíneos y se conservaron directamente en alcohol 96%. El material empleado para la obtención de secuencias de DNA se conservó en alcohol al 96% a 4°C hasta su procesamiento. .

### III.II Análisis morfológico

Los ejemplares se observaron bajo el microscopio de disección con el fin de estudiar los caracteres morfológicos diagnósticos de las especies del grupo, como el número de anillos entre gonoporos, número de anillos por somito y disposición de manchas oculares. La asignación taxonómica se realizó mediante el uso de claves taxonómicas especializadas y descripciones originales (Caballero, 1940; Moore, 1946; Ringuelet, 1981; Sawyer, 1986). Posteriormente se obtuvieron fotografías de las regiones dorsal y ventral de cada uno de los ejemplares con una Nikon COOLPIX L810.

Todos los ejemplares se depositaron en la Colección de Invertebrados, del Instituto de Biología, UNAM con los números de catálogo CIN 11- CIN 20 de dicha colección.

### III.III Análisis molecular

El análisis genético de los ejemplares comprendió tres fases: 1) extracción, amplificación y secuenciación de DNA, 2) edición y alineamiento de secuencias de DNA y 3) análisis filogenéticos.

#### 1. Extracción y amplificación de DNA

Se tomaron muestras de tejido de la ventosa posterior de las sanguijuelas para la extracción de DNA, este tejido es seleccionado ya que se minimiza la posibilidad de contaminar la muestra con DNA del contenido gástrico de la sanguijuela. Las muestras se purificaron de acuerdo al protocolo Wizard Genomic DNA Purification Kit de Promega (Anexo 1) y al protocolo DNeasy Blood & Tissue Kit de QIAGEN (Anexo 2).

Con las muestras de DNA purificadas de cada ejemplar se procedió a la amplificación del gen mitocondrial COI y dos marcadores nucleares 18s y 28s, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando los primers que se muestran en la Tabla 2. Los protocolos de amplificación se encuentran en el Anexo 3.

El trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Secuenciación de la Biodiversidad y de la Salud del Instituto de Biología de la UNAM.

Gen	Nombre	Primer	Referencia
COI	LCO	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer 1994
COI	HCO	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	Folmer 1994
18S	18SA	AACCTGGTTGATCCTGCCAGT	Apakupakul, 1999
18S	18SB	TGATCCTTCCGCAGGTTACCT	Apakupakul, 1999
18S	18SL	CCAACTACGAGCTTTTAACTG	Apakupakul, 1999
18S	18SC	CGGTAATTCCAGCTCCAATAG	Apakupakul, 1999
18S	18SY	CAGACAAATCGCTCCACCAAC	Apakupakul, 1999
18S	18SO	AAGGGCACCACCAGGAGTGGAG	Apakupakul, 1999
28S	28SA	GACCCGTCTTGAAGCACG	Whiting, 2002
28S	28SBout	CCCACAGGCCAGTTCTGCTTACC	Prendini et al., 2005

**Tabla 2.** Lista de primer utilizados para amplificar los marcadores moleculares (COI, 18S Y 28S) por PCR.

## 2. Edición y alineamiento de secuencias.

Las secuencias de DNA se editaron en el programa de computo Geneinus 5.17 (Kearse et al., 2012) eliminando las ambigüedades y errores de lectura del secuenciador. Cada una de las secuencias fue comparada con las secuencias disponibles en la base de datos de National Institute of Health (GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) mediante la herramienta de BLAST (Alstchul et al., 1990) con el fin de descartar posibles contaminaciones

Las secuencias generadas en este trabajo se analizaron en conjunto con secuencias previamente publicadas (Borda et al., 2008; Borda & Siddall, 2010; Phillips et al., 2010; Wirchansky & Shain, 2010) y disponibles en GenBank (Tabla 3). Se generaron tres matrices (una por gen o partición). Cada partición fue alineada en MAFFT versión 7 (Kato, 2013) por medio del servidor en línea (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>), con los parámetros asignados por default,

esto incluyo al grupo externo (*Americobdella valdiviana*) que fue elegido con base en trabajos previos (Borda et al., 2008; Phillipis, 2009).

Posteriormente las tres matrices se concatenaron usando el programa de cómputo Mesquite 3.04 (Maddison & Madidson, 2015) generando una matriz final de 3014 caracteres alineados y 82 terminales (663 de COI; de 1823 18S y 528 de 28S). La matriz final se optimizó en Gblocks Server 0.91b de Castresana 2002 ([http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks\\_server.html](http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks_server.html)) con el fin de mejorar el alineamiento por medio de la eliminación de regiones problemáticas para posteriormente llevar a cabo los análisis filogenéticos.

Taxón	Números de acceso GenBANK		
Ingroup			
	18S	28S	COI
<i>Haemopsis sanguisuga</i>	-	AY425381	AF462021
<i>Haemopsis caeca</i>	-	AY425376	AY040702
<i>Haemopsis kingi</i>	AY425466	AY425378	AY425448
<i>Haemopsis marmorata</i>	-	AY425380	AF003270
<i>Haemopsis lateromaculata</i>	-	AY425379	AF116028
<i>Philaemon grandis</i>	AY425465	AY425377	AY425447
<i>Haemopsis terrestris</i> 1	AY786465	EU100080	EU100092
<i>Haemopsis terrestris</i> 2	-	EU100080.1	AY786459.1
<i>Haemopsis terrestris</i> 3	-	FJ897505	FJ897514
<i>Haemopsis marmorata</i>	-	FJ897504	FJ897515
<i>Haemopsis ottorum</i> 1	-	FJ897511	FJ897510
<i>Haemopsis ottorum</i> 2	-	FJ897506	FJ897512
<i>Haemopsis ottorum</i> 3	-	-	FJ897513
<i>Patagoniobdella fraterna</i>	AY425477	AY425405	AY425459
<i>Semiscollex similis</i>	AY425475	AY425402	AY425457
<i>Oxyptychus brasiliensis</i>	AY425473	AY425398	AY425455
<i>Philobdella floridana</i>	DQ097210	DQ097201	DQ097219
<i>Philobdella gracilis</i>	DQ097209	DQ097200	DQ097218
<i>Macrobodella ditetra</i>	AY425471	AY425391	AY425453
<i>Macrobodella decora</i> 1	-	EU100082	EU100095
<i>Macrobodella decora</i> 2	AF116007	AY425390	AF003271

<i>Tyrannobdella rex</i>	GU394009	GU394013	GU394016
<i>Pintobdella chiapasensis</i>	GU394008	GU394012	GU394015
<i>Myxobdella annandalei</i>	GU394007	GU394011	-
<i>Dinobdella ferox</i>	GU394006	GU394010	-
<i>Limnobdella mexicana</i> 1	GQ368798	GQ368777	GQ368756
<i>Limnobdella mexicana</i> 2	GQ368799	GQ368778	GQ368757
<i>Limnatis</i> cf. <i>Nilotica</i>	GQ368795	GQ368774	GQ368754
<i>Limnatis nilotica</i>	AY425470	AY425389	AY425452
<i>Limnatis paluda</i> 1	GQ368796	GQ368775	-
<i>Haemadipsa japonica</i>	HQ203094	HQ203132	HQ203171
<i>Haemadipsa agilis</i>	HQ203104	HQ203142	HQ203181
<i>Haemadipsa ornata</i>	HQ203101	HQ203139	HQ203178
<i>Tritetrabdella taiwana</i>	-	HQ203156	HQ203195
<i>Haemadipsa picta</i>	HQ203100	HQ203138	HQ203177
<i>Chtonobdella whitmani</i> 1	EU100065	EU100074	EU100087
<i>Chtonobdella whitmani</i> 2	HQ203087	HQ203124	HQ203163
<i>Chtonobdella bilineata</i> 1	AF116006	AY425361	AF003267
<i>Chtonobdella bilineata</i> 2	HQ203083	HQ203120	HQ203159
<i>Domanibdella palmyrae</i>	HQ203082	HQ203119	HQ203158
<i>Planobdellan</i> n. sp.	HQ203114	HQ203152	HQ203191
<i>Neoterrabdella australensis</i>	HQ203086	HQ203123	HQ203162
<i>Phytobdella meyeri</i>	HQ207189	HQ207190	HQ207188
<i>Philaemon grandis</i>	HQ203113	HQ203151	<i>HQ203190</i>
<i>Philaemon pungens</i>	HQ203085	HQ203122	HQ203161
<i>Leiobdella</i> sp.	HQ203115	HQ203153	HQ203192
<i>Malagabdella vagans</i>	HQ203109	HQ203147	HQ203186
<i>Idiobdella seychellensis</i>	EU100070	EU100081	EU100094
<i>Nesophilaemon skottsbergii</i> 1	-	EU100085	-
<i>Nesophilaemon skottsbergii</i> 2	EU100072	-	EU100098
<i>Cylicobdella coccinea</i>	AY425462	AY425362	AY425444
<i>Diestecostoma magna</i>	EU100067	EU100076	EU100088
<i>Diestecostoma mexicana</i>	EU100068	EU100077	EU100089
<i>Diestecostoma trujillensis</i>	EU100066	EU100075	EU100090
<i>Haemadipsa interrupta</i>	EU100069	EU100078	EU100091
<i>Haemadipsa sumatrana</i>	AY425464	AY425372	AY425446
<i>Haemadipsa sylvestris</i>	AF116005	AY425373	AF003266

<i>Malagabdella fallax</i>	EU100071	EU100083	EU100096
<i>Mesobdella gemmata</i>	AY425472	EU100084	EU100097
<i>Xerobdella lecomtei</i>	AF099947	EU100086	EU100099
<i>Aliolimnatis michaelsoni</i>	AF116010	AY425388	AF116029
<i>Hirudo medicinalis</i>	AY786464	EU100079	EU100093
Outgroup			
<i>Americobdella valdiviana</i>	AY425461	EU100073	AY425443

**Tabla 3.** Taxones utilizados en los análisis filogenéticos y sus códigos de acceso en GenBank.

### 3. Análisis filogenético

Se realizó un análisis de Parsimonia en el programa TNT (Goloboff *et al*, 2008) mediante una primera búsqueda tradicional cuyos árboles resultantes fueron empleados como árboles de inicio para una búsqueda de nueva tecnología, utilizando 100 réplicas para la adición de taxones al azar y el algoritmo TBR. Se obtuvo posteriormente el árbol de consenso estricto y se calcularon los valores de Jackknife en el mismo programa.

Adicionalmente se analizó la matriz en busca de un modelo de sustitución molecular que mejor explicara los datos en jModelTest 2.1.6 (Posada, 2008) y para el cual se obtuvo el modelo GTR+I+G para la matriz concatenada con la cual se realizó un análisis de Máxima Verosimilitud en el programa raxML (Stamatakis, 2006) en donde se hicieron 50 corridas con 500 réplicas para bootstrap.

## IV. RESULTADOS

### IV.I Morfología

En total se revisaron 18 ejemplares de los estados de Morelos, Ciudad de México, Chiapas y Veracruz provenientes de 10 localidades. Cada ejemplar fue identificado empleando literatura especializada Tabla 4.

Estado	Localidad	Individuos colectados p/ estado	Especie
<b>Morelos</b>	Lagunas de Zempoala	1	<i>D. mexicana</i>
<b>Ciudad de México</b>	Desierto de los leones.	3	<i>D. mexicana</i>
	Sn. Nicolas, Totoloapan Ajusco	1	<i>D. mexicana</i>
<b>Chiapas</b>	Custepec, Cerro	7	<i>Diestecostoma</i> sp.2
	QuetzalJaltenagoTacana	2	<i>Diestecostoma</i> sp.2
		1	<i>D. octoannulata</i>
<b>Veracruz</b>	El Llanillo	1	<i>D. cf mexicana</i>
	Los Tuxtlas	1	<i>Diestecostoma</i> sp.1
	Cruz Blanca, Villa Aldama	1	<i>D. cf mexicana</i>

Con formato: Espacio Después: 0 pto

**Tabla 4.** Recolecta de individuos por localidad y estado.

Los ejemplares estudiados se describen brevemente a continuación, incluyendo medidas y características morfológicas diagnósticas que se resumen en la Tabla 5.



**Figura 6.** *Diestecostoma mexicana*, vista dorsal (A) y ventral (B). Los números indican las localidades.

Cinco ejemplares con un promedio de 6.04 cm de longitud y 0.54 cm de ancho. Somito completo de 10 anillos. Gonoporos separados por 19 anillos. Estos caracteres son congruentes con los descritos para *Diestecostoma mexicana* de Baird, 1869.

**Localidad:** Lagunas de Zempoala en el estado de Morelos (1); Desierto de los Leones (2, 3, 4) y San Nicolás Totolapan, Ajusco (5) de la Ciudad de México.



**Figura 7. *Diestecostoma* cf. *Mexicana***, vista dorsal (A) y vista ventral (B). Los números 1 y 2 definen la localidad de colecta.

Dos individuos con un promedio de 3.2 cm de longitud y 0.4 cm de ancho. Somito completo 10 anillado. Gonoporos separados por 17 anillos. Estos caracteres corresponden con los descritos para *Diestecostoma mexicana*, sin embargo el número de anillos es menor, por lo que en este estudio se les reconoce como *Diestecostoma* cf. *mexicana* a estos dos individuos.

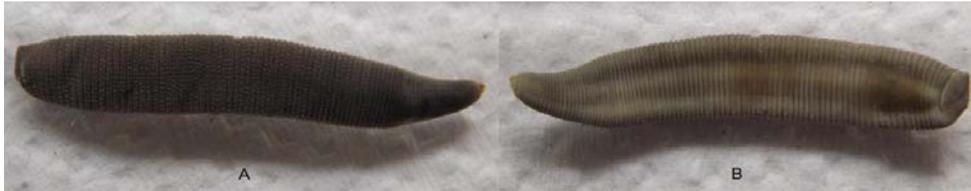
**Localidad:** El Llanillo (1) y Cruz Blanca, Villa Aldama (2) del estado de Veracruz.



**Figura 8. *Diestecostoma octoannulata***, vista dorsal (A) y vista ventral (B).

Un individuo de con 3.8 cm de longitud y 0.3 cm de ancho. Somito completo 8 anillado. Gonoporos separados por 16 anillos. Características que corresponden a la descripción de la especie *Diestecostoma octoannulata* de Moore, 1946.

**Localidad:** Volcán de Tacana, Chiapas



**Figura 9.** *Diestecostoma* sp. 1, vista dorsal (A) y vista ventral (B).

Un ejemplar con una longitud de 2.9 cm y 0.4 cm de ancho. Somito completo 5 anillado. Separación de 10 anillos entre los gonoporos. Estas características no corresponden a ninguna de las especies descritas, para este estudio a este ejemplar se le reconoce como *Diestecostoma* sp. 1.

**Localidad:** Los Tuxtlas, Veracruz.



**Figura 10.** *Diestecostoma sp. 2*, vista dorsal (a) y vista ventral (B). Abajo se enumeran las localidades correspondientes a cada individuo.

Nueve individuos con 4.3 cm de promedio de longitud y 0.28 cm de ancho. Somito completo 10 anillado. Gonoporos separados por 18 anillos. Estas características no

corresponden a ninguna de las cuatro especies conocidas por lo que en este estudio a los 9 ejemplares se les nombra *Diestecostoma* sp. 2.

**Localidad:** Custepec, Cerro Quetzal (1, 2, 5, 6, 7, 8,9) y Jaltenango (3, 4) de Chiapas.

Localidad	Individuo	Longitud	Ancho	Anillos por somito completo	Anillos entre gonoporos
Lagunas de Zempoala	1	6.6	0.5	10	19
Desierto de los Leones	1	5.3	0.6	10	19
	2	5.8	0.6	10	19
	3	5.9	0.6	10	19
Sn. Nicolás Totolapan, Ajusco	1	6.6	0.4	10	19
Custepec, Cerro Quetzal	1	4.2	0.3	10	18
	2	3.1	0.2	10	18
	3	3.7	0.2	10	18
	4	4	0.3	10	18
	5	4.4	0.3	10	18
	6	4	0.4	10	18
	7	4.5	0.3	10	18
Jaltenango	1	6	0.4	10	18
	2	5.6	0.2	10	18
Tacana	1	3.8	0.3	8	16
El Llanillo	1	4.3	0.6	10	17
Los Tuxtlas	1	2.9	0.4	5	10
Cruz Blanca, Villa Aldama	1	2.1	0.2	10	17

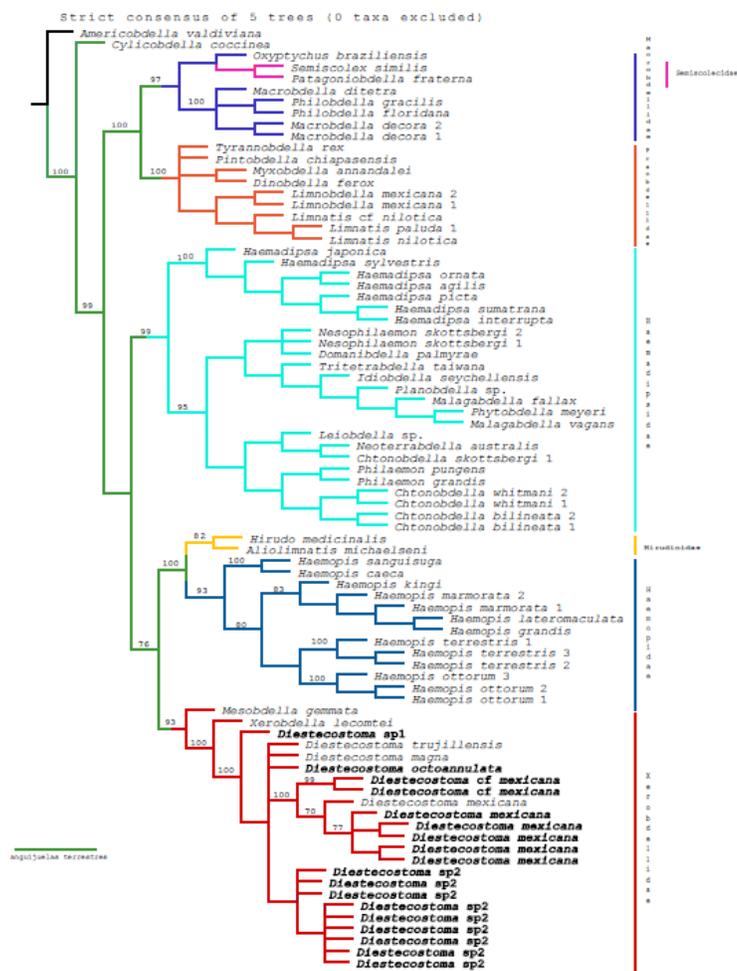
**Tabla 5.** Análisis morfológico

## IV.II Molecular

### 1. Análisis de Parsimonia

El análisis de parsimonia recuperó 5 árboles más parsimoniosos de 4738 pasos, con Índice de consistencia (CI) de 0.319 e índice de retención (RI) de 0.689. En el árbol de consenso estricto se recupera como monofiléticas las siguientes familias: Semiscolecidae, Praobdellidae, Hirudinidae, Haemopidae, Haemadipsidae y finalmente Xerobdellidae. El resultado muestra similitudes con el trabajo de Phillips y Siddall, 2009, la única diferencia notable es la posición de *Oxyptychus braziliensis*, a cual aparece como hermana de los miembros de Semiscolecidae (*Semiscolex* y *Patagoniobdella*) en el árbol obtenido en el presente trabajo, lo cual causa la parafilia de la familia Macrobdellidae. La monofilia de la familia Xerobdellidae está bien soportada (Jackknife de 100), en donde *Mesobdella gemmata* aparece como grupo hermano de *Xerobdella lecomtei* y del género *Diestecostoma*.

La monofilia de las especies que conforman al género *Diestecostoma* también se encuentra bien soportada (Jackknife de 100); sin embargo las relaciones entre los terminales no se encuentra bien resuelta y los clados recuperados presentan valores de soporte bajos.

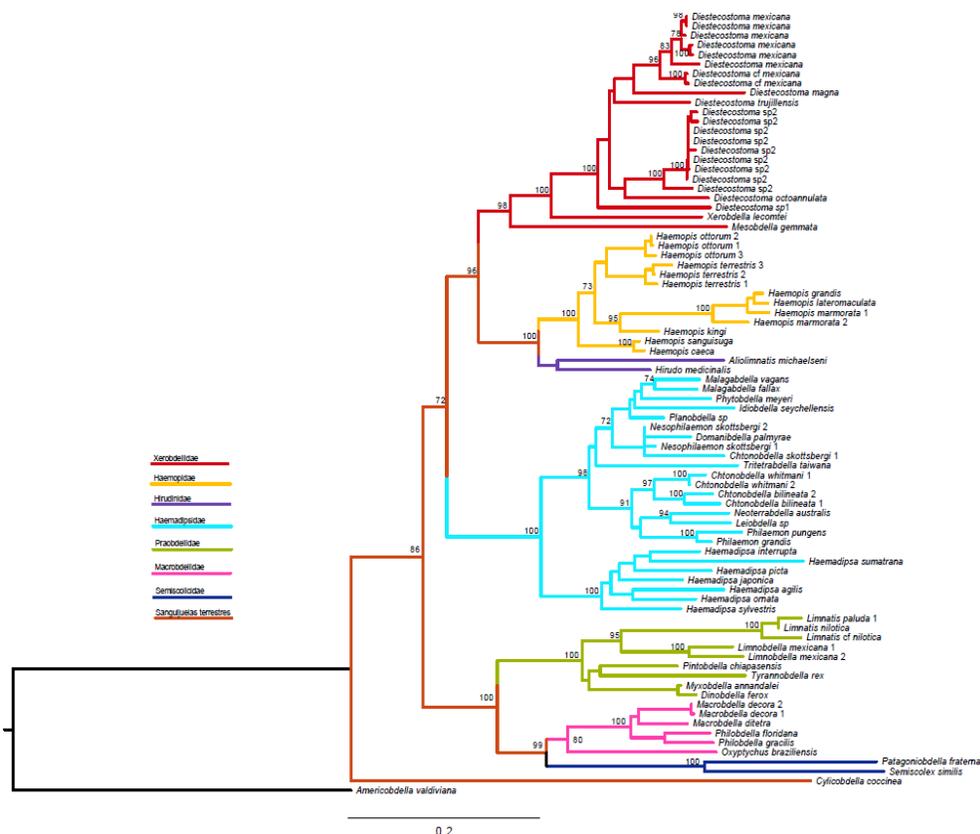


**Figura 11.** Árbol de consenso estricto de 5 árboles más parsimoniosos con un valor de Jackknife de 93 para la familia Xerobdellidae y de 100 para todas la especies del género *Diestecostoma*.

## 2. El análisis de Máxima Verosimilitud

En la Figura 17 se muestra el árbol resultado del análisis de Máxima Verosimilitud el cual resultó con un valores de likelihood >80. En general se recuperan los mismos grupos que en el análisis de parsimonia previamente mostrado. Sin embargo, al igual que en el trabajo de Phillips & Siddall, 2009, el análisis de ML recuperó a Macrobdellidae como monofilético y como grupo hermano de

Semiscolecidae. En cuanto a la familia Xerobdellidae, esta aparece como hermana de un clado formado por los miembros de Haemopidae e Hirudinidae con valores de soporte altos. Xerobdellidae (bootstrap de 98) incluye a *Mesobdella gemmata* como hermana de *Xerobdella lecomtei* y el resto de las especies de *Diastecostoma*, este último género con un valor de soporte de bootstrap de 100. Las relaciones dentro del género *Diastecostoma*, al igual que el análisis de parsimonia, están pobremente soportadas.



**Figura 13.** Árbol obtenido por medio de un análisis de Máxima Versosimilitud con valores de bootstrap en los nodos.

## V.DISCUSIÓN

### V.I Relación intraespecífica mediante caracteres morfológicos.

Las características morfológicas que definen a la familia Xerobdellidae de acuerdo al trabajo de Borda et al. 2008 son la ausencia de aurículas respiratorias y la presencia de 17 pares de nefridioporos ventrales con el último par reemplazado por un poro medio ventral que se encuentra en la base de la ventosa posterior. Los géneros *Xerobdella*, *Mesobdella* y *Diestecostoma* se diferencian entre sí por el patrón de anillación de los somitos completos, con las especies del primer género 5 anillado, el segundo 3 anillado y el tercero 10-12 anillado.

Con base en lo anterior y a las descripciones de las cuatro especies pertenecientes al género *Diestecostoma* y a las características de los ejemplares estudiados en el presente trabajo, la anillación del somito y el número de anillos que separan a los gonoporos son los caracteres morfológicos de mayor información para determinar la especie.

En este trabajo se estudiaron 18 ejemplares recolectados los cuales se diferenciaron morfológicamente en cinco especies: *Diestecostoma mexicana*, *Diestecostoma cf. mexicana*, *Diestecostoma octoannulata*, *Diestecostoma* sp.1 y *Diestecostoma* sp.2. Los individuos de la especie *Diestecostoma mexicana* señaladas con cf. se les consideró como tal por la variación en el número de anillos entre los gonoporos que para éste caso fue de 17 anillos. Mientras que los ejemplares de la especie *Diestecostoma mexicana sensu stricto* presentaron 19 anillos entre sus gonoporos y además un somito compuesto por 10 anillos de acuerdo a la descripción de Baird, 1869.

Los ejemplares nombrados como *Diestecostoma* sp.2 al igual que *D. mexicana* y *Diestecostoma cf. mexicana* presentan un somito 10 anillado pero se diferencian de estas dos especies por presentar 18 anillos entre los gonoporos. Además, se les considera una especie independiente por su distribución geográfica, siendo del Estado de Chiapas, mientras que los ejemplares de las especies *Diestecostoma mexicana* y *Diestecostoma cf. mexicana* se recolectaron en localidades de los estados de Morelos, Ciudad de México y Veracruz.

El ejemplar perteneciente a Los Tuxtlas, Veracruz presentó una morfología única con un somito completo 5 anillado, lo cual nos llevaría a expandir la diagnosis del género *Diestecostoma* la cual se basaba en la subdivisión del somito pentámero. Esta característica no había sido registrada previamente y probablemente se trate de una especie desconocida por lo que para este trabajo fue nombrado como *Diestecostoma* sp.1.

En este trabajo también se determinó un ejemplar de la especie *Diestecostoma octoannulata* recolectada en el sur del Estado de Chiapas, cerca de la localidad tipo de esta especie en Guatemala. Esta especie no ha sido incluida dentro de los trabajos que comprenden a las familias Haemadipsidae y Xerobdellidae.

## V.II Relaciones filogenéticas.

Los análisis de inferencia filogenética de Parsimonia y Máxima Verosimilitud nos indican que el género *Diestecostoma* forma parte de la familia Xerobdellidae y que es un grupo natural distinguible de los otros taxa que conforman a la familia y que coinciden con los resultados de los trabajos de Borda et al., 2008, Borda & Siddall 2010 y Phillips & Siddall 2009.

Las cuatro especies conocidas que conforman el género *Diestecostoma* forman un grupo monofilético, sin embargo dentro de los resultados de las relaciones entre las especies del género, el resultado más interesante nos muestra a *Diestecostoma* sp.1 de la región de los Tuxtlas, Veracruz como grupo hermano del resto las especies aquí estudiadas, lo cual apoya la evidencia morfológica en considerar a *Diestecostoma* sp. 1. Como una especie nueva. La posición filogenética de esta especie es interesante ya que es la única del género con un somito completo de 5 anillos, un carácter considerado como plesiomórfico para el grupo de los Arhynchobdellida. Esto significa que la subdivisión de los anillos dentro del género *Diestecostoma* está restringida solo a un subclado y que al menos la especie hermana de todas las especies con anillos subdivididos presenta el carácter plesiomórfico de somito 5 anillado..

Los ejemplares de *Diestecostoma mexicana* se encuentran bien sustentadas como grupo monofilético que incluye especies de las localidades de la Ciudad de México

(Desierto de los Leones y Ajusco), Morelos (Lagunas de Zempoala). *Diestecostoma* cf. *mexicana* de Veracruz, aparece como grupo hermano de *D. mexicana*.

## VI. CONCLUSIONES

Se encontraron diferencias morfológicas, geográficas y moleculares suficientes para poder proponer la existencia de dos especies nuevas del género *Diestecostoma* en México. *Diestecostoma* sp.1 de Los Tuxtlas, Veracruz y *Diestecostoma* sp.2 de tres localidades en Chiapas.

*Diestecostoma* sp. 1 presenta el somito 5 anillado, carácter atípico de las especies del género *Diestecostoma*, por lo cual es necesaria la redefinición del género que incluya la condición de somito completo 5 anillado.

Se confirma la monofilia del género *Diestecostoma* al incluir las cuatro especies descritas del grupo y dos formas más. De igual forma, se confirma la inclusión del género dentro de la familia Xerobdellidae todo esto obtenido mediante dos aproximaciones filogenéticas y con valores de soporte altos.

Se generó la primera secuencia de la especie *D. octoannulata* de Moore 1964, así como el primer reporte posterior a su descripción.

Se registran las siguientes nuevas localidades para las especies del género *Diestecostoma*:

- *Diestecostoma mexicana*: Lagunas de Zempoala en el Estado de Morelos y Sn. Nicolás Totoloapan, Ajusco en la Ciudad de México.
- *Diestecostoma* cf. *mexicana*: El Llanillo y Cruz Blanca, Villa Aldama en el estado de Veracruz.
- *Diestecostoma octoannulata*: Tacana en el Estado de Chiapas.
- *Diestecostoma* sp.1: Los Tuxtlas en el Estado de Veracruz.
- *Diestecostoma* sp.2: Jaltenango y Custepec, Cerro Quetzal en el estado de Chiapas.

## VII. REFERENCIAS

Altekar G., Dwarkadas S., Huelsenbeck J. P. & Ronquist F. 2004. Parallel Metropolis coupled Markov chain Monte Carlo for phylogenetic inference. *Bioinformatics* 20: 407-415.

Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W. & Lipman D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal Of Molecular Biology* 215: 403-410.

Apakupakul K., Siddall M. E. & Bureson E. M. 1999. Higher level relationships of leeches (Annelida: Clitellata: Euhirudinea) based on morphology and gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12: 350-359.

Barnes R. D. 1969. *Zoología de los Invertebrados*, 2ª edición. Ed. Interamericana.

Baum David A. & Stacey D. 2013. *Tree Thinking: An Introduction to Phylogenetic Biology*. Ed. Roberts and Company Publishers.

Blanchard E. 1849. Annelides. *Historia física y política de Chile*. Vol. 3 (3), *Zoología*: 43-50.

Blanchard R. 1896. Hirudinees. *Boll. Mus. Torino* 11, 1-24.

Borda, E., Siddall, M. E., 2004a. Arhynchobdellida (Annelida: Oligochaeta: Hirudinida) phylogenetic relationships and evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30: 213-225.

Borda E. & Mark E. Siddall. 2004b. Review of the evolution of life history strategies and phylogeny of the Hirudinida (Annelida: Oligochaeta). *Lauterbornia* 52: 5-25.

Borda, E., Ocegüera-Figueroa A., Siddall M. 2008. On the classification, evolution and biogeography of terrestrial haemadipsoid leeches (Hirudinida: Arhynchobdellidae: Hirudiniformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46: 142-154.

Borda E. & Mark E. Siddall. 2010. Insights into the evolutionary history of Indo-Pacific bloodfeeding terrestrial leeches (Hirudinida: Arhynchobdellida: Haemadipsidae). *Invertebrate Systematics* 24: 456-472.

Boris S. & Trontelj P. 2008. Global diversity of leeches (Hirudinea) in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 129-137

Brusca R. C. & Brusca G. J. 2003. *Invertebrates* 2<sup>a</sup> edition. Sunderland, Massachusetts. 01375.

Brusca, R. C. & Brusca, G. J., (2016). *Invertebrates*. 3a edición. Sunderland, Massachusetts. p. 531-602.

Caballero C. E. 1956. Hirudineos de México XX. Taxa y nomenclatura de la clase Hirudinea hasta géneros. *Anales del Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México* 27: 279– 302.

Conniff R. 1987. The little suckers have made a comeback. *Discover* 8: 85-94.

Elliott J. M., Tullett P. A. 1984. The status of the medicinal leech *Hirudo medicinalis* in Europe and especially in the British Isles. *Biological Conservation* 29: 15–26.

Fernández M. & Rivas G. 2010. Niveles de organización en animales. *Universidad Autónoma de México*, p.198-203.

Frauenfeld G. R. 1868. Ein neuer Landegel aus Oesterreich. *Verhandlungen der Zoologisch-Botanischen Gesellschaft in Wien*. 18, 147–149.

Folmer O., Back M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294–299.

Gilks W. R., Richardson S. & Spiegelhalter D. J. (eds.). 1996. *Markov Chain Monte Carlo in practice*. Chapman & Hall, Londres.

Goloboff P. A., Farris J. S., & Nixon K. C. 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* 24(5): 774-786.

Hastings W. K. 1970. Monte Carlo sampling methods using Markov chains and their applications. *Biometrika* 57: 97-109

Herter K. 1937. Die Ökologie der Hirudineen. In: Bronn, H.G. (Ed.), *Klassen und Ordnungen des Tierreichs*, 4, Bd., 3. Abt., 4. Buch, Teil 2. Leipzig, pp. 123–319.

Katoh K., Standley D. M. 2013. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution* 30 (4): 772-780.

Kearse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., Cheung M., Sturrock S., Buxton S., Cooper A., Markowitz S., Duran C., Thierer T., Ashton B., Mentjies P., & Drummond A.

2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28(12): 1647-1649.

Kutschera U., Pfeiffer I., Ebermann E. 2007. The European landleech: biology and DNA-based taxonomy of a rare species that is threatened by climate warming. *Naturwissenschaften* 94(12): 967- 974.

Limpscobm D. L. 1998. Basics of cladistics analysis. George Washington University, Washington, D.C.

Maddison W. P., Maddison D. R. 2015. Mesquite: a modular system of evolutionary analysis. Version 3.04: Available from: <http://mesquiteproject.org/>

Moore J. P. 1924. Notes on some Asiatic leeches (Hirudinea) principally from China, Kashmir, and British India. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 76: 343–388.

Moore J. 1945. Two new leeches (Hirudinea) in the collection of the United States National Museum. *Journal of the Washington Academy of Sciences.*, vol. 35, pp. 261-265.

Moore J. P. 1946. Leeches (Hirudinea) from the Hawaiian Islands, and two new species from the Pacific region in the Bishop Museum collection. *Occ. Pap. Bernice P. Bishop Mus:*18(11):171-191.

Morrone J. J. 2013. Sistemática. Fundamentos, métodos, aplicaciones. 1a edición. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

Nielsen C. 2012. *Animal Evolution. Interrelationships of the living phyla* 3a edición. Oxford University Press.

Nybelin O. 1943. *Nesophilaemon n. g. fur Philaemon skottsbergi* L. Johansson aus den Juan Fernandez Inseln. *Zoologischer Anzeiger. Leipzig* 142: 249–250.

Oceguera-Figueroa A., García-Prieto L., Salas-Montiel R. y Pérez Ponce de León G. 2015. Inventario de sanguijuelas (Annelida: Clitellata: Hirudinea) de México, con énfasis en las especies del Centro de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biología. Informe final SNIB-CONABIO, proyecto No. JF045. México, D.F.

Oceguera-Figueroa A., León-Règagnon V. & Siddall M. E. 2005. Phylogeny and a revision of Erpobdelliformes (annelida, Arhynchobdellida) from Mexico based on

nuclear and mitochondrial gene sequences. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 76(2): 191,198.

Oceguera-Figueroa A. & León-Règagnon V. 2014. Biodiversidad de sanguijuelas (Annelida: Euhirudinea) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad, Supl.* 85: S183-S189.

Oceguera-Figueroa A., Manzano-Marín A., Kvist S., Moya A., Siddall ME. et al. 2016. Comparative Mitogenomics of Leeches (Annelida: Clitellata): Genome Conservation and *Placobdella*-Specific *trnD* Gene Duplication. *PLOS ONE* 11(5): e0155441. doi: 10.1371/journal.pone.0155441

Predini L., Weygoldtb P., Wheeler W.C. 2005. Systematics of the *Damon variegatus* group of African whip spider (Chelicerata: Amblypygi): Evidence from behavior, morphology and DNA. *Organism, diversity and Evolution* 5: 203- 236.

Phillips A., Arauco-Brown J. R., Oceguera-Figueroa A., Gómez G. P., Beñtrán M., Yi-Te Lai and Siddall M. E. 2010. *Tyrannobdella rex* N. Sp. And the Evolutionary Origins of Mucosal Leech Infestations, *Plos One* Volume5 Issue 4 | e10057.

Pilcher H. 2004. Medicinal leeches: stuck on you. *Nature* 432: 10–11.

Borda E. & M. E. Siddall; 2004 ...Arhychobdellida (Annelida: Oligochaeta: Hirudinida): phylogenetic relationships and evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30: 213-225.

Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25 (7): 1253-1256.

Richardson R. L. 1969. A contribution to the systematics of the hirudinids leeches, with description of new families, genera and species. *Acta Zool. Acad. Sci. Hung.* 15, 97–149.

Richardson R.L. 1975. A contribution to the general zoology of the land leeches (Hirudinoidea: Haemadipsoidea superfam. nov). *Acta Zool. Acad. Sci. Hung.* 21, 119–152.

Ringuelet R. A. 1972. Nuevos taxa de hirudineos neotropicos con la redefinicion de Semiscolecidae y la descripcion de *Cylicobdellidae* fam. Nov. y *Mesobdellidae* fam. *Nov. Physis* 31: 193–201.

Ringuélet R. A. 1976. Clave para las familias y géneros de sanguijuelas (Hirudinea) de aguas dulces y terrestres de Mesoamerica y Sudamerica. *Limnobiós* 1: 9-19.

Ringuélet R. A. 1981. "Clave para el reconocimiento de los hirudíneos de México". *Anales del Instituto de Biología* 52: 89-97

Ringuélet R. A. 1982. Nesophilaemonidae nueva familia de Hirudiniformes Haemadipsoidea. *Neotropica* 28: 3-6.

Ringuélet R. A. 1985. *Annulata Hirudinea. FECIC. Volumen XVII: Annulata. Fascículo: 1 Hirudinea.*

Sawyer R. T. 1986. *Leech Biology and Behaviour.* Clarendon Press, Oxford, United Kingdom.

Schmidt H. A. & Von Haeseler A. 2009. Phylogenetic inference using maximum likelihood. En: *the phylogenetic handbook: A practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing.* Second edition. P. Lemey, M. Salemi & A. M. Vandamme (eds.). Cambridge University Press. Cambridge, pp. 181-209.

Siddall M. E., Apakupakul K., Burreson E. M., Coates K. A., Erséus C., Gelder S. R., Källersjö M., Trapido-Rosenthal H. 2001. Validating Livanow's hypothesis: molecular data agree that leeches, Branchiobdellidans and *Acanthobdella peledina* form a monophyletic group of oligochaetes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 21: 346-351.

Siddall M. E., Bely A. E. and E. Borda. 2006. Hirudinida. Chapter 9. In *Reproductive biology and phylogeny of Annelida.* G. Rouse y F. Pliejel (eds.). Enfield, New Hampshire. p. 393-429.

Sket B., Trontelj P. 2008. Global diversity of leeches (Hirudinea) in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 129-137.

Sohn, J. H., Kang H. A., Rao K. J., Kim C. H, Choi E. S., Chung B. H. & Rhee S. K. 2001. Current status of the anticoagulant hirudin: its biotechnological production and clinical practice. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57: 606-613.

Stamatakis A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22(21): 2688-2690.

Trontelj P., Sket B., Steinbruck G., 1999. Molecular phylogeny of leeches: congruence of nuclear and mitochondrial rDNA data sets and the origin of bloodsucking. *Journal of Zoological. Systematics and Evolutionary Research* 37: 141–147.

Trontelj P., Utevsky S. Y. 2005. Celebrity with a neglected taxonomy: molecular systematics of the medicinal leech (genus *Hirudo*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34: 616-624.

Thorp J. H., & Rogers D. C. (eds.) 2015. Thorp & Covich's Freshwater Invertebrates, 4a edición, Volumen 1.: Ecology and General Biology. Academic Press.

Vaillant, L., *Hist. nat. Annelés Hirudiniens* 3: 515, 1890

Vargas P., Zardoya R. 2014. *The Tree of Life: Evolution and Classification of Living Organisms* (English translation by Louise, A.). Sinauer Ass.

Voskresensky A. E. 1859. *MonograWya vrachebnykhpiyavok*. [Monograph of Medicinal Leeches]. S. Petersburg.

Wirchansky B. A. & Shan D. H. 2010. A new species of *Haemopsis* (Annelida: Hirudinea): Evolution of North American terrestrial leeches. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 226-234.

Whitaker I. S., Rao J., Izadi D., Butler P. E., 2004. *Hirudo medicinalis*: ancient origins of, and trends in the use of medicinal leeches throughout history. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 42: 133–137.

Whitman, C. O. (1886). The leeches of Japan. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 26: 317–416.

## VIII. ANEXOS

### VIII.I Anexo 1

El protocolo de Wizard Genomic DNA Purification Kit de Promega se resume en dos grandes que se muestran a continuación.

- a) Digestión de la solución.
  - Solución de digestión: Preparación de una master mix con 200  $\mu$ l de solución de lisis de núcleos, 50  $\mu$ l de EDTA 0.5 M (pH 8), 20  $\mu$ l de proteinasa K a 20 mg/ml y 5  $\mu$ l de solución de RNasa A que da un volumen de 275  $\mu$ l (N+1) con N igual al total de muestras a trabajar.
  - Solución de lavado de columnas (CWA): Añadir 95% de etanol a la botella de CWA de acuerdo a como se indica en la etiqueta. Etiquetar la botella una vez que se le haya añadido el alcohol. Sellar cuidadosamente el CWA y almacenar a temperatura ambiente.
- b) Preparación y lisado de tejido.
  - Se corta una muestra de tejido de aproximadamente 0.5 cm para cada ejemplar y se colocan en un tubo de centrifuga de 1.5 ml por separado.
  - Agregar 275  $\mu$ l del master mix de la solución de digestión a cada tubo de muestra, asegurando que el tejido este cubierto totalmente por la solución de digestión.
  - Incubar los tubos de la muestras toda la noche (16-18 horas) a 55° C en el bloque de calor o a baño maría. No es necesario agitar los tubos durante la digestión.
  - Añadir 250  $\mu$ l del bufer de lisis a cada tubo. Mezclar en el vortex.
  - Procesa el tejido lisado lo más pronto posible después de haber añadido el bufer de lisis. (el lisado debe permancer caliente). Si el lisado no se procesa inmediatamente se puede mantener congelado a -70°C. Sin embargo el lisado congelado debe estar descongelado y caliente a 55°C una hora antes de continuar con la purificación.
- c) Purificación de DNA genómico a partir de lisados usando una microcentrifuga.

Preparar una minicolumna ensamblada para cada lisado. Cada minicolumna ensamblada consiste en una minicolumna y un tubo de colecta. Etiquetar cada tubo de colecta y colocar la minicolumna ensamblada en una rejilla para tubos de microcentrifuga.

- Transferir por completo la muestra de lisado del tubo de microcentrifuga de 1.5 ml a una minicolumna ensamblada.
- Colocar las minicolumnas ensambladas con las muestras del lisado dentro de la microcentrifuga girar a 13 000 rpm durante 3 minutos para retener el DNA genómico en la minicolumna . Si queda algún lisado retenido en la columna después de la primera etapa de giro, volver a girar durante 1 minuto a 13 000 rpm.
- Remover la minicolumna del ensamblaje y descartar el líquido de del tubo de colecta. Colocar nuevamente la minicolumna en el tubo de colecta.
- Añadir 650 µl de CWA a cada minicolumna ensamblada.
- Centrifugar a 13 000 rpm durante un minuto.
- Descartar el líquido del tubo de colecta y colocar nuevamente la minicolumna en el tubo de colecta vacío.
- Repetir los tres pasos anteriores tres veces para obtener un total de cuatro enjuagues de las minicolumnas.
- Después del último enjuague vaciar el tubo de colecta y volver a montar la minicolumna de ensamble. Centrifugar a 13 000 rpm durante 2 minutos para secar la matriz de unión.
- Remover la minicolumna y colocar en un tubo nuevo de microcentrifuga para elución de 1.5 ml. Añadir a la minicolumna 250 µl de agua libre de nucleasa. Incubar por 2 minutos a temperatura ambiente.
- Colocar la minicolumna y el tubo de elución ensamblados en la centrifuga y girar a 13 000 rpm por 1 minuto.
- Retirar la minicolumna y el tubo de elución ensamblados de la centrifuga y añadir otros 250 µl de agua libre de nucleasa en la

minicolumna e incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos y después centrifugar a 13 000 rpm durante 1 minuto.

- El total de la elución debe ser aproximadamente de 500 µl.
- Remover la columna y conservar el tubo de elución. Almacenar de -20 a -70°C.

#### VIII.II Anexo 2

El protocolo DNeasy Blood & Tissue Kit de QIAGEN consta de 8 pasos que se presentan a continuación:

- a) Tejido. Cortar las muestras de tejido en trozos pequeños, y colocar en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml. Añadir 180 µl de buffer ATL. Añadir 20 µl de proteinasa K, mezclar en el vortex e incubar a 56°C hasta que estén completamente lisados. Mezclar en el vortex antes de continuar con el siguiente paso.
- b) Añadir 200 µl de Buffer AL. Mezclar completamente utilizando el vortex.
- c) Añadir 200 µl de etanol (96-100%). Mezclar completamente utilizando el vortex.
- d) Pipetear la mezcla dentro de una columna de giro de DNeasy Mini en un tubo de colecta de 2 ml. Centrifugar a 8 000 rpm durante 1 minuto. Desechar el líquido y el tubo de colecta.
- e) Colocar la columna de giro en nuevo tubo de colecta de 2 ml. Añadir 500 µl de Buffer AW1. Centrifugar por un minuto a 8 000 rpm. Desechar el líquido y el tubo de colecta.
- f) Colocar la columna de giro en un nuevo tubo de colecta de 2 ml, añadir 500 µl de Buffer AW2, y centrifugar durante 3 minutos a 14 000 rpm. Desechar el líquido y el tubo de colecta.
- g) Trasferir la columna de giro a un tubo nuevo de microcentrifuga de 1.5 ml o 2 ml.
- h) Diluir el DNA añadiendo 50 µl de Buffer AE en el centro de la membrana de la columna de giro. Incubar por un minuto a temperatura ambiente. Centrifugar por un minuto a 8 000 rpm.

### VIII.III Anexo 3

A continuación se muestra el protocolo a seguir para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

PCR → 15 µl		PCR → 15 µl		PCR → 25 µl	
H <sub>2</sub> O	9.85	H <sub>2</sub> O	9.25	H <sub>2</sub> O	14.96
10x Buffer	1.5	5X	3	5X	5
MgCl <sub>2</sub>	0.75	F	0.3	F	0.42
dNTPs	0.3	R	0.3	R	0.42
F	0.24	Taq	0.15	Taq	0.2
R	0.24	DNA	2	DNA	4
Tag	0.12				
DNA	2				

Para este trabajo se utilizaron tres programas de amplificación para llevar a cabo la reacción de PCR, uno para cada fragmento de gen.

- La subunidad I del citocromo C oxidasa fue amplificada con un calentamiento de 94°C (5 m), seguido de 35 ciclos de 94°C (45 s), 48-52°C (1 m), 70-72°C (45 s) y una extensión final del 72°C (7 m).
- El fragmento 18s siguió un calentamiento de 95°C (5 m) seguido de 35 ciclos de 95°C (45s), 47-55°C (60 s), 72°C (45 s) y una extensión final de 72°C (7 m).
- El protocolo de amplificación para el fragmento del 28S tiene un calentamiento inicial de 94°C (5 m) seguido de 35 ciclos de 94°C (1 m), 50°C (30 s), 68-70°C (45 s) y una extensión final de 72°C (7 m).