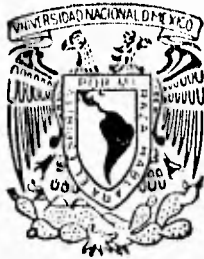


82  
29<sup>00</sup>



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DIFERENCIACION MORFOLOGICA Y MOLECULAR DE LAS  
ESPECIES DEL GENERO (*Floridosentis* Ward, 1953  
(ACANTHOCEPHALA) EN LAS COSTAS DEL  
PACIFICO MEXICANO.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**B I O L O G O**

P R E S E N T A :

**JOSE MARTIN GARCIA VARELA**



**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

1996  
DIVISION DE ESTUDIOS PROGRESIVOS  
DIRECTOR DE TESIS: DR. JUAN PEDRO LACLETTE SAN ROMAN  
FACULTAD DE CIENCIAS  
REGION ESCOLAR

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: Diferenciación Morfológica y Molecular de las Especies del Género Floridosentis Ward, 1953 (Acanthocephala) en las costas del Pacífico Mexicano

realizado por García Varela José Martín

con número de cuenta 8923804-0 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario

Dr. Juan Pedro Laclette

Propietario

Dr. Gerardo Pérez Ponce de León

Propietario

Dr. Marcos Rafael Lamothe Arquemedo

Suplente

M. en C. Luis García Prieto

Suplente

Dra. Virginia León Regañón

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Académico de Biología

COORDINACIÓN GENERAL  
DE BIOLOGÍA

**A MI MAMÁ MARIA DEL CARMEN CON TODO  
CARIÑO Y AMOR, YA QUE SU VIDA ES UN  
EJEMPLO A SEGUIR.**

**A MIS HERMANOS QUE ME AYUDARON A SEGUIR  
ADELANTE CON SUS BUENOS CONSEJOS.**

**A LOS PEQUEÑINES QUE CON SU ALEGRIA HAN  
LLENADO MI VIDA.**

**A LA PERSONA QUE SIEMPRE ESTA EN TODO  
MOMENTO JUNTO A MI.**

## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fué realizada en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas y en el Departamento de Zoología del Instituto de Biología, UNAM, bajo la dirección del Dr. Juan Pedro Laclette, a quien agradezco la oportunidad y la formación académica recibida durante el desempeño del presente trabajo.

Agradezco al Dr. Gerardo Pérez Ponce de León por sus consejos al respecto de mi vocación investigativa y del proyecto de tesis; y por su ayuda con las colectas e identificación del material helmintológico.

Agradezco a los Dres. Gerardo Pérez Ponce de León, Rafael Lamothe Argumedo, Virginia León Regagnon y Juan Pedro Laclette, así como al M. en C. Luis García Prieto, por los comentarios a lo largo del proyecto y durante la revisión del documento de tesis. Sus opiniones mejoraron substancialmente su presentación.

Agradezco al M. en C. Luis García Prieto, de la CNHE por el préstamo de ejemplares.

Agradezco a los Dres. Silvia Antunes y Alfonso Cárabes por su colaboración en las observaciones al microscopio electrónico de barrido.

Agradezco a la Ing. Tzipe Govezensky por el análisis estadístico.

Agradezco a CONACyT por el apoyo financiero con lo cual realicé gran parte de este trabajo.

Agradezco a todos mis compañeros y amigos del laboratorio. Mely, Claudia, Fernando, Sol, Agustín, Ulises, David, Georgina, Luz Maria, Coral, Angélica, Lucero, Berenit, Griselda, Patricia de la Torre, Dayana, José, Carlos, Mariana, Adriana y Laura por la compañía y apoyo que me otorgaron desinteresadamente.

Quiero agradecer de manera muy especial a Maria del Carmen Guzmán por su apoyo y cariño que me ha brindado todos estos años.

Agradezco a mi mamá, a mis hermanos ya que sin su ayuda este trabajo nunca hubiera sido posible.

## INDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1. Biología de los acantocéfalos .....	3
2. Resumen historico del Phylum Acanthocephala.....	3
3. Historia del Género <i>Floridosentis</i> .....	6
4. Distribución geográfica del Género <i>Floridosentis</i> .....	6
5. Antecedentes del Proyecto .....	7
6. Objetivos.....	8
<b>II. MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>9</b>
1. Colecta de Especímenes.....	9
2. Estudio Morfológico .....	9
3. Estudio Molecular.....	10
A. Purificación del DNA Genómico.....	10
B. Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	10
C M13 Digestión del Bacteriófago M13. ....	11
D. Clonación de Fragmentos de PCR en el Bacteriófago.....	11
E. Purificación del DNA de cadena sencilla.....	12
F. Secuenciación de DNA de una sola cadena.....	12
G. Secuenciación de DNA de doble cadena por PCR.....	13
H. Electroforésis de un gel de secuencia .....	13
I. Alineamiento de la Secuencia .....	13

<b>III. RESULTADOS.....</b>	<b>14</b>
1. ESTUDIO MORFOLÓGICO.....	14
2. ESTUDIO MOLECULAR.....	15
<b>IV. DISCUSIÓN.....</b>	<b>17</b>
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>23</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>24</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

La diversidad de la vida es enorme, se han descrito y nombrado alrededor de 400,000 especies de plantas y 1,500,000 especies de animales, y el censo no es ni con mucho completo. Se estima que se conoce sólo el 10% de las especies de plantas y animales (Lamothe, 1987). Los seres vivos son extraordinariamente diversos en cuanto a tamaño, modo de vida y hábitat, así como en cuanto a forma y estructura. El estudio de la biodiversidad se justifica desde un punto de vista biológico puesto que se trata de entender al fenómeno llamado vida, hasta los aspectos económicos y médicos, debido a la efectación que algunos organismos ejercen sobre el ser humano y sus animales domésticos y cultivos. Además, la destrucción acelerada de los ecosistemas, debido al crecimiento poblacional humano, produce la extinción cotidiana de especies. Por lo anterior se intenta descubrir, estudiar y clasificar millones de especies, antes de que desaparezcan (Mayr y Ashlok, 1991).

El hombre se ha preocupado por clasificar a los organismos desde hace mucho tiempo; Aristóteles (384-322 A. C.) y posteriormente sus discípulos y los de Platón, sobre todo Profirio (234-305), clasificaron a los organismos (al igual que a los objetos inanimados) basándose en sus semejanzas. El sistema aristotélico de clasificación fue desarrollado por algunos escolásticos medievales como Alberto Magno (1193-1280) y Tomás de Aquino (1225-1274). Sin embargo, los fundamentos de la taxonomía moderna fueron establecidos hasta el siglo XVIII por Linneo y por el menos conocido Adanson, botánico que desarrolló investigaciones durante el mismo periodo. Otro gran taxónomo, Cuvier entre 1769-1832, sugirió que las semejanzas en la forma se hallan relacionadas con las semejanzas en la función. Lamarck entre 1774 y 1829 dedicó gran parte de su trabajo a la clasificación sistemática de los organismos y propuso que sus semejanzas eran debidas a relaciones ancestrales, con lo que postuló la idea de la evolución de las especies. La teoría de evolución propuesta por Darwin en 1859, ofrece una explicación mecánica de las semejanzas existentes entre los seres vivos. Los organismos evolucionan a partir de otros por un proceso de descendencia con modificación (Mayr y Ashlok, 1991).

Por otra parte la Taxonomía es una rama de la Biología que se encarga en clasificar a cada especie un nombre distintivo, además de formula un sistema de clasificación con base en los caracteres morfológicos de las especies. Este sistema debe por tanto expresar el camino evolutivo y las relaciones filogenéticas de los organismos vivos y de los fósiles (Stunkard, 1957).



Existen grupos muy diversos de invertebrados, entre ellos los helmintos presentan problemas taxonómicos especiales. La clasificación de este grupo como en la mayoría de los organismos, se basa principalmente en el estudio morfológico de los ejemplares. En el caso de los platelmintos o gusanos planos, se consideran especialmente las características del aparato reproductor; para los acantocéfalos o gusanos con cabeza provista de ganchos, se toma en cuenta principalmente la forma y disposición de éstos en la proboscis y la forma y situación de los órganos reproductores de machos y hembras. Por último en el caso de los nemátodos o gusanos redondos, además de la morfología externa y del esófago, también se utiliza el aparato excretor. Sin embargo, en muchas ocasiones la sola morfología no es suficiente para definir una especie, por lo que con frecuencia hay que recurrir a otras fuentes de caracteres relacionados con su fisiología o al estudio de sus formas de desarrollo y a las relación con sus huéspedes. La Taxonomía es por tanto una ciencia integrativa, que se complementa con otras disciplinas como la bioquímica, la embriología, la genética, etc. (Lamothe, 1987).

Al igual que en muchas otras disciplinas, hoy en día, la Biología Molecular está teniendo un fuerte impacto en la taxonomía usando como marcadores a las macromoléculas como: proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos, las cuales son constituyentes moleculares básicos que intervienen en todos los procesos de los seres vivos. La historia natural de los organismos, desde las bacterias hasta el hombre, puede ser reconstruida a partir de la secuencia de nucleótidos del DNA. Los procesos de replicación, transcripción y traducción así como el código genético, son esencialmente uniformes en todos los seres vivos. Estas similitudes también pueden ser utilizadas para clasificar y caracterizar algunos grupos de organismos (Mayr y Ashlok, 1991).

En los últimos años, los genes ribosomales 18S (rRNA 18S) han sido los marcadores más utilizados en estudios de inferencia filogenética, ya que son moléculas altamente conservadas en todos los organismos. Estos genes presentan regiones conservadas y regiones variables que pueden ser seleccionadas de acuerdo a la distancia filogenética de los organismos a comparar (Blair *et al.*, 1996).

## 1. BIOLOGÍA DE LOS ACANTOCÉFALOS

Los acantocéfalos son organismos pseudocelomados, de cuerpo blando, con una proboscis retráctil cubierta de ganchos; carecen de sistema respiratorio y circulatorio así como de aparato digestivo (Crompton, 1970). Son parásitos en todas las etapas de su ciclo de vida y se transmiten aprovechando relaciones depredador-presa entre sus huéspedes. Hasta 1982 se conocían alrededor de 1150 especies (Conway, 1982). Su tamaño corporal puede variar desde 80 cm (*Nephridiacanthus longissimus*), hasta los más pequeños que son apenas perceptibles para el ojo humano (*Octospiniferoides chandleri*) (Schmidt y Canaris, 1967). Presentan sexos separados, con un marcado dimorfismo sexual (Pharshad y Crompton, 1981). El ciclo de vida de los acantocéfalos (Fig. 1) es indirecto y siempre involucra un artrópodo como hospedero intermediario (crustáceos o insectos). Las formas adultas sexualmente maduras se encuentran en el intestino de varias clases de vertebrados; el adulto se desarrolla cuando el artrópodo es ingerido por el hospedero definitivo (Crompton, 1970). Los acantocéfalos parecen haber surgido de los priapúlidos, ya que presentan estructuras similares como la proboscis cubierta con ganchos, el cuello, tronco y el pseudoceloma, así como la disposición de órganos reproductores, además la comparación morfológica del registro fósil de priapúlidos con formas actualmente vivientes reveló que el posible ancestro de los acantocéfalos es la especie *Ancolagon minor*. Otro rasgo que relaciona a los acantocéfalos con los priapúlidos es la presencia de protonefridios en algunas especies de acantocéfalos consideradas como ancestrales. Se estima que los acantocéfalos aparecieron a mediados del Cámbrico hace aproximadamente 550 millones de años (Conway, 1982).

## 2. RESUMEN HISTÓRICO DEL PHYLUM ACANTHOCEPHALA.

El primer registro de un acantocéfalo data de 1684 y fue realizado por Redi. Leeuwenhoek en 1695 describió dos acantocéfalos que se encontraban en el intestino medio de una anguila, determinados por Meyer hasta 1932 como *Acanthocephalus anguillae*. El primer nombre científico para un acantocéfalo, *Echinorhynchus*, fue propuesto por Zoega y Müller en 1776. Posteriormente, este mismo nombre fue reconocido a nivel de género cuando se publicó la decimotercera edición de *Systema Naturae* de Linneo entre 1788 y 1793 (En Crompton, 1970).

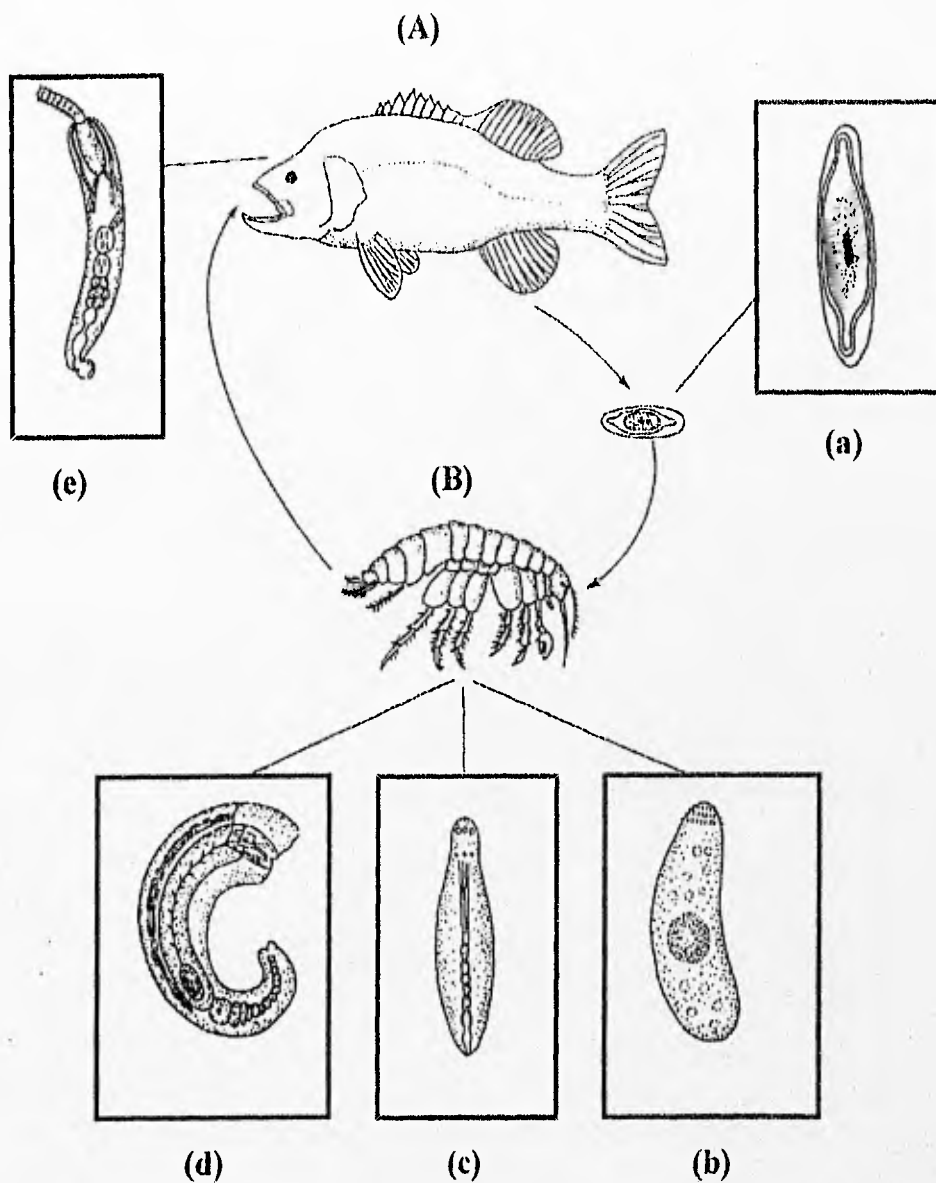


Fig 1. Ciclo de vida de un Acanthocéfalo tomado de Schmidt (1988). Huésped definitivo (A); Huésped intermediario (B); Huevo (a); Acanthor (b); Acantela (c); Cistacanto (d); Adulto (e).

En 1803 Zeder nombró a este grupo de parásitos como "Hakenwormer", que significa gusanos con ganchos y Rudolphi, entre 1802 y 1809, los renombró como *Acanthocephala* (del griego akanto = espinoso, kephale = cabeza). Este mismo autor aceptó la clasificación de Linneo, colocando a los acantocéfalos a nivel de orden junto con los tremátodos, céstodos y nemátodos en la Clase Vermes. Hamann 1889 (En Crompton, 1970) percibió la diversidad de los acantocéfalos y decidió dividir al género *Echinorhynchus* en tres familias: Echinorhynchidae, Gigantorhynchidae y Neorhynchidae, basándose en el arreglo de la proboscis y en la estructura de la pared del cuerpo.

Hasta 1925 se consideró que los acantocéfalos debían situarse en el Phylum Nemathelminthes a nivel de orden con tres subórdenes: Neorhynchidae, Echinorhynchidae y Gigantorhynchidae (Southwell y Macfie 1925). Thapar (1927) estableció tres órdenes: Acanthogyridea, Echinorhynchidea y Apororhynchidea, tomando en cuenta las espinas del tronco y de la proboscis. En 1932, Mayer propuso que el grupo se colocara como una clase de Aschelminthes y la dividió en dos órdenes: Paleacanthocephala y Archiacanthocephala, con base al sistema lagunar, presencia y ausencia de protonefridios, arreglo de los ganchos de la proboscis, aparato reproductor, así como también en la transmisión y establecimiento de la infección. Finalmente, un tercer orden, Eoacanthocephala, fue establecido por Van Cleave (1936).

En 1948 apareció la revisión de la clase Acanthocephala realizada por Van Cleave, quien señaló que su relación con los céstodos era más cercana que con los nemátodos y propuso su elevación a nivel de Phylum con dos clases y cuatro órdenes:

Clase Metacanthocephala

Órdenes Paleacanthocephala y Archiacanthocephala

Clase Eoacanthocephala

Órdenes Gyranthocephala y Neoacanthocephala

Este esquema no fue aceptado por Petrochenko (1956) quien argumentó que los caracteres externos seleccionados por Van Cleave eran secundarios y a veces convergentes, por lo que propuso un nuevo esquema considerando al Phylum Acanthocephales Rudolphi, 1808 con una sola clase Acanthocephala y la dividió en tres subclases: Neoechinorhynchinea, Echinorhynchinea y Gigantorhynchinea. La primera es sinónimo de la clase Eoacanthocephala Van Cleave, 1936 y las otras dos de la clase Metacanthocephala Van Cleave, 1936. En 1963, siguiendo el esquema propuesto por Petrochenko, Yamaguti elevó a las subclases de Petrochenko a nivel de orden añadiendo

Finalmente, la clasificación propuesta por Meyer Van Cleave fue revisada y actualizada por Bullock (1969), quien propuso como características a nivel de orden el tamaño del cuerpo, tipo de huésped, número de glándulas de cemento, receptáculo de la proboscis, membrana del embrión y el patrón de espinas de la larva acantor. La clasificación más aceptada actualmente se basa en el sistema de Meyer Van Cleave y ha sido revisada recientemente por Amin (1985 y 1987):

Clase Archiacanthocephala Meyer, 1931

Orden Apororhynchida Thapar, 1927

Orden Oligacanthorhynchida Southwell y Macfane, 1925

Orden Giganthorhynchida Petrochenko, 1956

Orden Moniliformida Schmidt, 1972

Clase Paleacanthocephala Meyer, 1931

Orden Echinorhynchida Southwell y Macfane, 1925

Orden Polymorphida Petrochenko, 1956

Clase Eoacanthocephala Van Cleave, 1936

Orden Gyraacanthocephala Van Cleave, 1936

Orden Neoechinorhynchida Southwell y Macfane, 1925

Clase Polyacanthocephala Amin, 1987

Orden Polyacanthorhynchida Amin, 1987

### 3. HISTORIA DEL GÉNERO *FLORIDOSENTIS* (WARD, 1953)

El género *Floridosentis* fue establecido por Ward (1953), a partir de acantocéfalos colectados en el intestino de peces en la península de Florida (*Mugil cephalus*), describiendo la especie *F. elongatus*. En 1962, Bullock comparó la diagnosis de *F. elongatus* con la de *Atactorhynchus mugilis*, (Machado Filho, 1951) acantocéfalos de peces brasileños, concluyendo que las dos especies de parásitos eran sinónimo, y propuso un nuevo nombre *Floridosentis mugilis*, (Machado Filho, 1951) Ward, 1953. Posteriormente el género *Floridosentis* fué colocado en la Familia Neoechinorhynchidae y en la Subfamilia Atactorhynchinae por Yamaguti (1963). Bravo (1969) describió una nueva especie del género *Floridosentis* a partir de ejemplares colectados en dos especies de mugílidos (*M. cephalus* y *M. curema*) en las costas del Pacífico mexicano. Este mismo autor comparó los parásitos colectados en *Mugil cephalus* de la Paz, Baja California y de Mazatlán, Sinaloa, con los de *Mugil curema* de Salina Cruz, Oaxaca, y observó que los ejemplares eran muy semejantes en cuanto a estructura y distribución de los órganos, carácter que asemeja al género *Floridosentis*, sin embargo, consideró a los parásitos de *Mugil curema* como pertenecientes a una especie distinta, por ser de talla corta y robusta, porque los ganchos de la proboscis son menos desarrollados y porque la diferencia en el tamaño de los lemniscos es muy marcada. Con base en lo anterior, propuso una nueva especie, *F. pacifica*, que junto con *F. mugilis*, son las únicas especies que conforman al género *Floridosentis* (Amin, 1985).

### 4. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DEL GÉNERO *Floridosentis*

El género *Floridosentis* tiene una distribución geográfica muy amplia, encontrándose prácticamente en toda América parasitando el intestino de dos especies de mugílidos *M. curema* y *M. cephalus*. El primer registro se realizó en Río de Janeiro Brasil (Machado Filho, 1951) y posteriormente en Florida, E.U.A. por Ward en 1953, este género también se registro en costas venezolanas (Conroy y Torrealba, 1980). En México, el género fue inicialmente registrado en las costas de Jalisco y Oaxaca por Bravo (1969) y también fue reportado en Mazanillo por Salgado y Barquin (1978). Posteriormente, ha sido también encontrado en la Presa el "Infiernillo" en Michoacán (Osorio, 1982) y en Topolobampo, Sinaloa (Juárez y Salgado, 1989) en *Mugil cephalus*. En las costas del Golfo de México, ha sido registrado parasitando a *M. curema* en la

Laguna de Tamialhua, Veracruz (Chávez y Montoya, 1988) por último en la misma localidad este helminto se ha encontrado parasitando a *Mugil cephalus* ( Méndez, 1993).

## 5. ANTECEDENTES DEL PROYECTO

En una serie de observaciones de ejemplares del género *Floridosentis* colectados en las costas del Pacífico mexicano, hemos tenido dificultades para diferenciar ambas especies por lo que consideramos que las características para determinar a *F. pacifica* de *F. mugilis* tienen un escaso valor taxonómico. Lo anterior nos motivó para realizar una revisión de los caracteres diagnosticos de ambas especies con base en ejemplares disponibles en colecciones y realizando nuevas colectas en las localidades señaladas por Bravo (1969). Inicialmente se revisaron ejemplares depositados en la Colección Nacional de Helmintos (CNHE) , incluyendo los ejemplares de Bravo (1969); Salgado y Barquin (1978); Osorio (1982); Juárez y Salgado (1989); Chavéz y Montoya (1988) y Méndez (1993). Para completar la comparación, se colectaron nuevo ejemplares que fueron examinados en el microscopio de luz y en el de barrido. Adicionalmente, se purificó DNA genómico total de los ejemplares nuevos para amplificar una region del gen ribosomal 18S por medio de una reacción en cadena de la polimerasa. Finalmente, se obtuvieron las secuencias de nucleótidos de ambas especies que fueron comparadas después de alinearlas.

## 6. OBJETIVOS.

### OBJETIVOS GENERALES.

- 1.- Determinar la validez taxonómica de *F. pacifica* Bravo, 1969 mediante el uso de caracteres morfológicos y moleculares.

### OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1.- Discutir la validez taxonómica de los caracteres diagnosticos entre *Floridosentis mugilis* y *Floridosentis pacifica*.
- 2.- Realizar un análisis comparativo de la morfología de ambas especies.

3.- Secuenciar una región de alrededor de 600 pares de bases (pb) de los genes ribosomales 18S de ambas especies.

4.- Efectuar una comparación morfológica y molecular de *Floridosentis mugilis* y *Floridosentis pacifica*.



## II. MATERIALES Y METODOS

### 1. COLECTA DE ESPECÍMENES.

La captura de los huéspedes, *Mugil curema* (Valenciennes, 1836) se realizó en dos localidades del Pacífico Mexicano, en el estero de Juchitán, que se sitúa al este de Salina Cruz, Oaxaca, y en el estero de la Bahía de Chamela, Jalisco, en Septiembre y Octubre de 1995, donde se recolectaron un total de 110 peces procedentes de la captura comercial.

A cada uno de los huéspedes se les practicó un examen para diagnóstico helmintológico. Cada pez fue disectado mediante una incisión sobre la superficie ventral, desde el ano hasta la región de los opérculos. El intestino fue extraído y colocado en una caja de Petri con solución salina al 0.6 %, desgarrándolo en toda su longitud con la ayuda de agujas de disección. Los acantocéfalos encontrados fueron separados del tejido con pinceles y se colocaron en una caja de Petri con solución salina al 0.6%. La fijación de los ejemplares se realizó de dos formas: una parte se colocó en frascos homeopáticos con agua destilada, manteniéndolos en refrigeración a 4<sup>o</sup> C durante 12 horas, para posteriormente fijarlos en etanol al 70%. Otra parte del material se colocó directamente en frascos con etanol absoluto, método que permite la adecuada conservación del organismos y la subsecuente purificación del DNA genómico total.

### 2. ESTUDIO MORFOLÓGICO

Los acantocéfalos conservados en etanol al 70% se tificaron con paracarmín de Mayer, hematoxilina de Van Cleave, carmín clorhídrico y tricrómica de Gomori; todo el material fue montado con bálsamo de Canadá, elaborando preparaciones permanentes.

Los ejemplares colectados fueron analizados morfométricamente y sus caracteres se compararon con los presentados en descripciones anteriores: Machado Filho (1951); Chávez y Montoya (1988) y Méndez (1993). Los ejemplares disponibles en la CNHE de Bravo (1969); Salgado y Barquin (1978); Osorio (1982); Juárez y Salgado (1989); con los números de catálogo 587, 646, 614, 635 y 638 respectivamente fueron analizados. Los ejemplares colectados de *F. mugilis* y *F. pacifica*, mejor conservados se dibujaron al microscopio de luz con la ayuda de una cámara clara y fueron medidos con un ocular micrométrico. Los ejemplares representativos se depositaron en la CNHE, con los números de catálogo 2868 y 2869.

Para el estudio morfométrico se realizó un análisis estadístico univariado (ANOVA) y multivariado (MANOVA) en donde se compararon ejemplares de las dos

especies del género *Floridosentis* procedentes de diferentes localidades del Pacífico mexicano, utilizando como variables la longitud del cuerpo tota (L<sub>t</sub>), del lemnisco binucleado (L<sub>b</sub>) y del lemnisco uninucleado (L<sub>u</sub>).

### 3. ESTUDIO MOLECULAR

**A. Purificación del DNA genómico:** Los ejemplares de *F. pacifica* y *F. mugilis* colectados fueron fijados en etanol absoluto. Para purificar su DNA genómico total se siguió el método propuesto por Sambrook *et al.*, (1989) que consiste en incubar los gusanos en una solución que contiene una mezcla de proteinasas (Proteinasa K), a 50°C por 3 a 4 horas en 0.5 M. EDTA , 5 % sarkosyl y 0.1 mg/ml. Posteriormente, el DNA fue extraído una vez con Fenol y dos veces con cloroformo.

**B. Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** Para la amplificación de un fragmento de los genes ribosomales 18S de cada ejemplar de *Floridosentis*, se utilizaron los oligonucleótidos JLR4 indirecto 3' CCCGGATCCCCCTTTGTACACACCGCCCG 5' (3384-3400) y JLR9 directo 5' GAAACTTAAAGGAATTCACGG 3' (2297-2317). Los números entre paréntesis indican las posiciones de los genes 18S en donde se une cada oligonucleótido y corresponden a las secuencias que flanquean la región variable V7. La mezcla de reacción para la PCR contenía en un volumen final de 100 µl: 70.5 µl de H<sub>2</sub>O, 10 µl dNTP's 0.2 mM, 10 µl del buffer compuesto por KCl 50mM y Tris-Cl 10mM; 0.5 µl dithiotreitol 1mM, 5 µl MgCl<sub>2</sub> 30 mM, 1µ de templado, 1µ de cada oligonucleótido (100 pmols/λ) y 1 µl de la DNA polimerasa 2U/ µl ,

El programa utilizado en el termociclador fue como sigue:

- 1.- 94°C 3 min
- 2.- 50°C 3 min
- 3.- 72°C 3 min
- 4.- 94°C 1 min
- 5.- repetir 5 veces a partir del 2
- 6.- 50°C 1 min
- 7.- 72°C 1 min
- 8.- 94°C 1 min
- 9.- repetir 30 veces a partir del 6
- 10.- 50°C 5 min
- 11.- 72°C 10 min
- 12.- 4°C 24 h

Al terminar la PCR los productos fueron analizados en un gel de agarosa al 1% en buffer de Tris-Boratos (TB), aplicando 5  $\mu$ l de la mezcla de cada reacción.

Para la purificación de los fragmentos amplificados, los restantes 95  $\mu$ l fueron precipitados adicionándoles 0.1 partes de acetato de sodio 0.3 M y 2.5 partes de etanol absoluto frío, manteniendo la mezcla a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante 45 minutos, centrifugando a 12,000 g a  $4^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos y resuspendiendo en 10  $\mu$ l de agua bidestilada. Los 10  $\mu$ l fueron aplicados a un solo carril de un gel recién preparado de agarosa al 1% en buffer de Tris-Acetatos (TAE). Las bandas correspondientes a los fragmentos fueron recortadas del gel para ser purificadas por el método de adsorción con polvo de vidrio (Vogelstein y Guillespie, 1979) siendo resuspendidas en 20  $\mu$ l de Tris-Edta (TE).

*C. Digestión del bacteriófago M13:* La digestión del vector se llevó al cabo con 10  $\mu$ l DNA de M13, 10  $\mu$ l del buffer No.4 (BRL), 2  $\mu$ l de la enzima Sma-I que corta la secuencia 5'-CCC/GGG-3', 3'-GGG/CCC 5' y produce extremos ciegos, en un volumen final de 100  $\mu$ l a  $16^{\circ}\text{C}$  por una hora. La reacción se detuvo por incubación de 10 minutos a  $65^{\circ}\text{C}$ . posteriormente 2  $\mu$ l de la digestión son analizados en un gel de agarosa al 1%.

*D. Clonación de fragmentos de PCR en el bacteriófago M13:* Para ligar los fragmentos purificados en un vector de secuenciación, se rellenaron sus extremos con la subunidad Klenow de la DNA polimerasa, siguiendo la técnica de Sambrook *et al.*, (1989). En breve, 8  $\mu$ l de cada fragmento purificado se le agregó 5  $\mu$ l buffer Eco-RI 10X, 5  $\mu$ l dNTP's 0.2 mM, 5 U/ $\mu$ l del fragmento Klenow de la DNA polimerasa y 31  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O bidestilada. La reacción se dejó a temperatura ambiente por 30 minutos y se tomó una muestra de aproximadamente 20  $\mu$ l del la mezcla anterior y se le adicionó una cantidad equivalente en términos molares del bacteriófago M13mp19 previamente digerido con Sma-I, haciendo extracciones con fenol y cloroformo antes de precipitar con etanol. Finalmente, la mezcla de M13mp19 y el fragmento se resuspende en 20  $\mu$ l de volumen de reacción: 0.5 U/ $\mu$ l de ligasa T4  $\mu$ l, 14  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O, 1  $\mu$ l de ATP 10 mM, 4  $\mu$ l buffer de ligasa (BRL) 5X, durante toda la noche a  $16^{\circ}\text{C}$ . La mezcla se precipitó con etanol y se resuspendió en 10  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O bidestilada. La transformación de las células competentes bacterianas TG1 (40  $\mu$ l) se lleva al cabo por electroporación con una aparato BTX modelo 600, usando 2  $\mu$ l de la mezcla de ligación. Las bacterias transformadas fueron crecidas en 1 ml de medio Luria Bertani (LB) por 1 h. y sembradas sobre cajas del mismo medio en una capa de agar al 0.7% conteniendo 1.5 mg de Blue-gal que es un análogo colorido de galactosa y 0.48 mg del inductor IPTG. Las bacterias infectadas por M13 transformantes se identificaron como placas de color blanco que carecen de actividad de  $\beta$ -galactosidasa (Sambrook *et al.*, 1989).

E. *Purificación del DNA de cadena sencilla de M13*: Para secuenciar los insertos de M13, se purificó DNA de cadena sencilla del M13. Para ello, las placas blancas se picaron con un palillo estéril, sembradas en 5 ml de medio LB con 100  $\mu$ l de un cultivo nocturno de células TG1, dejando crecer a 37°C. por 5-6 h con agitación continua. Se tomó 1 ml del cultivo y se centrifugó a velocidad máxima (12,000 g) en una microfuga Eppendorf durante 10 min y se colectó el sobrenadante. A este mismo se le adicionaron 220  $\mu$ l de Polietilenglicol al 20% y 0.5 M NaCl dejando reposar por 30 minutos y centrifugando; el precipitado fue resuspendido en TE. Las proteínas virales fueron extraídas con fenol-cloroformo. El DNA finalmente se precipitaba con etanol y resuspendido en agua. Una muestra de 1  $\mu$ l del DNA de cadena sencilla se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% como se describió arriba.

F. *Secuenciación del DNA*: La secuenciación de los fragmentos de DNA se llevó al cabo por el método de terminación de la cadena por dideoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977) utilizando el Kit de secuenasa (United States Biochemical Corporation) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. El alineamiento del oligonucleótido al DNA fue incubando 1  $\mu$ g del templado de una sola cadena con 0.5 pmol del oligonucleótido universal, adicionándole 2  $\mu$ l del buffer que contenía 250mM de MgCl<sub>2</sub>, 250mM de NaCl y 200 mM de Tris-HCL a pH 7.5; calentando la mezcla a 65 °C durante 2 minutos y dejando enfriar, hasta una temperatura menor a 35°C durante aproximadamente 30 minutos.

La reacción de marcado se llevó al cabo durante 5 a 10 minutos a temperatura ambiente, añadiendo a la mezcla de alineamiento los siguientes reactivos: 2 $\mu$ l de la mezcla de dNTPs que contenía dGTP 7.5  $\mu$ M, dCTP 7.5  $\mu$ M, dTTP 7.5  $\mu$ M; 1 $\mu$ l de Ditioneitol (DTT) 0.1 M; 0.5  $\mu$ l de dATPs <sup>35</sup>S 1250 mCi/mmol, 2 $\mu$ l de secuenasa diluida 1:8 en TE. Separadamente y en 4 tubos diferentes se colocaron 2.5 $\mu$ l de los dideoxinucleótidos ddA, ddC, ddG, ddT; precalentando los cuatro tubos a 37°C durante al menos 1 minuto, justo antes que terminara la reacción de marcado. Al concluir dicha reacción de marcado, 3.5  $\mu$ l de ésta se colocaron en el primer tubo y la mezcla resultante se reincubó a 37°C durante 5 a 30 minutos. Este paso se repitió con cada tubo. La reacción fue detenida con 4 $\mu$ l de la solución bloqueadora y se mantuvo en hielo hasta realizar la electroforesis de secuencia.

G. *Secuenciación de DNA de doble cadena por PCR*: La secuencia de los fragmentos de DNA se obtuvo por una combinación de PCR e inhibición de las cadenas por dideoxinucleótidos, usando el kit de CircumVent (New England BioLabs) la reacción de PCR se realizó de la siguiente manera; en dos tubos Eppendorf por separado se agregaron 3 µl los oligonucleótidos JLR-4 y JLR-9 10.5 pmol/λ, 5 µl de H<sub>2</sub>O bidestilada, 1 µg de DNA producto de PCR, 1.5 µl <sup>35</sup>S 1250 mCi/mmol, 1.5 µl de buffer 10X, 1 µl tritón 100X, 1 µl de la enzima Vent-polimerasa 2U/ µl por último se tomaron 3.2 µl de la mezcla anterior y se le agregaron a 4 tubos diferentes en donde se colocaron 3 µl de los dideoxinucleótidos ddA, ddC, ddG, ddT; para posteriormente emplear el termociclador; al finalizar, al producto de PCR se le adicionaron 4 µl de la solución bloqueadora.

H. *Electroforésis de un gel de secuencia*: las muestras de reacción fueron previamente calentadas a 80°C durante 2 minutos, y cargadas en un gel de poliacrilamida al 6%, compuesto por 30 g de urea ultrapura, 14 ml H<sub>2</sub>O, 9.5 ml acrilamida al 38% que contenía bis acrilamida al 2%, 14 ml del buffer TBE al 5X, 550 µl de persulfato de amonio 50 mg/ml y 20 µl Temed en un buffer de TBE. Antes de colocar las muestras se efectuó una precorrida de 45 minutos a 1,400-2,000 voltios y 35-40 miliamperios, para calentar el gel a 55 °C.

I. *Alineamiento de las secuencias*: Las secuencias de *F. pacifica* y de *F. mugilis* obtenidas fueron analizadas y alineadas usando el programa computacional PC-Genie (Intelligenetics Inc).

### III . RESULTADOS

Puesto que el objetivo del presente trabajo de tesis es determinar la validez taxonómica de *F.pacifica* utilizando caracteres morfológicos y moleculares, los resultados se encuentran divididos en dos secciones. La primera se refiere al aspecto morfológico, en donde se describe brevemente a *F.mugilis* y *F.pacifica*; evaluando de manera estadística las diferencias observadas en las estructuras consideradas diagnósticas para diferenciar a las especies, como el largo y ancho de los lemniscos, así como el número y tamaño de los ganchos de la proboscis, estos últimos fueron examinados con microscopía electrónica de barrido.

La segunda sección presenta un análisis del material genético de ambas especies. En el presente trabajo se obtuvieron secuencias parciales del gen ribosomal 18S, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

#### I ESTUDIO MORFOLOGICO.

Para el estudio morfológico se utilizaron ejemplares obtenidos por colectas realizadas en Salina Cruz, Oaxaca, *F. pacifica* y en Chamela, Jalisco, correspondientes a la especie *F. mugilis*; realizando una descripción de cada especie (Fig 2-5). Los ejemplares identificados como *F.mugilis* y *F.pacifica* mostraron un gran variación morfológica en el tamaño de los lemniscos haciendo difícil su diferenciación. En consecuencia fue necesario la comparación de los ejemplares depositados en CNHE. La conclusión del análisis preliminar fue que existe una amplia variación de las características de ambas especies, haciendo la diagnosis incierta.

Para determinar si hay una diferencia entre las medidas de los ejemplares de *F.mugilis* y *F.pacifica*, depositados en la CNHE y los colectados por nosotros, se realizó un estudio morfométrico global (Tabla 1). Las comparaciones iniciales mostraron que no hay diferencias en cuanto a la disposición, forma y tamaño de los órganos internos (testículos, glándula de cemento, bolsa de Saefftingen, y para hembras, útero, campana uterina etc.). Para averiguar si existe una diferencia entre la forma y tamaño de los ganchos de la proboscis de las dos especies de *Floridosentis*, se realizó un estudio de microscopía electrónica de barrido, encontrándose que la forma y distribución de los ganchos, eran similares en especímenes que se ajustaban a la descripción de ambas especies (Fig 6-7). Adicionalmente a esta información se midieron los ganchos de la

proboscis de los ejemplares depositados en la CNHE, notándose una fuerte variación entre individuos de la misma especie y localidad.

Para determinar objetivamente si existen diferencias significativas en las medidas obtenidas de los ejemplares de las dos especies, particularmente para los lemniscos uninucleados y binucleado así como para los ganchos apicales, medios y basales de la proboscis, se realizó un análisis gráfico y estadístico.

Inicialmente, se compararon gráficamente las medidas de los lemniscos uninucleados y binucleados en relación con la longitud total del parásito. La introducción de la longitud del helminto corrige las diferencias de tamaño de los lemniscos (Fig 8).

Posteriormente, se realizó un análisis estadístico univariado tomando por separado las variables longitud total (Lt), longitud del lemnisco uninucleado(Lu), longitud del lemnisco binucleado(Lb), razón Lu/Lt y razón Lb/Lt. El análisis de varianza (ANOVA) mostró que existen diferencias significativas en cuanto a la longitud del cuerpo, adicionalmente se realizó un análisis de varianza multivariado (MANOVA) tomando como variables Lb, Lt y Lu con una significancia del 95%, de igual modo, este análisis demostró que existen diferencias significativas para las variables anteriores (Fig.9).

## 2 ESTUDIO MOLECULAR.

Para obtener las secuencias parciales de los genes ribosomales 18S de *F. mugilis* y *F. pacifica*, se purificó DNA genómico a partir de organismos de las dos especies, a través de un procedimiento que consiste simplemente en aplicar una mezcla de proteinasas que digieren todo el material del tejido del parásito hasta que lo único que se mantiene es el DNA. Esto ocurre puesto que también las enzimas que degradan al DNA son proteínas que también se destruyen por las proteinasas. Posteriormente se retiran los productos de degradación del tejido y las proteinasas a través de extracciones con fenol y con cloroformo. Una vez obtenido un DNA de alta pureza se determina su tamaño por una electroforésis en geles de agarosa al 1%. Como se muestra en la figura 10, la mayor parte del DNA purificado de especímenes de *F. mugilis* y *F. pacifica* migra en la parte superior del gel, por arriba de los 23 kpb, indicando que el DNA purificado se encuentra en un buen estado de conservación.

La amplificación de una región del gen 18S que rodea a la región variable V7, se llevó al cabo por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En la

PCR se utilizan oligonucleótidos sintéticos con una secuencia complementaria a una región conservada del DNA genómico (Fig. 11). Estos oligonucleótidos actúan como iniciadores de la reacción de polimerización de nucleótidos catalizada por la DNA polimerasa-I. Puesto que la reacción se lleva al cabo por una serie de ciclos (alrededor de 30) de desnaturalización del DNA, la alineación de los oligonucleótidos y crecimiento de la cadena de DNA, el resultado es una gran amplificación de la región del DNA delimitado por los oligonucleótidos. En la figura 12 se muestra un producto de alrededor de 520 pb obtenido de la PCR, usando como templado el DNA genómico total de *F. mugilis* y *F. pacifica*.

El producto de PCR es separado en geles de agarosa al 1% en Tris-acetatos (TAE). Se recortó la región del gel donde migra la banda de DNA y se purifica por afinidad al polvo de vidrio. Al DNA recién purificado se le adicionó la DNA polimerasa con la subunidad Klenow que rellena los extremos incompletos de DNA, esta reacción se llevó al cabo a temperatura ambiente. Posteriormente al DNA se le adiciona el bacteriófago M13mp19 (Fig. 13) que es previamente digerido con la enzima Sma-I que corta en extremos ciegos. El corte que realiza la enzima se encuentra dentro del gen de la  $\beta$ -galactosidasa. Posteriormente, se limpia la mezcla con extracciones fenol-cloroformo y se precipita con acetato de sodio y etanol. La ligación de los productos de PCR con el bacteriófago, se llevó al cabo con ligasa T4. Después de la ligación, se realiza la transformación (infección con el bacteriófago) de la *E. coli*. Las bacterias transformantes se sembraron en medio mínimo y fueron seleccionadas por su color blanco y no azules como las que presentaban M13 sin inserto. Se obtuvieron alrededor de 50 colonias, un grupo de cinco fueron analizadas purificando el DNA del bacteriófago, para observar por medio de una electroforésis en gel de agarosa, si su movilidad estaba cambiada debido a la presencia del inserto. El análisis reveló que 4 de las 5 colonias presentaban el inserto (resultados no mostrados).

La secuenciación de los fragmentos (insertados en el bacteriófago) se realizó por la técnica de terminación de las cadenas por dideoxinucleótidos (Sanger, 1977). Este procedimiento permitió determinar una secuencia de 520 nucleótidos de los genes 18S de *F. mugilis* y *F. pacifica*. Las secuencias completas fueron analizadas y alineadas en computadora. La comparación de las secuencias 520 pb, (Fig. 14) muestra que existen solamente ocho cambios de nucleótidos entre *F. mugilis* y *F. pacifica*



Phylum Acanthocephala Rudolphi, 1808  
Clase Eoacanthocephala Rudolphi, 1808  
Orden Neoechinorhynchidae Southwell y Macfie, 1925  
Subfamilia Atyactorhynchidae Yamaguti, 1963  
Género *Floridosentis* Bullock, 1962  
*Floridosentis mugilis* Machado Filho, 1951

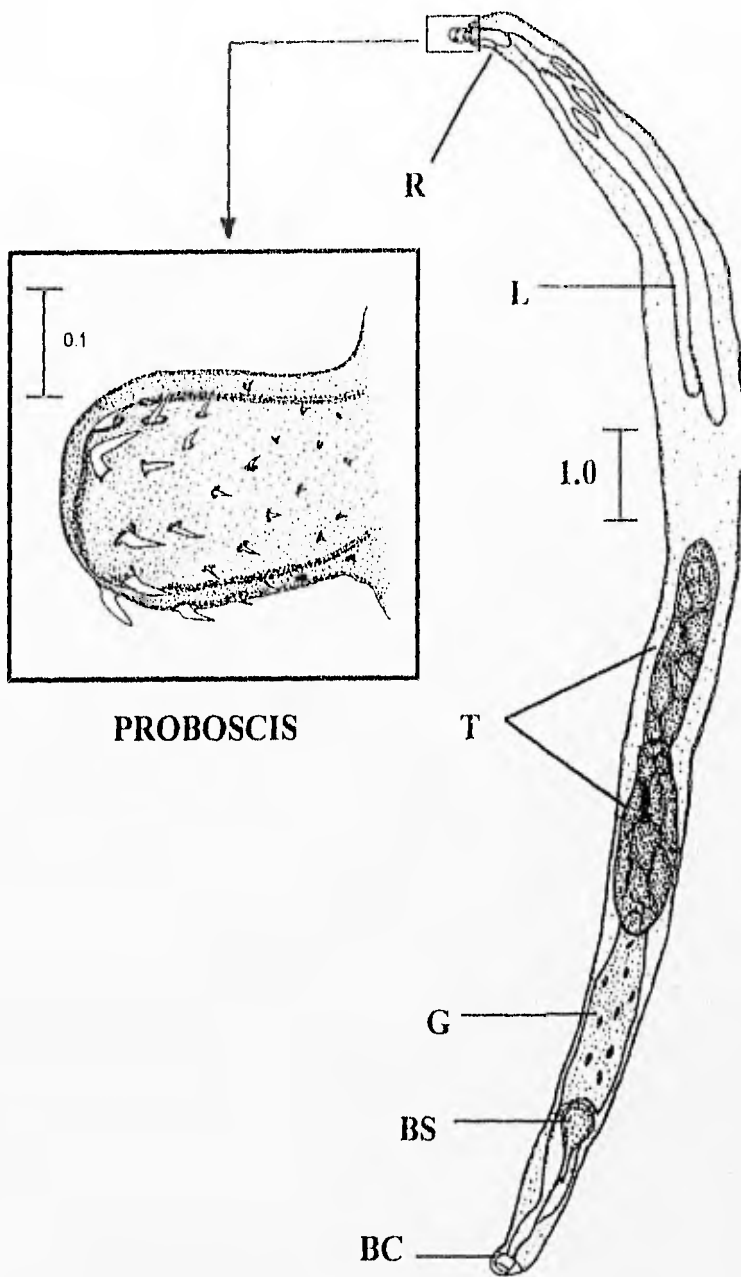
La caracterización está basada en 15 ejemplares (seis machos y nueve hembras) colectados en el estero de Chamela, Jal. entre el 10 y 11 de Octubre de 1995 en *Mugil curema*.

(Figuras 2-3).

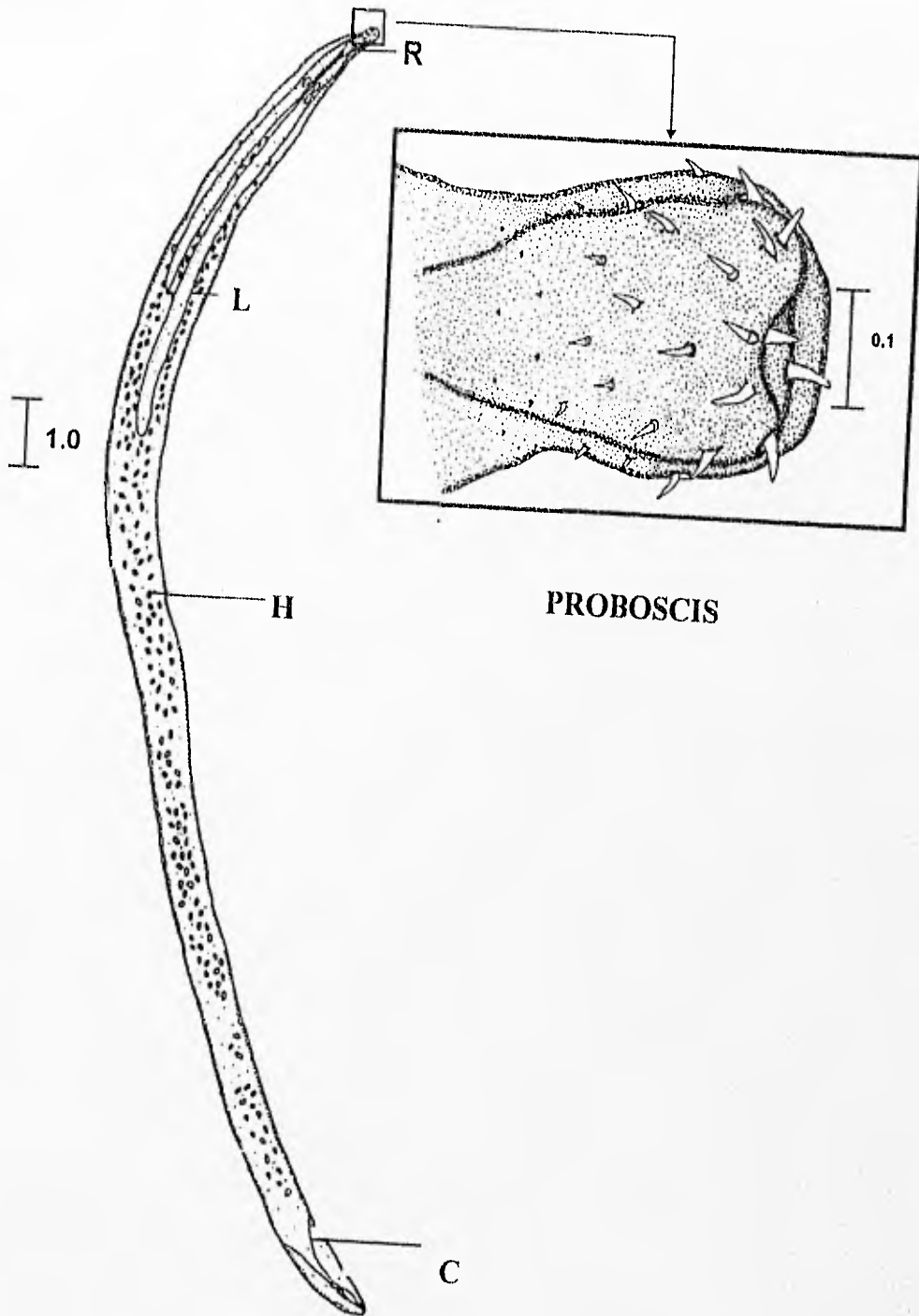
Estos parásitos son alargados, cilíndricos, delgados y ligeramente recurvados; por lo general, las hembras son más grandes que los machos; la proboscis es cilíndrica y está armada con ocho hileras de ganchos dispuestos diagonalmente; cada hilera presenta siete ganchos; los ganchos del primer círculo son los de mayor talla y los siguientes ganchos van disminuyendo de tamaño en sentido anteroposterior; el cuello de estos helmintos es muy corto; el receptáculo de la proboscis es sacular, presenta una sola capa muscular; los lemniscos no son muy largos, ya que apenas alcanzan una cuarta parte del cuerpo, siendo el binucleado un poco más largo y ancho que el lemnisco uninucleado.

**MACHOS.** Estos vermes presentan un par de testículos más o menos ovoides; el testículo posterior está directamente en contacto con la glándula de cemento, en donde se encuentran nueve núcleos; por debajo de la glándula de cemento se localiza el reservorio de esta glándula, que desemboca en el pene por dos conductos que pasan a los lados de la bolsa de Saefftingen y más abajo se encuentra la bolsa copulatrix.

**HEMBRAS.** Las hembras son de mayor tamaño; la mayoría se encontraban grávidas; el aparato reproductor ocupa la porción posterior del cuerpo; la campana uterina tiene una forma sacular; el útero es tubular, de paredes musculares y la vagina también es tubular y angosta.



**Fig. 2.** *Floridosentis mugilis* (Machado Filho, 1951) Ward 1953. Preparación total de un macho recolectado en *Mugil curema*. BC, bolsa copulatríz; BS, bolsa de Saeffingen; G, glándula de cemento; L, lemniscos; R, receptáculo de la proboscis; T, testículos.



**Fig. 3.** *Floridosentis mugilis* (Machado Filho, 1951) Ward, 1953 preparación total de una hembra recolectada en *Mugil curema*. C, campána huterina; H, huevo; L, lemniscos; R, receptáculo de la proboscis.

Género *Floridosentis* Bullock, 1962

*Floridosentis pacifica* Bravo, 1969

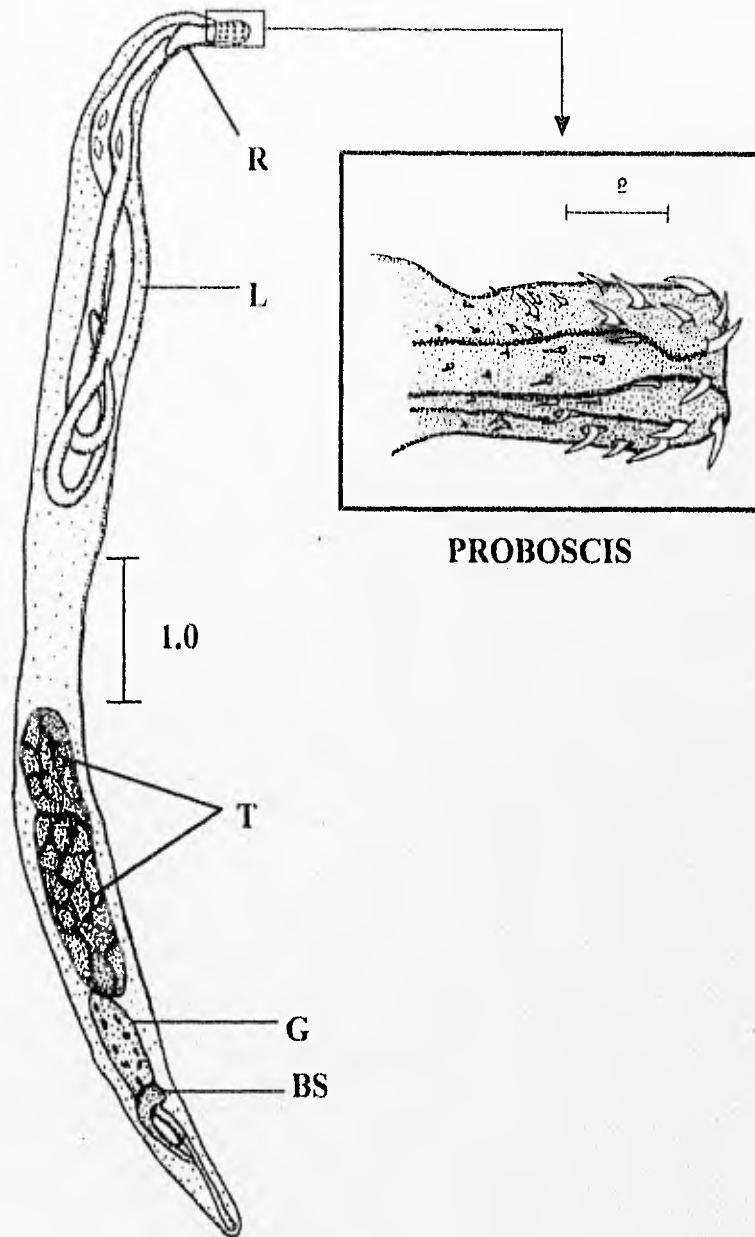
El material de la presente caracterización se basa en 18 ejemplares (diez hembras y ocho machos) que se encontraban parasitando el intestino medio de *Mugil curema*, colectados entre el 7 y 9 de Septiembre de 1995 en Salina Cruz, Oax.

(Figuras 4-5)

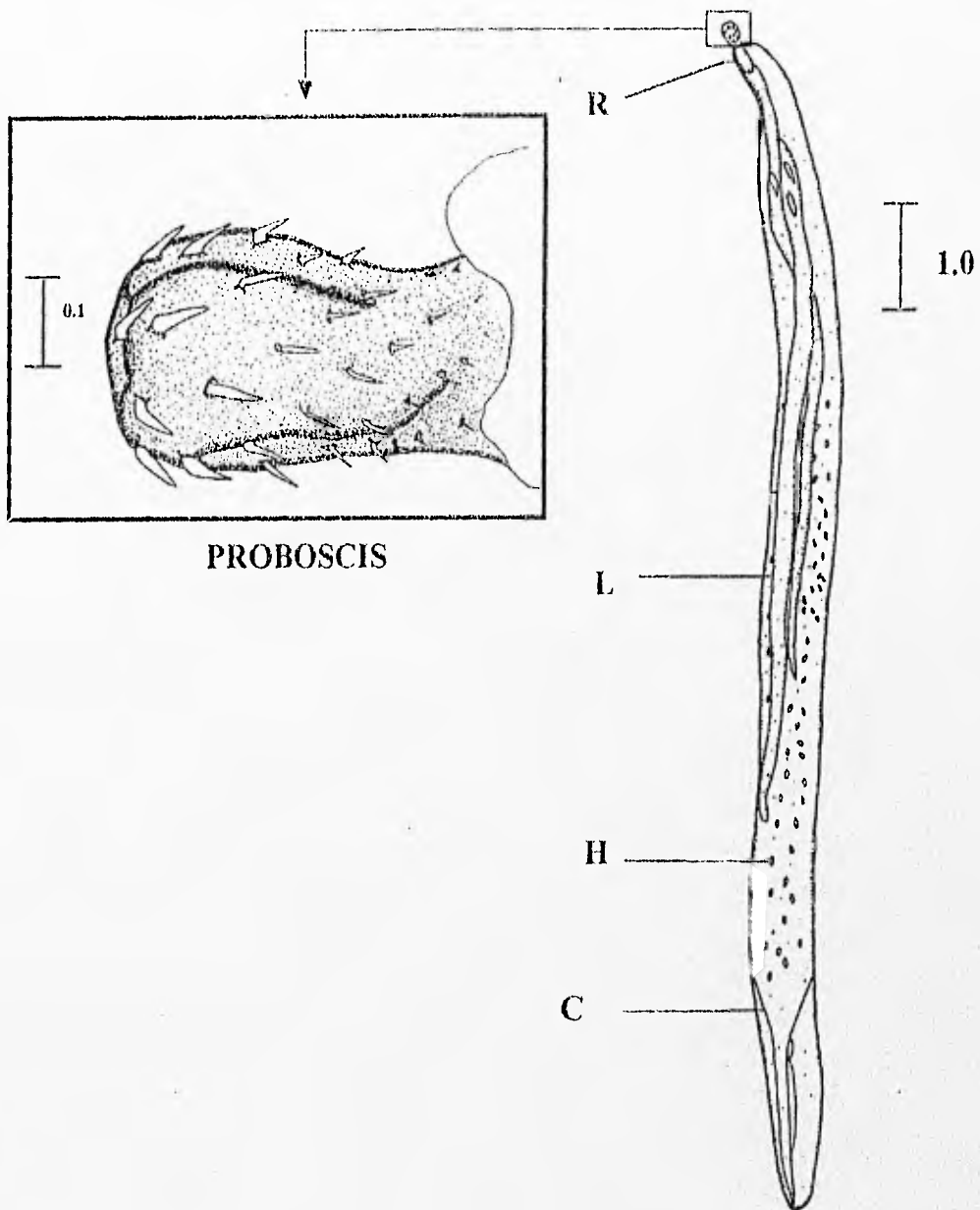
Estos parásitos son de cuerpo alargado, cilíndricos con los extremos acentuadamente más angostos. La proboscis es pequeña y subcilíndrica, está armada con ganchos distribuidos en ocho hileras diagonales en sentido longitudinal y con siete ganchos en cada hilera que van disminuyendo de tamaño en sentido anteroposterior; el cuello de estos helmintos es muy corto; el receptáculo de la proboscis es claviforme y presenta una sola capa muscular; los lemniscos son muy alargados ya que sobrepasan más de la mitad del cuerpo, en especial el lemnisco binucleado que es mucho más largo y ancho que el lemnisco uninucleado.

**MACHOS.** Presentan un par de testículos más o menos ovoides, el testículo posterior se encuentra en contacto con la glándula de cemento la cual contiene nueve núcleos, por debajo de esta se encuentra el reservorio de la glándula de cemento que desemboca en el pene por dos conductos que pasan a lado de la bolsa de Saefftingen.

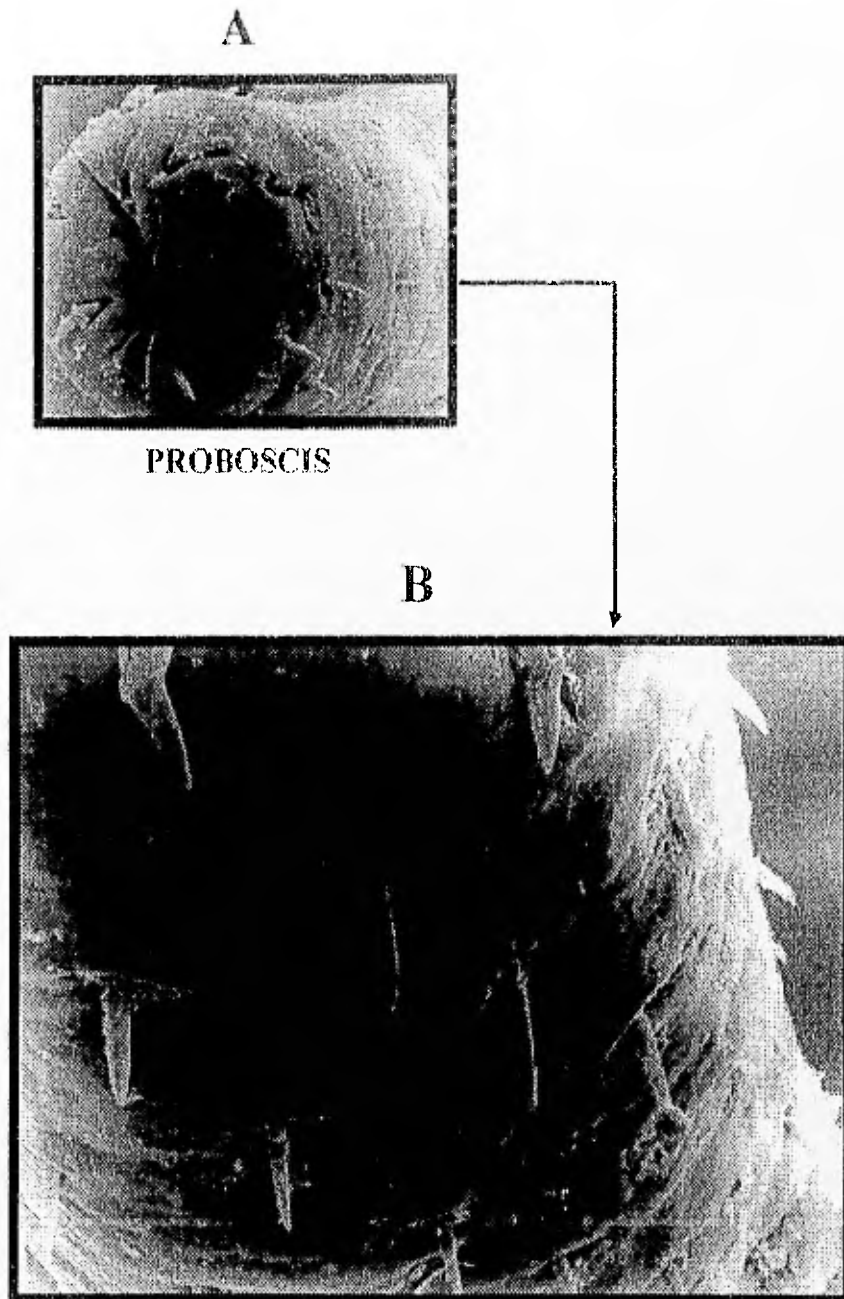
**HEMBRAS.** La mayoría de las hembras se encontraban grávidas; el aparato reproductor ocupa la porción posterior del cuerpo; la campana uterina tiene una forma sacular; el útero es tubular de paredes musculosas; la vagina también es tubular y angosta.



**Fig. 4.** *Floridosentis pacifica* Bravo, 1969. Preparación total de un macho recolectado en *Mugil curema*. BS, bolsa de Saefftingen; G, glándula de cemento; L, lemniscos; R, receptáculo de la proboscis; T, testículos.



**Fig.5** . *Floridosentis pacifica* Bravo,1969. Preparación total de una hembra recolectada en *Mugil curema*. C, campana uterina; H, huevos; L, lemniscos; R, receptáculo de la proboscis.



**Fig. 6.** Micrografías electrónicas de barrido de la proboscis de *F. mugilis*.  
A: 15KV X 720; B 15KV X 1300.

A



PROBOSCIS

B

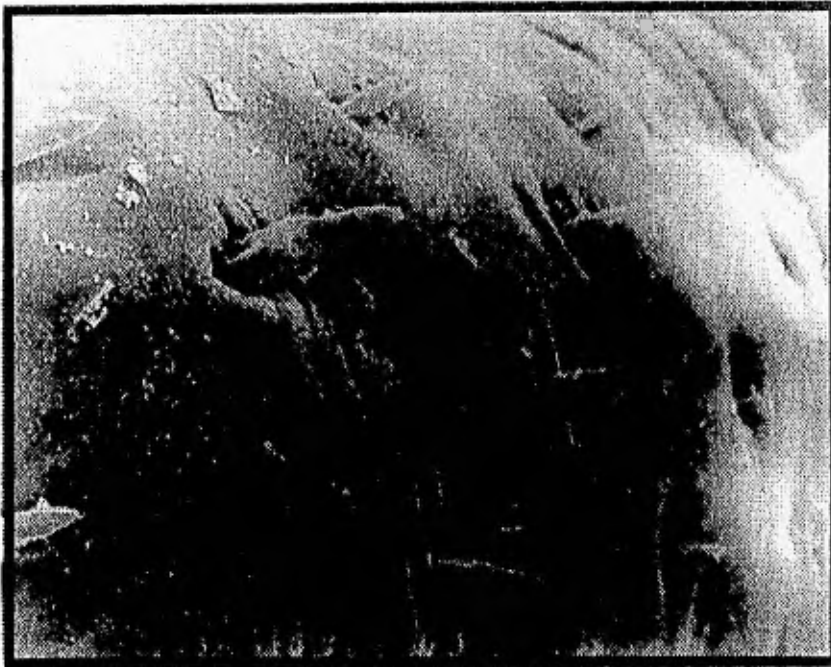
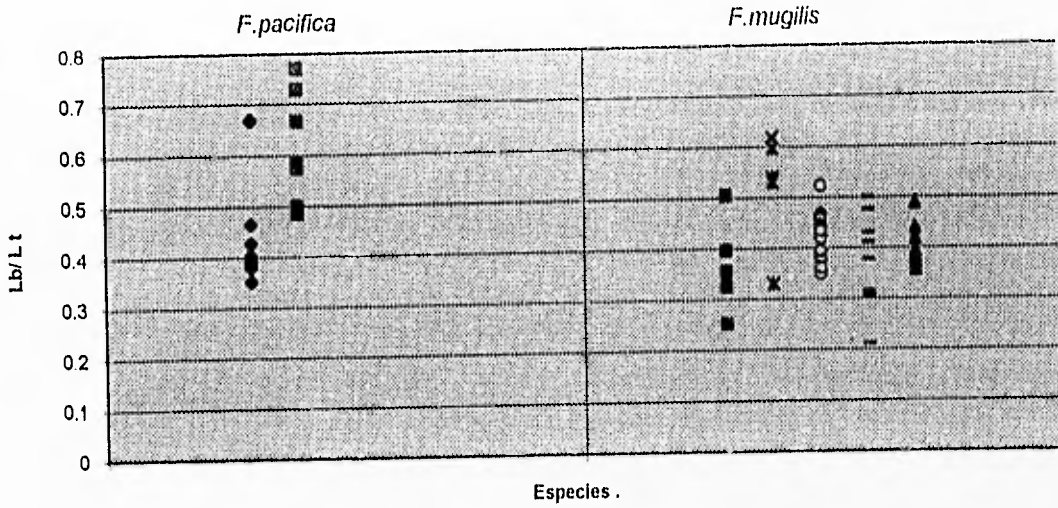


Fig.7. Micrografías electrónicas de barrido de la proboscis de *F.pacifica*. A:15KV X 720; B 15KV X 1300.



A



B

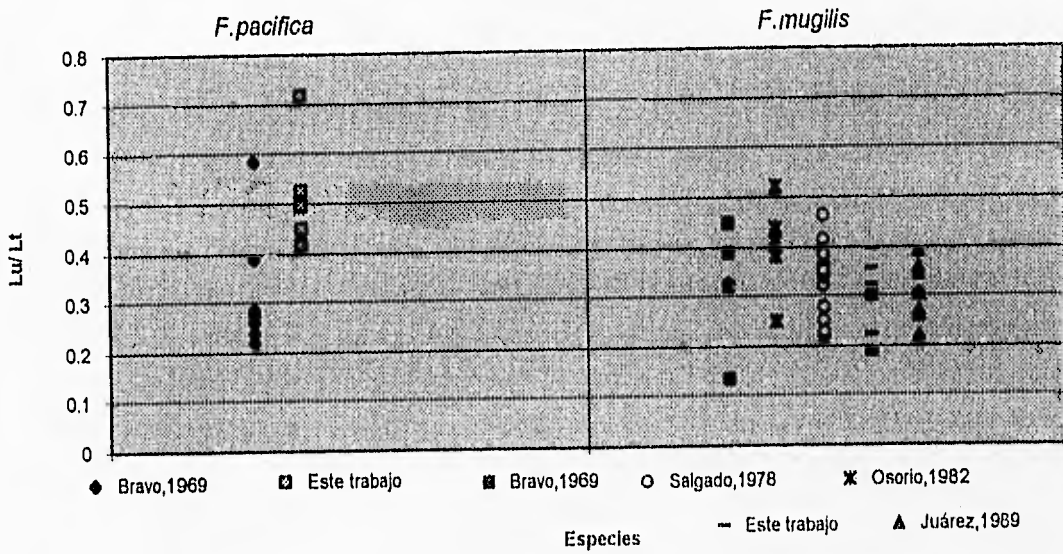


Fig. 8. Gráficas A y B en donde se muestra la relación de la longitud de los lemniscos con la longitud del cuerpo de *F. mugilis* y *F. pacifica*.

Clasificación con el  
Análisis Discriminante.

Clasificación  
Taxonómica.

	1	2
	<i>F.pacifica</i>	<i>F.mugilis</i>
1	5	10
<i>F.pacifica</i>	33.3%	66.7%
2	3	38
<i>F.mugilis</i>	7.32%	92.6%

**Fig.9.** Resultados del análisis discriminante en donde se muestra el porcentaje de aceptación de las especies 1. *F. pacifica* y 2. *F. mugilis*.



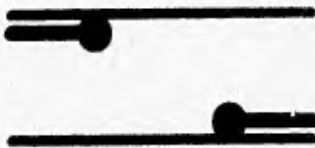
**Fig.10.** Análisis del DNA total obtenido por purificación fenol-cloroformo en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. 1. *F.mugilis* 2. *F.pacifica* 3. Marcador  $\lambda$  Hind III.



94 °C. Temperatura de desnaturalización del DNA.



54 °C. Temperatura a la cual los iniciadores se acoplan al DNA.



72 °C. Temperatura en la que la DNA polimerasa reconoce el sitio de inicio y sintetiza la nueva cadena de DNA.

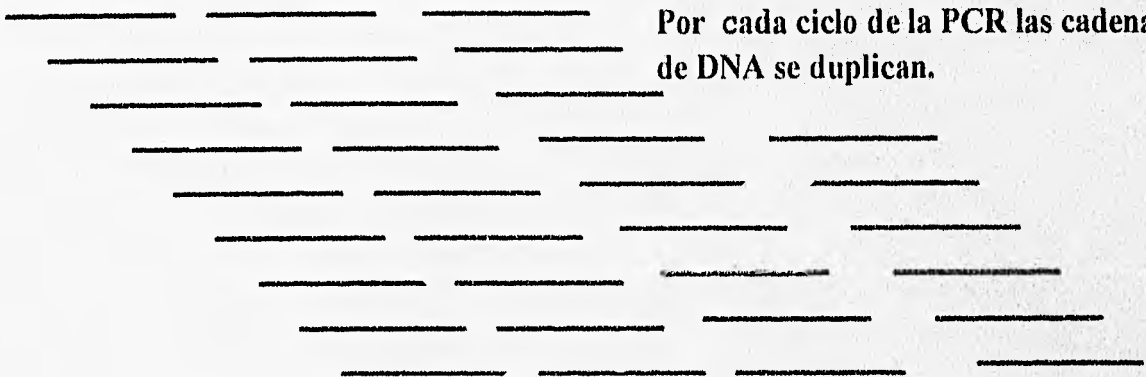
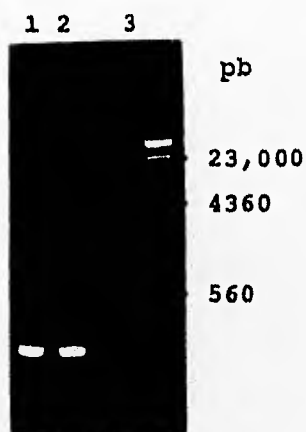
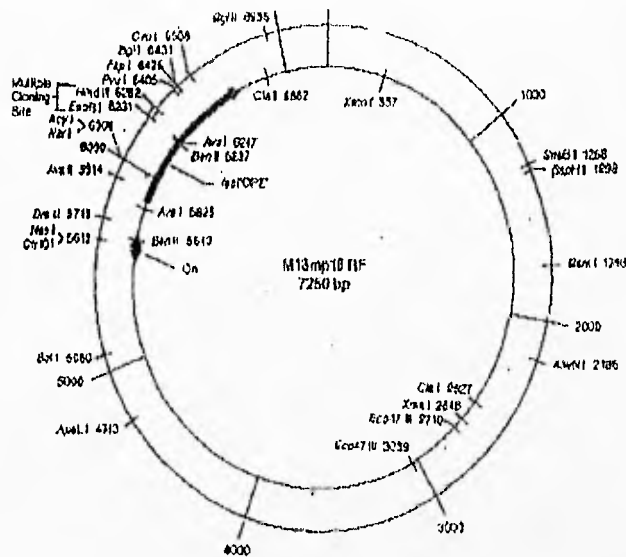


Fig.11. Reacción en cadena de la polimerasa ( PCR ) en donde se muestra la síntesis de las nuevas cadenas de DNA, a partir de una sola cadena.



**Fig. 12.** PCR con los oligonucleótidos (JLR 4 y JLR 9) que flanquean en la región variable V7 a partir de DNA genómico de *F.mugilis* y *F.pacifica*, en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio en donde se observa el resultado de la PCR. 1: *F. mugilis*; 2: *F.pacifica*; 3: Marcador  $\lambda$  Hind III. El fragmento amplificado es de 520 pb.



M13 mp19 multiple cloning site and primer binding region: 6201-6320

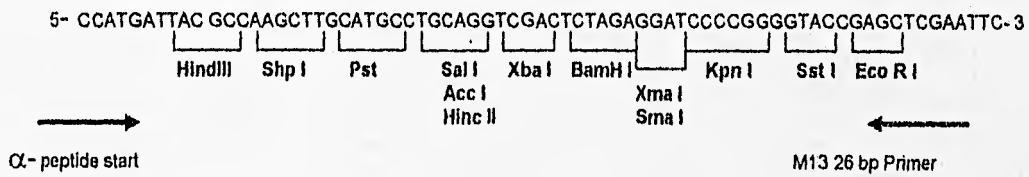


Fig. 13. Mapa de restricción de M13mp19 en donde se indica el sitio de clonación de los fragmentos de DNA de *F. mugilis* y *F. pacifica*.

		1148
<i>F. pac</i>	GAAACTTAAAGGAATTCACGGAGGGGCACACCAGAAGTGGCGTGCGGCTCAATTTGACT	
<i>F. mug</i>	.....	
		1208
<i>F. pac</i>	CAACGCACGAAAACCTACTCGGTCCGAACACCGTGAGGATTGACAGGTTGAAAGCTCTTT	
<i>F. mug</i>	.....	
		1268
<i>F. pac</i>	CTTGATTCGGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCCGTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGGTT	
<i>F. mug</i>	.....	
	V7	1328
<i>F. pac</i>	TATTCCGATAACGAACGAGACTCTAGCCTATTAATTAGTGAAGCGAGCTAACCAGTCCGG	
<i>F. mug</i>	.....T..G.G.....	
		1388
<i>F. pac</i>	TGGTAATGCCGCTCATACTTCTTAAAGAGGGACAAGTGTCGTGAGACACTCGAAGTTGAG	
<i>F. mug</i>	....G.....	
		1450
<i>F. pac</i>	CAATAACAGGTCGTGATGCCCTTAGATGTTCCGGGCTGCACGCGCGCTACAATGAAGGC	
<i>F. mug</i>	.....	
		1510
<i>F. pac</i>	ATCAAAAAGCGCTCCTGCTCCGAAAGGAATAGGAAATCAAAAATAGCCTTACGATTTGGG	
<i>F. mug</i>	.....T.....C.....	
		1570
<i>F. pac</i>	ATCGGAGATTGAAATTATTCTTCGTGAAAGAGGAATTCCTAGTAAACGCGAATCATTATT	
<i>F. mug</i>	.....T.....	
		1621
<i>F. pac</i>	TCGCGTTGACTAAGTCCCTGCCGTTTGTACACACCGCCCG	
<i>F. mug</i>	.....C.....	

**Fig.14.** Alineación de la secuencia de nucleótidos del Gen 18S ribosomal de *F. mugilis* y *F. pacifica* . La zona sombreada corresponde a la región variable V7. Los cambios fuera de la región variable se representan con negritas, los nucleótidos idénticos se muestran con puntos (.)

Tabla I. Comparación Morfométrica entre machos de *F. mugilis* y *F. pacifica*.

Especie.		<i>F.pacifica</i>	<i>F.pacifica</i>	<i>F.mugilis</i> *	<i>F.mugilis</i>	<i>F. mugilis</i>
Autor.		Bravo,1969	Este trabajo	Machado Filho, 1951	Bravo, 1969	Osonó, 1982
Localidad.		Salina Cruz, Oax.	Salina Cruz, Oax.	Río de Janeiro,Brasil.	Mazatlán, Sinaloa	Infiernillo,Mich
Hospedero.		<i>Mugil curema</i>	<i>Mugil curema</i>	<i>Mugil platamus</i>	<i>Mugil cephalus</i>	<i>Mugil cephalus</i>
Longitud total		5.43-13.98	10.32-11.8	13.32-13.87	12.46-26.96	6.14
A.media del cuerpo		0.59-0.98	0.57-0.8		0.54-0.67	
Proboscis	Largo	0.25-0.33	0.30	0.46	0.37-0.42	0.16-0.32
	Ancho	0.12-0.19	0.13	0.14	0.20-0.21	0.14-0.144
R.Proboscis	Largo	0.392-0.60	0.34-0.67	0.51-0.57	0.60-0.94	0.19-0.21
	Ancho	0.12-0.15	0.10-0.16	0.13-0.15	0.18-0.22	0.8-0.11
L.uninucleado	Largo	2.3-3.8	5.1-6.2	4.0	5.5-8.2	2.1-3.9
	Ancho	0.10-0.13	0.12-0.15	0.13	0.13-0.20	0.8-0.19
L.binucleado	Largo	2.7-5.6	6.3-7.8	6.7	6-9.1	2.7-4.3
	Ancho	0.12-0.18	0.14-0.16	0.16	0.15-0.20	0.11-0.23
Testículo Anterior	Largo	1.1-2.2	1.1-1.5	1.21-2.5	1.21-4.7	0.25-0.27
	Ancho	0.33-0.51	0.38-0.42	0.31-0.40	0.35-0.49	0.17-0.18
Testículo Posterior	Largo	1.3-2.0	1.2-1.53	1.93-2.7	1.36-4.5	0.23-0.24
	Ancho	0.33-0.52	0.41-0.47	0.35-0.46	0.27-0.37	0.16-0.17
Glándula de cemento	Largo	0.61-1.84	0.81-1.17		1.17-0.28	0.21-0.54
	Ancho	0.32-0.6	0.25-0.33		0.37-0.41	0.10-0.18
Ganchos	Apicales	0.029-0.030	0.033-0.039	0.034-0.052	0.047-0.053	0.038-0.050
	Medios	0.013-0.021	0.021-0.030		0.026-0.040	0.022-0.028
	Basales	0.005-0.006	0.012	0.014-0.020	0.013	0.017-0.018

(\*) Los datos de estos ejemplares se tomaron de la literatura.



<i>F. mugilis</i> Júarez y Salgado, 1989 Topolobampo Sin. <i>Mugil cephalus</i>	<i>F. mugilis</i> * Chávez y Montoya, 1988 Tamiagua, Ver. <i>Mugil curema</i>	<i>F. mugilis</i> Salgado y Barquin, 1978 Manzanillo <i>Mugil cephalus.</i>	<i>F. mugilis</i> * Méndez, 1993 Tamiagua, Ver. <i>Mugil Cephalus</i>	<i>F. mugilis</i> Este trabajo Chamela, Jal. <i>Mugil curema</i>
8.09-23.95	9.52-18.01	8.14-20	6.66-20	12.5-14.2
0.37-1.17			0.21-0.93	0.25-0.70
0.25-0.40 0.11-0.19	0.32-0.39 0.13-0.29	0.34-0.37 0.151	0.22-0.6 0.7-0.19	0.25-0.31 0.15-0.16
0.61-1.32 0.9-0.30	0.68-1.33		0.38-1.16 0.7-0.24	0.41-0.55 0.15
3.4-7.6 0.50-0.61	0.13-0.26	3.9-5.1 0.10-0.16		3.9-4.21 0.16-0.18
4.0-8.9 .06-0.19	0.9-0.20	4.2-4.7 0.10-0.16		5.2-6.3 0.18-0.23
0.80-3.32 0.20-0.62	0.15-0.42 0.19- 1	1.0-1.8 0.22-0.48	0.54-2.7 0.15-0.42	1.82-2.0 0.28-0.48
	0.30-1.7 0.45-0.90	1.1-1.2 0.20-0.51	0.28-3.18 0.11-0.5	2.2-2.5 0.37-0.63
		0.81-1.62 0.16-0.44		0.20-1.40 0.28-0.37
0.047-0.063 0.037-0.045 0.018-0.026	0.033-0.041 0.010-0.014	0.041-0.057 0.008-0.016	0.034-0.054 0.020-0.047 0.013	0.028-0.033 0.015-0.018 0.010-0.012

Continuación de la TABLA I. Comparación Morfométrica entre hembras de *F. mugilis* y *F. pacifica*.

Especie. Autor.		<i>F. pacifica</i> Bravo, 1969	<i>F. pacifica</i> Este trabajo	<i>F. mugilis</i> . * Machado Filho, 1951	<i>F. mugilis</i> Bravo, 1969	<i>F. mugilis</i> Osorio, 1982
Localidad.		Salina Cruz, Oax.	Salina Cruz, Oax.	Rio de Janeiro, Brasil.	Mazatlán, Sinaloa	Infiernillo, Mich
Hospedero.		<i>Mugil curema</i>	<i>Mugil curema</i>	<i>Mugil platanus</i>	<i>Mugil cephalus</i>	<i>Mugil cephalus</i>
Longitud total		8.05-18.5	4.61-9.84	13.6	15.2	
A. media del cuerpo		0.61-1.3	0.25-0.48		0.68-1.13	
Proboscis	Largo	0.27-0.33	0.24-0.31	0.46-0.52	0.31-0.52	0.24-0.34
	Ancho	0.15-0.19	0.9-0.13	0.14-0.17	0.16-0.24	0.16-0.16
R. Proboscis	Largo	0.41-0.75	0.20-0.33		0.68-1.40	0.41-0.66
	Ancho	0.13-0.20	0.6-0.12		0.10-0.23	0.10-0.26
L. uninucleado	Largo	3.24-6.8	2.56-5.0	5.9	4.63-9.6	3.27-4.8
	Ancho	0.9-0.15	0.5-0.12	0.13	0.15-0.22	0.10-0.30
L. binucleado	Largo	4.8-8.8	3.21-7.0	7.0	6.6-10.1	3.8-5.7
	Ancho	0.13-0.16	0.5-0.17	0.20	0.16-0.22	0.19-0.30
Huevos	Largo	0.020-0.027	0.03-0.045	0.030-0.051	0.023	
	Ancho	0.006	0.003	0.005-0.011	0.008	
N. gigantes	Largo	0.021-0.37	0.08-0.15		0.26-0.56	
	Ancho	0.7-0.10	0.45-0.8		0.91-0.11	
Ganchos	Apicales	0.034-0.041	0.033-0.039	0.034-0.052	0.042-0.063	0.043-0.051
	Medios	0.018-0.020	0.018-0.030		0.016-0.037	0.031-0.036
	Basales	0.005-0.010	0.003-0.012		0.010-0.016	0.010-0.013

<i>F. mugilis</i> Júarez y Salgado, 1989 Topolobampo, Sin <i>Mugil cephalus</i>	<i>F. mugilis</i> * Chávez y Montoya, 1988 Tamiagua, Ver. <i>Mugil curema</i>	<i>F. mugilis</i> Salgado y Barquin, 1978 Manzanillo <i>Mugil cephalus</i> .	<i>F. mugilis</i> * Méndez, 1993 Tamiagua, Ver. <i>Mugil Cephalus</i>	<i>F. mugilis</i> Este trabajo Chamela, Jal. <i>Mugil curema</i>
16.5-34.8	12.5-40.0	9.0-35.0	3.6-26.0	13.7-30.0
0.483-0.579	0.66-1.18		0.9-0.20	0.57-1.05
0.28-0.32 0.11-0.16	0.22-0.40 0.13-0.22	0.29-0.34 0.14-0.20	0.15-0.43 0.64-0.16	0.26-0.37 0.18-0.19
0.77-1.49 0.14-0.26	0.55-1.33 0.16-0.32	0.31-0.91 0.10-0.30	0.26-1.41 0.6-0.19	0.52-0.55 0.15-0.23
3.1-5.9 0.6-0.8	0.4-2.2 0.8-0.29	3.0 0.74		3.7-6.66 0.13-0.32
3.54-7.2 0.07-0.11	0.59-2.45 0.082-0.29	3.26 0.74		0.06-0.012 0.003-0.6
0.015-0.018 0.002-0.003	0.024-0.035 0.007-0.009	0.020 0.004	0.012-0.019 0.018-0.057	0.06-0.012 0.003-0.0060
				0.13 0.36
0.037-0.060 0.30-0.48 0.015-0.026	0.045-0.53 0.029-0.041 0.009-0.025	0.012-0.053	0.037-0.054 0.023-0.037 0.017-0.023	0.032-0.043 0.014-0.026 0.003-0.009

#### IV. DISCUSIÓN

Los acantocéfalos del género *Floridosentis* son parásitos de mugílidos registrados en Brasil, Venezuela, México y E.U. En México, este género parece estar representado por dos especies: *F. mugilis* (Machado Filho, 1951) Ward, 1953 y *F. pacifica* Bravo, 1969. Puesto que se trata de especies con un número reducido de diferencias morfológicas, su taxonomía presenta dificultades especiales.

Inicialmente se propuso la existencia de dos especies: *F. elongatus* Ward, 1953 y *Atactorhynchus mugilis* Machado Filho, 1951, sin embargo, una comparación morfológica posterior (tamaño de los ganchos de la proboscis, receptáculo de la proboscis, tamaño de los lemniscos y forma del cuerpo) llevó a la definición de una sola especie que se denominó *F. mugilis* (Bullock, 1962). Esta sinonimia es aceptada en la revisión más reciente sobre la clasificación de los acantocéfalos (Amin, 1985).

Los ejemplares colectados en el presente trabajo exhiben las características diagnósticas descritas por Bullock (1962) para el género *Floridosentis*. Este género se caracteriza por la forma general del cuerpo que es siempre alargado, cilíndrico, delgado y ligeramente recurvado; presentan una proboscis cilíndrica globular muy pequeña, que se encuentra armada con ocho hileras de ganchos, cada una formada por siete ganchos que van disminuyendo de tamaño en sentido anteroposterior; además los lemniscos de estas especies son muy largos.

El análisis de las descripciones originales de *F. mugilis* y *F. pacifica* reveló la existencia de sólo dos caracteres distintivos entre ambas especies: 1. los ganchos de la proboscis son más largos y delgados en *F. mugilis*. 2. el lemnisco binucleado es mucho más largo que el uninucleado en *F. pacifica* que en *F. mugilis*.

El interés en la comparación de ambas especies se originó, cuando se experimentaron dificultades al identificar algunos especímenes colectados de *Mugil curema* en Salina Cruz, Oax. y en Chamela, Jal. Al ser comparados los ejemplares de Salina Cruz con los ejemplares tipo de *F. pacifica* (Bravo, 1969), se encontró que, en efecto, la relación entre las longitudes de los lemniscos era la esperada. En cambio, los ejemplares de Chamela presentaban una gran diversidad morfológica; en algunos ejemplares el lemnisco binucleado era mucho más largo que el uninucleado mientras que otros eran casi iguales. Por consiguiente, los ejemplares de Chamela fueron comparados con otros que habían sido determinados como *F. mugilis* por diversos autores: Bravo, (1969); Salgado y Barquin, (1978); Osorio, (1982); Chávez y Montoya,

(1988); Juárez y Salgado, (1989) y Méndez ,(1993). Sorprendentemente, en los ejemplares se observó también una gran variación de los caracteres diagnósticos, aún entre individuos colectados en la misma localidad, variación que no fue registrada por los autores referidos. El estudio de los ejemplares en los que se basaron dichos registros nos hizo suponer que algunos ejemplares determinados como *F. mugilis*, se ajustaban mejor a la descripción de *F. pacifica*.

Inicialmente se supuso que algunos ejemplares determinados como *F. mugilis* simplemente habían sido erróneamente identificados. Sin embargo, una revisión más cuidadosa, amada al hecho de que los ejemplares procedían de distintas localidades del Pacífico Mexicano, mostró que un gran número de ellos no podían ser asignados con certeza a ninguna de las dos especies. Parecía tratarse más bien de una sola especie con amplias variaciones en los caracteres considerados diagnósticos. Una posible explicación a esta variación continua entre dos extremos, puede estar dada por la naturaleza migratoria de las especies de huéspedes a lo largo de la costa del Océano Pacífico. La mezcla de los huéspedes de localidades distantes en la costa puede ocasionar una concomitante mezcla de sus parásitos. Otra posible explicación es que la variación morfológica se debe a diferencias en el desarrollo ontogenético de los ejemplares colectados del parásito y de sus huéspedes (Amin y Redlin, 1980). Cabe hacer notar que en el Océano Atlántico también se ha registrado a *F. mugilis* (Ward en 1953; Conroy, 1983) y muestra estructuras igualmente variables.

Nuestras comparaciones iniciales entre los ejemplares de *F. mugilis* y *F. pacifica* depositados en la CNHE mostraron que no había diferencias claras en cuanto a la disposición, tamaño y forma de los órganos internos. Los ganchos de la proboscis de las dos especies evaluados por microscopía electrónica de barrido mostraron que su forma y distribución también eran similares. Adicionalmente las medidas de los ganchos de la proboscis mostraron una fuerte variación aun entre individuos de la misma especie y localidad. Lo anterior nos llevó a realizar un estudio morfométrico y un análisis estadístico para determinar si hay diferencias significativas en las medidas de los caracteres considerados como diagnósticos entre los ejemplares de *F. mugilis* y *F. pacifica* depositados en la CNHE.

El análisis de las medidas del tamaño de los lemniscos de las dos especies se realizó usando métodos estadísticos que consideraban la longitud del cuerpo y la de los lemniscos. El resultado del análisis estadístico univariado (ANOVA) reveló que existen diferencias significativas entre los promedios de la longitud del cuerpo de ambas especies. En cambio, no se encontraron diferencias significativas en el tamaño de los lemniscos. Cabe mencionar que la relación entre el tamaño del lemnisco binucleado y el uninucleado es considerado como diagnóstico entre especies. De igual modo, el análisis de varianza multivariado (MANOVA) indicó diferencias significativas entre los promedios de las medidas de los caracteres de ambas especies. Sin embargo, al utilizar un análisis discriminante como herramienta objetiva para clasificar a los individuos muestreados, se encontró que para el caso de *F. pacifica* la probabilidad de una diagnosis correcta es del 33% mientras que para *F. mugilis* la probabilidad de una diagnosis correcta es de un 92%. Para expresarlo en términos llanos, dada una colecta de gusanos se clasificarían a la mayoría como *F. mugilis*. Estos resultados apuntan hacia la existencia de una sola especie que muestra una gran variación morfológica en caracteres como los lemniscos y ganchos de la proboscis.

La conclusión anterior no es sorprendente si se considera que en el Phylum Acanthocephala hay algunos ejemplos de variación morfológica intraespecífica, en que los caracteres para distinguir entre especies se sobrelapan. Este es el caso de *Pompohorhynchus rocci* y *P. bulhocolli* cuya única diferencia morfológica es el tamaño de los ganchos de la proboscis. Los métodos taxonómicos tradicionales como es la morfología descriptiva basada en pocos ejemplares, no son suficientemente precisos y algunas veces es necesario aplicar métodos alternativos para diferenciar a las especies.

Los datos moleculares ofrecen una forma alternativa para diferenciar a las especies, complementándose con el uso de caracteres morfológicos, ontogénicos, etiológicos, etc. Entre sus cualidades podemos decir que los datos moleculares tienen atributos exclusivos, como la claridad y precisión con la que se definen los caracteres y sus estados de carácter ya que los caracteres son independientes y discretos, además, el número de caracteres que se puede manejar es muy grande. Una ventaja más es que los datos moleculares ofrecen un lenguaje común que permite comparaciones entre taxa diferentes, por lo que ofrece un análisis que no se podrían hacer con otro tipo de datos.

En años recientes, los datos moleculares han mostrado su utilidad para contestar preguntas a todos los niveles de la jerarquía taxonómica. Entre los métodos moleculares, el uso de secuencias génicas ha venido ganando terreno sobre los demás. A su vez, el

uso de secuencias de genes de rRNA 18S es quizá el más ampliamente usado. Estos genes permiten analizar relaciones entre especies muy cercanas (a nivel específico), o relaciones muy lejanas (a nivel de Clase o Phylum), puesto que poseen regiones conservadas y regiones variables. Además, puesto que se trata de genes altamente repetidos en el genoma de los eucariotes (~ 100 copias), son de fácil detección y caracterización. Finalmente, el hecho de que se encuentran en grandes grupos de copias, permite una recombinación continua que los homogeniza. Esto quiere decir, que casi cualquier gen que se logre clonar y secuenciar, es idéntico a los otros del mismo individuo, y a los de otros individuos de la misma especie. Por lo anterior, muchos taxónomos tradicionales han comenzado a usar estos métodos para resolver problemas taxonómicos difícilmente solucionables por los métodos tradicionales.

En el presente trabajo se obtuvieron secuencias parciales del gen 18S de *F. mugilis* y *F. pacifica*. Después de ser alineadas, la comparación de las secuencias revela ocho cambios de nucleótidos entre ambas especies. Cuatro cambios de nucleótidos se encuentra en la región variable V7 y los restantes en las regiones menos variables. La semejanza entre las dos especies es del 98.5%. El hecho de encontrar diferencias en las secuencias de los genes ribosomales 18S sugiere que se trata de dos especies. Sin embargo, al igual que en el caso de la variabilidad de los caracteres morfológicos, no se puede excluir la posibilidad de que se trate de una misma especie con una gran variación intraespecífica. Si este es el caso, es posible pensar en una especie que tiene una distribución prácticamente continental, las poblaciones presentan diferencias de acuerdo a las distancias geográficas entre las localidades en que se colectan los ejemplares. Mención especial requieren los reportes de *F. mugilis* en las costas de Florida, Venezuela y Brasil. Puesto que el istmo de Panamá separó las poblaciones atlánticas de las del océano Pacífico hace varios millones de años, sería de esperar una mayor distancia entre ejemplares de Florida, Venezuela y Brasil, con los de casi cualquier otra localidad en la costa del Océano Pacífico. Esta hipótesis nos ha motivado para conseguir secuencias parciales de los genes 18S a partir de ejemplares provenientes del Atlántico Mexicano. Si la hipótesis resulta correcta, sería posible proponer el uso de genes ribosomales 18S para determinar la velocidad de aparición de cambios en la región secuenciada de estos genes en acantocéfalos.

La única secuencia de una especie de acantocéfalo disponible en la base de datos es la de *Neoechinorhynchus emydis* que pertenece a la misma familia y que muestra una semejanza del 95.8% con *F. mugilis* y del 95% con *F. pacifica*. Esta distancia poco

ayuda para determinar si el número de cambios observado entre las especies de *Floridosentis* corresponde a las distancias interespecíficas, pero si nos da una primera indicación de lo que pudiera ser la distancia entre especies congénéricas. Basados en esta medida de distancia sería plausible obtener la secuencia de una segunda especie de *Neoechinorhynchus* disponible en México (*N. golvani* y *N. roseum*) para determinar si las distancias interespecíficas en un género cercano son similares a las observadas entre las especies de *Floridosentis*.



## V. CONCLUSIONES

1. Los caracteres morfológicos descritos como diagnósticos para las dos especies del género *Floridosentis* son dudosos y pueden producir identificación equivocada de los ejemplares:
  - a. No hay diferencia significativa en la forma y arreglo de los ganchos de la proboscis de los ejemplares de *F. pacifica* y *F. mugilis*.
  - b. Las diferencias de longitud de los lemniscos uninucleado y binucleado no son significativas entre ejemplares de *F. pacifica* y *F. mugilis*.
2. Los caracteres moleculares apoyan las dudas sobre las descripciones de las especies del género *Floridosentis*, surgidas del análisis morfológico.
3. Los resultados morfológicos y moleculares generados en este trabajo, apuntan a la existencia de una sola especie *F. mugilis* con un amplio rango de variación en sus caracteres diagnósticos. Se recomienda una revisión de las secuencias del gen ribosomal 18S de ejemplares colectados en localidades del Golfo de México.

## VI. BIBLIOGRAFIA

**Amin, O. M. 1985.** Classification. In D. W. T. Crompton and B. Nickol. Biology of the Acanthocephala. Cambridge University Press, London. 27-72 pp.

**Amin, O. A. y Redlin, M. J. 1980.** The effect of host species on growth and variability of *Echinorhynchus salmonis* Muller, 1978 (Acanthocephala: Echinorhynchidae), with special reference to the status of the genus. J. Parasitol. 2, 9-20.

**Amin, O. M. 1987.** Key to the families and subfamilies of Acanthocephala, with the erection of a new class (Polyacanthocephala) and a new order (Polyacanthorhynchida) J. Parasitol, 73 (6):1216-1219.

**Blair, D. A, Campos, M, P. Cummings and J. P. Lacleste. 1996.** Evolutionary biology of parasitic platyhelminths: The role of molecular phylogenetics. Parasitology Today. vol 12 (2). 67-71.

**Bravo, H. M. 1969.** Helmintos de peces del Pacifico mexicano. XXVIII. Sobre dos especies del género *Floridosentis* Ward, 1953. acantocéfalos de la familia Neoechinorhynchidae Van Cleave, 1919. An. Inst. Biol. Univ. Nal. Autón. México 40 (1): 1-14.

**Bullock, W. L. 1962.** The status of the Acanthocephalan general *Floridosentis* Ward, 1953 and *Aactorhynchus* Chandler, 1935. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 29:217-218.

**Bullock, W. L. 1969.** Morphological features as tools and as pitfalls in Acanthocephala systematics. In: problems in Systematics of parasites, Schmidt, G. D. Univ. Park. Press. Baltimore. 9-45p.

- Chávez, L. R y J. M. Montoya.** 1988. Nemátodos y Acantocéfalos del tracto digestivo de la Lebrancha *Mugil curema* (Valeciennes, 1836) de la Laguna de Tamiahua, Ver. Tesis Profesional. ENEP Iztacala. UNAM. México. 67p.
- Conroy, D. A and J. M. Torrealba.** 1980. *Floridosentis mugilis* (Machado Filho, 1951) Ward, 1953 (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) in white mullet *Mugil curema*. from Venezuela coastal water. Riv. It. Pscic. Ittiop. A. XVIII. N.1. 31-43p.
- Conway, M. S.** 1982. The origins and evolution of the Acanthocephala. Bio. Rev. 57,85-115.
- Crompton, D. W. T.** 1970. An ecological approach to acanthocephalan physiology. Cambridge University Press, London. 125 pp 32.
- Juaréz, A. J y G. Salgado.** 1989. Helmintos de la "lisa" *Mugil cephalus*. Lin. En Topolobampo, Sinaloa, México. Anales. Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. Méx. Ser. Zool. 60 (3) 279-298.
- Lamothe, A. R.** 1987. Importancia de la taxonomía en parasitología. Anales. Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. Méx. Ser. Zool 58 (2):883-886.
- Machado Filho, D. A.** 1951. Una nova espécie do género *Aactorhynchus* Van Cleave, 1935 (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae). Rev. Bras. Biol. 11:29-31.
- Mayr, E. and Ashlock, P. D.** 1991. Principles of systematic zoology. McGraw-Hill, Inc. U.S.A 463p.
- Méndez, V. A.** 1993. Contribución al estudio de los parásitos de la "Lisa y de la Lebrancha" en la Laguna de Tamiahua, Ver. Tesis Profesional. Fac. de Biología. Universidad de Veracruz. 119p.
- Meyer, A.** 1932. Acanthocephala. In: Dr. H. G. Bronas Klassen und ordnungen des tierreichs, vol.4, pp 1-132. Leipzig: akademische verlagsgesellschaft.

**Osorio, S. D. 1982.** Contribución al estudio parasitológico de las especies de peces nativas e introducidas en la presa Adolfo López el "infiernillo". Tesis Profesional. Fac. de Ciencias. UNAM. México. 152p.

**Parshad, V. R. and Crompton, D. W. T. 1981.** Aspects of Acanthocephalan reproduction. *Advances in Parasitol.* 19, 73-138.

**Petrochenko, I. V. 1956.** Acanthocephala of domestic and wild animals, vol. I. Moscow: Izdatelstvo Akademii Nauk SSSR.

**Rudolphi, C. A. 1808-1809.** Entozoorum sive vermium intestinalium historia naturalis. Vol. I XXXVI + 527 pp; Vol. II, 257 pp.

**Salgado, M. G. y N. P. Barquín. 1978.** *Floridosentis elongatus* Ward, 1953 y *Contracecum* sp. Parásitos de *Mugil cephalus* Linnaeus 1758. *Anales. Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. Méx. Ser. Zool* 49 (1):71-82.94

**Sambrook, J. Fritsch, E. F. y Maniatis, T. 1989.** *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold. Spring. Harbor, New York.

**Sanger, F. Nicklen, S. y Coulson, A. 1977.** DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:5463.

**Schmidt, G. D and Canaris, A. G. 1967.** Acanthocephalan from Kenya with descriptions of two new species. *J. Parasitol.* 53.634-637.

**Southwell y Macfie, 1925.** On a collection of Acanthocephala in the Liverpool school of Tropical Medicine. *Ann. Trop. Med and Parasitology* 19, 141-184

**Thapar, G. S. 1927.** On *Acanthogyrus* n.g. from the intestine of the Indian fish *Labeo rohia* with a note on the classification of the Acanthocephala. *J. Helminthol.* 5: 109-120.

**Van Cleave, H. J. 1936.** The recognition of a new order in the Acanthocephala *J. Parasitol.* 22. 208-206

**Vogelstein, B y Gillespie, D. 1979.** Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proc. Natl. Acad. Sci. Usa. 76:615.

**Ward, H. L. 1953.** A new genus and species, *Floridosentis elongatus*, of Neoechinorhynchidae (Acanthocephala) J. Parasitol. 39:392-394.

**Yamaguti, S. 1963.** Acantocephala. In systema helminthum. Vol 5, New York and London. Interscience. 1-423.