



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"Descripción morfológica y caracterización
molecular de la cercaria *Glythelmins quieta*
(Stafford, 1900) Stafford, 1905
(Platyhelminthes: Trematoda: Digenea)".

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A :
NADIHELLI RESENDIZ ARCE



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTOR DE TESIS: DR. GUILLERMO SALGADO MALDONADO

MEXICO, D. F.



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

2004



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Descripción morfológica y caracterización molecular de la cercaria *Glythelmins quieta* (Stafford, 1900) Stafford, 1905 (*Platyhelminthes: Trematoda: Digenea*)".

realizado por *Nadiehelli Reséndiz Arce*

con número de cuenta 9631035-9

quién cubrió los créditos de la carrera de *Biología*

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario *Dr. Guillermo Salgado Maldonado*

Guillermo Salgado Maldonado

Propietario *M. en C. Laura Margarita Márquez Valdelamar*

Laura M. Márquez V.

Propietario *M. en C. Isabel Cristina Caneda Guzmán*

Caneda

Suplente *Biól. Petra Sánchez Nava*

Petita

Suplente *Biól. Ana Lucía Sereno Uribe*

Ana Lucía Sereno Uribe

Consejo Departamental de *Biología*

Juan Manuel Rodríguez Chávez
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es el resultado de mucha gente que colaboró conmigo para lograrlo. Primero que nada a Memo Salgado Maldonado (amigo antes que doctor) del Instituto de Biología, UNAM por introducirme al fabuloso micromundo de los parásitos, quien con su apoyo en la tesis me enseñó a desarrollarme como profesionista.

Al apoyo brindado de parte de la M. en C. Laura Márquez Valdelamar, por que además de ser parte importante de este proyecto y brindarme las instalaciones del Laboratorio de Molecular me brindo una hermosa amistad; agradezco a la igual la colaboración de Martín García por sus comentarios. Muy en especial al Dr. Julio César Carrera del laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas a cargo del Dr. Juan Pedro Laclette por su participación intelectual y sus atinados comentarios que enriquecieron de manera significativa el trabajo, muchas gracias.

A las personas que conocí en el laboratorio, gracias por mostrarme lo que es trabajar en equipo, pero muy en especial a Ana por ser mano derecha y más que mi compañera de laboratorio, estar presente en cada momento del trabajo apoyándome e impulsándome. a Erika, Balbina y cia. A Lucia Mendoza su esposo Fernando García y Julio César Montero por su tiempo, apoyo, dedicación y por ser mis amigos y ayudarme a lo igual equipo de la biblioteca del Instituto de Biología a cumplir mis caprichos estudiantiles.

A la M. en C. Berenit Mendoza del laboratorio de microscopia electrónica por la colaboración brindada; además al laboratorio vecino y en especial al Dr. Ulises Razo mis infinitas gracias por apoyarme desinteresadamente.

A los todos mis profesores de carrera que me mostraron lo ilimitado que es la Biología.

Pero el apoyo más importante esta en casa y en la familia. A mi hermana, amiga y compañera Libertad y a mi nuevo hermano, por la dedicación a tomar un papel muy importante en mi vida e impulsar mi nueva vida, además de solidarizarme en la realización de la tesis.

A mi padre con el que he aprendido lo que es la vida universitaria y por seguir presente en ella. A mi familia (abuelita, tíos y primos) por darme su total apoyo aunque no sabían de lo que se trataba.

A la familia Campos-Sánchez por permitirme conocerlos, en especial a Humberto, con quien existe un lazo sentimental muy fuerte que cada vez solidifica más y ser quien me enseñara el motivo para seguir adelante y tener alguien a quien admirar y ese, es el mismo.

A mis amigos de la carrera (Belem, Valeria, Andrea, Poncho, Andrew, Juan Pedro, Isaac, Iván, Martha, Diana, Rocío, Norma, Ángel y si faltará alguno disculpen la emoción) por alimentar un amistad pura, sincera y desinteresada.

A los amigos que he conocido a lo largo de mi vida y que se han quedado atrás, pero siguen presentes en los recuerdos.

A las amistades de mi madre, que ahora también son las mías.

Este trabajo esta completamente dedicado a la mujer que incondicionalmente estuvo conmigo desde los inicios y ha vivido cada gota dedicado a este, su trabajo también.
La persona con la que aprendí a ser hija y quien conmigo aprendió a ser madre.
A ti Coquín.

CONTENIDO

RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
Antecedentes	8
<i>El género <i>Glyphelmins</i></i>	13
<i>Ciclo de vida</i>	16
<i>Análisis moleculares</i>	18
Objetivo general	19
Objetivos particulares	19
METODOLOGÍA	20
<i>Recolección de caracoles</i>	20
<i>Obtención de las cercarias</i>	20
<i>Procesamiento de las cercarias para su estudio morfológico y microscopía electrónica</i>	21
<i>Extracción de DNA de las cercarias</i>	22
<i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	24
RESULTADOS	26
<i>Descripción morfológica</i>	27
<i>Caracterización molecular de la cercaria</i>	30
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	38
BIBLIOGRAFÍA	39

RESUMEN

En este estudio se secuenció DNA de los genes ribosomales 28S y 5.8S y de los espaciadores transcritores internos ITS 1 e ITS 2, para la identificación de cercarias (estadios larvarios de tremátodos) (Platyhelminthes). Se secuenciaron 30 cercarias obtenidas de caracoles *Physella cubensis cubensis* infectados naturalmente y recolectados en el Lago de Pátzcuaro, Michoacán, México en Diciembre de 2002. Las cercarias se obtuvieron por estimulación de los caracoles por exposición a una fuente luminosa. Un número de cercarias fueron fijadas y procesadas para hacer preparaciones totales microscópicas permanentes montadas en bálsamo de Canadá para realizar estudios morfológicos; otra parte se conservó en alcohol etílico absoluto para su estudio molecular. El estudio morfológico de la cercaria permitió su identificación por comparación con las descripciones publicadas. La secuencia molecular confirmó la identidad del adulto del tremátodo *Glyphelmins quieta* (Stafford, 1900) Stafford, 1905. La secuencia molecular de la cercaria mostró 100% de identidad con las secuencias de los ejemplares adultos disponibles en el Genbank. Además se obtuvieron una región más amplia del espaciador ITS 1 para *Glyphelmins quieta* y la secuencia del caracol *Physella cubensis cubensis*. El uso de técnicas moleculares constituye una herramienta útil para la identificación de formas larvarias de helmintos parásitos. Las técnicas moleculares aportan confiabilidad y son prácticas para aplicar a cualquier grupo.

INTRODUCCIÓN

La identificación de helmintos parásitos (platelmintos, acantocéfalos y nemátodos) se basa en las características anatómicas de los organismos adultos. Esto plantea enormes dificultades cuando se trata de determinar a nivel de especie a las formas larvarias (Prokopic y Krivanec, 1974) ya que los esquemas de clasificación están en las características morfológicas de los adultos y en los estadios larvarios tales rasgos no están suficientemente desarrollados. Ante la necesidad de identificar formas larvarias se hace imperativo completar el ciclo de vida del parásito para obtener las formas adultas. En todo caso, solo las formas larvarias bien conocidas podían ser identificadas sin manejos subsecuentes; y esto no garantiza al 100% una identificación inequívoca.

Recientemente, el uso de análisis moleculares basados en la secuencia de DNA han contribuido a eliminar esta problemática y resolver problemas de identificación taxonómica, proporcionando además datos para el desarrollo de análisis filogenético. La utilización de datos moleculares ayuda a la identificación de parásitos y así también posibilita otros estudios sistemáticos (Gasser, 1999). La identificación inequívoca de especies se apoya actualmente en el análisis molecular de la variación genética en genes muy conservados o bien con el estudio de regiones que varían ampliamente (Gasser, 2001).

Las técnicas moleculares constituyen actualmente una herramienta valiosa para la identificación de helmintos en estadios tempranos de su desarrollo ontogenético. Las técnicas de secuenciación molecular y los análisis genotípicos son muy efectivos para relacionar los estadios larvarios con adultos. Haciendo una comparación de los datos moleculares resultantes se podrá determinar a la forma adulta que corresponde, siempre y cuando existan secuencias de los organismos registradas en los bancos de genes.

Desde 1991 se han empleado las técnicas moleculares para la determinación taxonómica de helmintos parásitos (Luton et al., 1992). En 1996, McManus y Bowles aplicaron técnicas moleculares como alternativa para determinar taxonómicamente y estudiar la filogenia de parásitos adultos de interés humano como *Ascaris lumbricoides* (Nematoda) o *Echinoparyphium recurvatum* (Digenea).

Muchos animales silvestres acuáticos albergan helmintos parásitos como formas larvarias. Por ejemplo; las comunidades de helmintos parásitos de peces dulceacuícolas de México incluyen entre el 30 al 50% de especies de helmintos en estadios larvarios (Salgado-Maldonado, 2001a, 2001b; 2004). Lo mismo puede argumentarse respecto a los helmintos de anfibios. Esto plantea una fuerte problemática para la identificación taxonómica de estas especies.

Antecedentes

El estudio morfológico de cercarias permite describir y relacionar estas fases larvarias con sus correspondientes especies de tremátodos adultos. Sin embargo, en ocasiones las cercarias se han descrito como especie nueva sin relacionarlas o identificar su correspondencia con un adulto (Smyth y Smyth, 1980).

En México se han desarrollado estudios morfológicos de cercarias y de ciclos de vida de tremátodos. Recientemente se describieron las cercarias de *Ochetosoma breviaecum* (Caballero y Caballero, 1941) y *Posthodiplostomum minimum* (MacCallum, 1921) que infectan de forma natural a los caracoles *Physella cubensis cubensis* en el Lago de Pátzcuaro, Michoacán, México; con ellos se logró completar el ciclo de vida en condiciones de laboratorio (Serenó-Urbe, 2003). Scholz et al. (2000) y Ditrich et al. (1997) presentaron una revisión de los estudios taxonómicos de estadios larvarios así como de

ciclos de vida y de especies de tremátodos estudiados en México, incluyeron hospederos tanto acuáticos como terrestres.

Notamos que existen estudios incompletos, que describen y denominan las cercarias, pero no identifican los adultos; por ejemplo *Xiphidiocercaria* tipo I y II de Plagiorchiidae (Scholz et al., 2000; Ditrich et al., 1997). Así también la cercaria descrita como *Xiphidiocercaria mexicana* (Caballero y Caballero et al., 1961) o la *Cercaria patzcuarensis* (Caballero y Caballero et al., 1961) encontrada en *Physa mexicana*, causante de la dermatitis en el Lago de Pátzcuaro, se describió como especie nueva.

Si bien, se ha profundizado en estudios de ciclos de vida y estadios larvarios que se encuentran en cuerpos de agua de México, en muchos casos no se ha podido completar la caracterización del adulto al que corresponde, dejando tan solo la descripción de la cercaria.

La orientación de describir formas larvarias dándoles incluso categoría taxonómica de nuevas especies, no solo se presentan en México sino en el mundo. Como el caso de la *Cercaria haplocoecum* (Ogata, 1943) obtenida del caracol marino *Assiminea japonica* descrita en Japón y la *Cercaria kuwaitae* descrita en Kuwait como una nueva especie de la familia Haploplanchidae, recolectada del caracol *Cerithidae cingulata* (Gmelin, 1790) (Abdul-Salam y Sreelatha, 1995).

La descripción morfológica de las formas larvarias no es suficiente. Es esencial completar el ciclo biológico de los helmintos para la caracterización biológica y poder relacionar las formas adultas con las larvas. Actualmente, podemos recurrir a la aplicación de técnicas moleculares para determinar la identidad de estadios larvarios cuando no es posible completar el ciclo de vida para obtener formas adultas del parásito, o como complemento a este desarrollo. Para esto es esencial contar con secuencias moleculares de las distintas especies.

La técnica más utilizada es la de secuenciación de DNA (McDonnell et al., 2000; Morgan y Blair, 1998; McManus y Bowles, 1996). Los datos de las secuencias de nucleótidos representan gran potencial para la investigación taxonómica y filogenética en todos los grupos de organismo, por ejemplo en los nemátodos parásitos (Nadler, 1992). En el DNA hay regiones que evolucionan lentamente y otras que lo hacen más rápidamente (Unnasch y Zimmerman, 1995). Los genes que han sido utilizados para el análisis molecular son en su mayoría genes nucleares, mitocondriales, del citocromo C o DNA ribosomales, para análisis de relación entre especies muy cercanas (Johnson et al., 1993) o especies muy lejanas a nivel de Clase o Phylum (Campos et al., 1998). Los genes de las subunidades ribosomales, como los que se emplean en este trabajo poseen regiones muy conservadas como es el gen 28S y otras que son altamente variables como los espaciadores ITS's. Son genes que se repiten con frecuencia en el genoma de todos los organismos Eucariontes (~100 copias) lo que facilita la caracterización y detección del mismo. Las secuencias obtenidas de diversas especies se comparan entre sí para observar similitudes y diferencias interespecíficas. Los estudios filogenéticos basados en genes de la subunidad ribosomal han resultado exitosos, ya que son genes muy conservados, que a lo largo de la historia han evolucionado muy poco y que nos proveen de información específica de organismos cuya genética ha variado poco o casi nada. De esta forma los resultados moleculares son de gran ayuda en las clasificaciones y completan los datos morfológicos.

Los genes ribosomales codifican para las moléculas de rDNA y están presentes en el genoma nuclear de todos los organismos eucariontes; generalmente están subdivididos en tres regiones codificantes gen 18S, 5.8S y 28S. Los ITS's (espaciadores transcritos internos) son marcadores muy variados del rDNA. El ITS 1 se localiza entre el gen 18S y el 5.8S; el ITS 2 se ubica entre los genes 5.8S y 28S (Hillis y Dixon, 1991) (Fig. 1).



Fig. 1 Mapa del rDNA nuclear tomado de Hillis y Dixon, 1991; donde ETS espaciador transcrito externo; 18S, 5.8S y 28S genes; ITS 1 e ITS 2 espaciadores transcritos internos.

Estos espaciadores permiten distinguir diferencias entre especies, incluyendo estadios larvarios de invertebrados. De esta forma el análisis genotípico utilizando el DNA brinda una excelente alternativa para la identificación taxonómica de las especies (Gasser, 2001; León-Régagnon et al., 2001; Almeida-Artigas et al., 2000; Jousson et al., 1999, 1998; Cribb et al., 1998; León- Luton et al., 1992).

Dentro de las regiones no codificantes se han utilizado las regiones ITS 1 e ITS 2 para distinguir parásitos congénéricos y a menudo indistinguibles morfológicamente ya que estas regiones al contrario de las regiones codificantes 18S, 5.8S y 28S, presentan gran variación genética a lo largo del tiempo (Almeyda-Artigas et al., 2000; León-Régagnon et al., 1999; Hoste et al., 1998; Chilton et al., 1997, 1995; Campbell et al., 1995; Nadler et al., 1995 Nadler, 1990).

Algunas cercarias, particularmente de especies de tremátodos de interés económico y médico-epidemiológico han sido estudiadas morfológicamente y también con técnicas moleculares, por ejemplo la cercaria de *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907) (DeMarco et al., 2003; Shabaan et al., 2003; Thiengo et al., 2002; Ivanchenko et al., 1999). Existe además, gran interés por secuenciar otras regiones y genes para futuros estudios, principalmente ecológicos o taxonómicos (Obwaller et al., 2001).

También se han hecho estudios moleculares en estadios larvarios de las familias Opercoelidae (Trematoda: Digenea) y Mesometridae (Poche, 1926). Se han utilizado cercarias para estudios comparativos de caracteres morfológicos y técnicas moleculares para comparar las cercarias con estadios adultos. Algunas cercarias de estas familias fueron identificadas a través de las secuencias moleculares, utilizando los genes 28S y 18S al igual que con la región de los espaciadores del gen 5.8S, se utilizaron para clasificar especies de cercarias dentro de la misma familia. Los resultados mostraron como resultado 100% de identidad en la comparación de estadios larvarios con adultos (Jousson et al. 1999, 1998).

En México se han hecho estudios moleculares de helmintos parásitos adultos para la elaboración de árboles filogenéticos (León-Règagnon et al., 2001; Martínez-Salazar, 2001; León-Règagnon et al., 1999; Razo-Mendivil, 1998). Sin embargo, no se han hecho estudios para identificar molecularmente los estadios larvarios de helmintos de especies de animales silvestres.

El género Glythelmins

El género fue propuesto por Stafford en 1905 para incluir a *Distomun quietum* Stafford, 1900, tremátodo parásito del intestino de *Rana catesbeiana*, (Shaw, 1802), *Rana virescens* (Kalm, 1878) e *Hyla pickringii* (Holb, 1890) en Canadá. La especie tipo es *Glythelmins quieta* (Stafford, 1900) Stafford, 1905.

Phylum: Platyhelminthes

Clase: Digenea

Orden: Plagiorchiidae

Familia: Macroderoididae

Especie: *Glythelmins quieta*

Actualmente se reconocen 10 especies dentro del género *Glythelmins* (Razo-Mendivil, 2004 en prensa). La mayoría de ellas especies se encuentran distribuidas en el Continente Americano, desde Canadá hasta Argentina; solo 2 especies del género se han identificado en Japón y otra más en la ex Unión Soviética.

Glythelmins quieta es una especie común y ampliamente distribuida en el Continente Americano. Se encuentran en el sur de Michigan en *Rana sylvatica* (Muzzall y Peebles, 1991) y con abundancia en el noroeste de Estados Unidos (Goldberg et al., 2000) en los estados de Colorado, Kansas, Nebraska y Texas colindando en los límites con México (Fig. 2).

En México se han reportado adultos de *Glyphelmis quieta* en el noroeste de Sonora (Burse y Goldberg, 2001) en *Rana magnaocularis* y *Rana tarahumarae* en Sonora y Sinaloa (Goldberg y Bursey, 2002). En *Rana dunni* en el Lago de Pátzcuaro (Razo-Mendivil, et al., 1999; Pulido, 1994) y Lago de Zacapu, Michoacán (Razo-Mendivil, et al., 1999). En *Rana megapoda* en el Lago de Cuitzeo así como en los manantiales de Cointzio, Michoacán (Razo-Mendivil, et al., 1999) en *Rana montezumae* en la Ciénaga de Lerma y San Pedro Tlaltizapan, Estado de México (Razo-Mendivil, et al., 1999; León-Règagnon, 1992) en el Lago de Texcoco y Lago de Xochimilco, Estado de México (Iglesias, 1992 en Lamothe-Argumedo et al., 1997) y en *Rana neovolcanica* en los manantiales de Cointzio, Michoacán (Pérez-Ponce de León, et al., 2000).

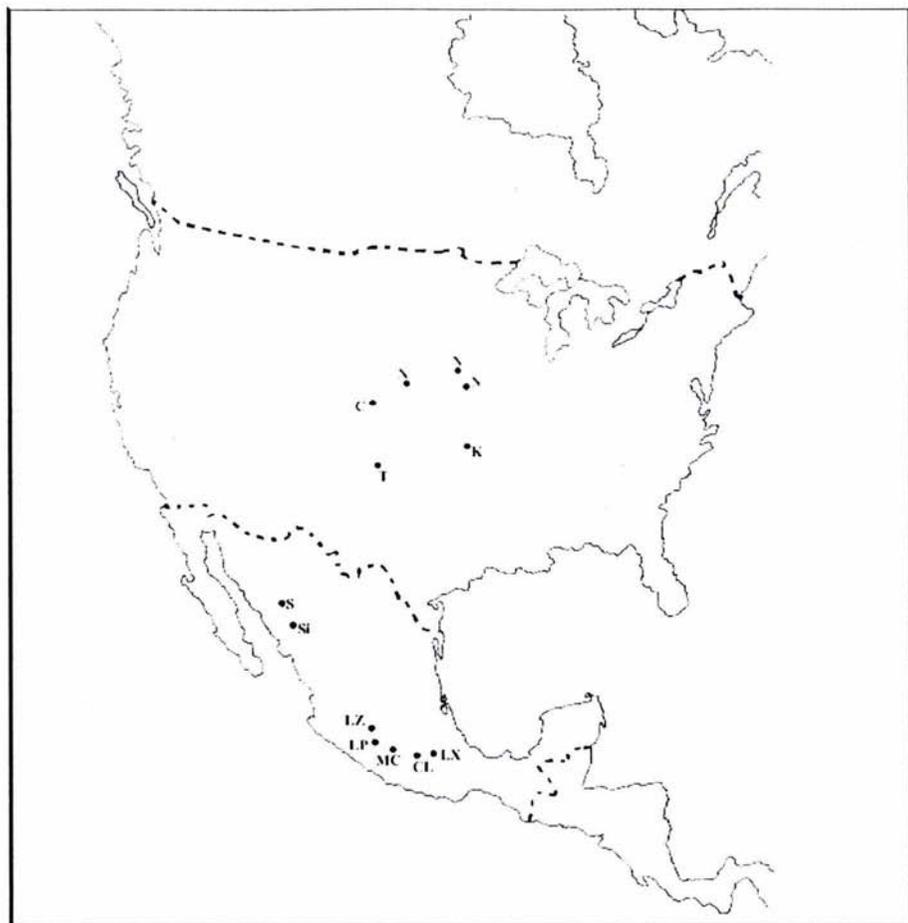


Fig. 2 Distribución geográfica de *Glythelmins quieta* en el continente Americano; N. Nebraska, K. Kansas, C. Colorado, T. Texas, en Estados Unidos; LX. Lago de Texcoco, CL. Ciénaga de Lerma, Estado de México; MC. Manantiales de Cointzio, LP. Lago de Pátzcuaro, LZ. Lago de Zacapu, Michoacán; S. Sonora, Si. Sinaloa, México.

Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Glythelmins quieta* incluye dos hospederos intermediarios, un caracol y un anfibio (en algunos casos puede ser un reptil) y un hospedero definitivo anfibio (Yamaguti, 1975).

Los tremátodos adultos depositan sus huevos en el agua con las heces del hospedero. Al ser ingeridos por los caracoles (Gasteropoda: Physidae), que son el primer hospedero intermediario se desarrollan las fases intramolusco (miracidio, esporocisto hijo, esporocisto madre y cercaria). Las cercarias emergen del caracol, penetran activamente y se enquistan en la piel de los renacuajos anfibios que son el segundo hospedero intermediario; proceso en el cual pierde la cola dando lugar a la metacercaria.

Con el tiempo, la biología del anfibio dará paso a la metamorfosis con un cambio de piel y se convertirá en un anfibio adulto que se alimentará de su misma muda ingiriendo a su vez a la metacercaria. Una vez ingerida, la metacercaria sale del quiste y se convierte en adulto, se alojará en el intestino o estómago del anfibio adulto. Siendo este su hospedero definitivo, el adulto deposita sus huevos que el hospedero desecha en las heces, completando su ciclo biológico (Fig. 3).

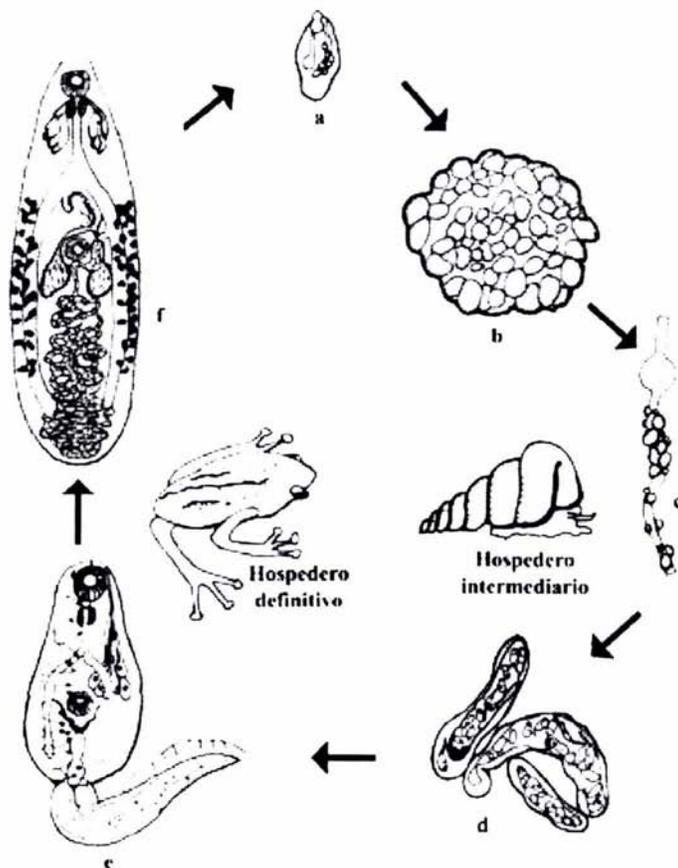


Fig. 3 Ciclo de vida de *Glythelmins quieta*; a. miracidio, b. esporocisto madre con 34 días de evolución, c. tracto digestivo del caracol *Physa gyrina* con esporocistos madre adheridos, d. esporocisto hijo con varias cercarias desarrolladas en su interior, e. cercaria, f. adulto. Tomado de Yamaguti, 1975.

Análisis moleculares

La aplicación de técnicas moleculares en estudios de identificación, clasificación y filogenia de organismos ha sido de gran utilidad para complementar datos morfológicos, así como para resolver otras interrogantes relacionadas, cuando los caracteres morfológicos no son suficientes. La idea de integrar caracteres moleculares a partir de secuencias de los genes ribosomales y sus espaciadores internos se debe a que las secuencias son útiles para resolver problemas taxonómicos aportando información intrínseca del organismo, su evolución y relación con otros organismos.

Ya se han publicado con anterioridad secuencias moleculares de especie del género *Glythelmins* (Razo-Mendivil et al., 2004; Olson et al., 2003). En particular estas secuencias han sido obtenidos a partir de formas adultas, así Razo-Mendivil en 2004 obtuvo la secuencia molecular de *Glythelmins quieta* para hacer un análisis filogenético del género *Glythelmins*, siendo esto lo único reportado para el género.

Objetivo general

Identificar y describir a la cercaria que emerge del caracol *Physella cubensis cubensis* parasitado naturalmente, del Lago de Pátzcuaro, Michoacán caracterizarla morfológicamente y molecularmente.

Objetivos particulares

Describir la morfología de la cercaria con técnicas de microscopía óptica y microscopio electrónico de barrido (MEB).

Caracterizar la cercaria molecularmente mediante secuenciación de los genes ribosomales 28S y 5.8S junto con sus espaciadores ITS 1 e ITS 2.

Comparar los datos morfológicos con los datos ya publicados de esta especie para explorar la identificación de la especie.

Comparar la composición genética del parásito en estadios larvarios con los datos ya existentes en el banco genético (Genbank).

METODOLOGÍA

Recolección de caracoles

Se recolectaron caracoles manualmente entre Septiembre de 2001 y Diciembre de 2002, en los márgenes del Lago de Pátzcuaro, Michoacán (19° 43' y 19° 32' N y 101° 32'-101° 42' W). Las colectas se realizaron una vez por mes, excepto en los meses de Mayo a Agosto. En total se colectaron 2100 caracoles de la especie *Physella cubensis cubensis* (Physidae).

Obtención de las cercarias

Los caracoles fueron trasladados al laboratorio, se mantuvieron en frascos con agua del medio, aireados y a temperatura ambiente durante las 48 hrs posteriores a su captura. En el laboratorio se colocaron individualmente en tubos de ensayo con 20 ml de agua filtrada de la localidad. Se estimularon para obtener las cercarias exponiéndolas a iluminación eléctrica directa por un foco de 75W a una distancia de 15 cm (Serenó-Uribe, 2001).

Por inspección simple visual, se identificaron los tubos de ensayo de caracoles positivos que contenían cercarias. Las cercarias se aislaron mediante pipetas Pasteur para colocarlas en cajas de Petri con agua del medio. Se hicieron preparaciones temporales para observar al microscopio y estudiar la morfología de las cercarias. Los caracoles fueron examinados por compresión entre dos vidrios; se puso especial cuidado en la observación del hepatopáncreas. En los casos positivos, las formas intramolusco se aislaron en cajas de Petri en solución salina 0.75%. Posteriormente se fijaron con formol 4% caliente.

Algunas cercarias se fijaron con formol 4% caliente para su procesamiento de tinción y montaje para hacer con ellas preparaciones permanentes. Otras cercarias se fijaron con alcohol etílico al 96% para su estudio molecular y se conservaron posteriormente en alcohol etílico absoluto hasta el momento de su procesamiento.

Procesamiento de las cercarias para su estudio morfométrico y microscopia electrónica

Las cercarias fijadas en formol 4 % se lavaron y conservaron en alcohol 70% hasta su procesamiento. Primero se tiñeron con Paracarmín de Mayer, se lavaron en alcohol 70% y se diferenciaron en alcohol acidulado (al 2% con HCl); nuevamente se lavaron en alcohol 70% y se deshidrataron en una serie de alcoholes graduales, 70%, 80%, 90% y 96% (10 minutos en cada cambio) hasta alcohol etílico 100%, 20 minutos. Se aclararon con salicilato de metilo y se montaron en Bálsamo de Canadá para hacer preparaciones permanente para microscopio.

Otras cercarias fijadas en formol 4% se lavaron dos veces en solución salina al 0.75% durante 2 minutos cada vez, después se colocaron en una solución 0.04 μ l de O₅O₄ (Tetraoxido de Osmio) más 3.96 μ l de solución salina al 0.75% para hacer un volumen total de 4 μ l, se dejó reposar durante 1. 30 hrs en frío, de nuevo se hicieron dos lavados en solución salina al 0.75% durante 2 minutos cada uno. Las cercarias se deshidrataron en una serie de alcoholes graduales, 10%, 30%, 50%, 70% y 90% (15 minutos en cada cambio) hasta alcohol etílico 100% dos cambio de 1 hr cada uno. Las cercarias se deshidrataron en una cámara al vacío para llegar al punto crítico, se colocaron en un portaobjetos de aluminio donde se pego se adhirieron con cinta carbón por ambos lados, después se cubrieron con oro para su observación al microscopio electrónico.

Extracción de DNA de las cercarias

Las cercarias fijadas con alcohol etílico de 96% y conservadas en alcohol etílico 100% se procesaron para extraer su DNA genómico total utilizando el Kit DNeasyTM (QIAGEN) para extracción de DNA de tejidos. Se eligió este método porque permite el aislamiento total y rápido del DNA, dejándolo libre de contaminantes e inhibidores enzimáticos, ya que se utilizan columnas de intercambio iónico. El procedimiento de extracción se realizó como se enuncia a continuación:

1. Se colocaron 10 cercarias conservadas en alcohol absoluto en un tubo de 1.5 ml
2. Se retiró la mayor parte de alcohol con una pipeta y el resto de alcohol se secó en un concentrador al vacío
3. Se agregaron 100 µl de agua destilada para lavar la muestra, se agitó suavemente para mezclar
4. Se centrifugó con un mínimo de agua, a 13 200 rpm durante 10 minutos
5. Se retiró la mayor cantidad de agua posible utilizando una pipeta
6. El tubo con la muestra se colocó en el ultracongelador a -73 °C durante 10 minutos junto con el micropistilo; posteriormente se molió la muestra con el micropistilo
7. Al tubo con la muestra triturada se le agregaron 180µl de buffer ATL y 20µl de Proteinasa K (15mg/ml)
8. La muestra se homogenizó en el vortex
9. Se colocó el tubo en un bloque térmico a 56 °C durante 40 minutos
10. Una vez retirado del bloque, se agregaron 4µl de RNAsa mezclando durante 15 segundos en el vortex, se dejó reposar 2 minutos a temperatura ambiente
11. Se agregaron 200µl de buffer AL mezclando en el vortex para homogenizar la muestra
12. Se colocó en baño maría a 70 °C durante 10 minutos

13. Se agregaron 200µl de etanol al 100% y se mezcló en el vortex
14. Todo el contenido del tubo se pasó, con ayuda de una pipeta, a una columna de intercambio iónico que se encuentra dentro del tubo de colecta
15. Se centrifugó por 1 minuto a 8 000 rpm y se desechó lo colectado en el tubo de colecta
16. Se agregaron 500µl de buffer AW1 a la columna y se centrifugó a 8 000 rpm durante 1 minuto, desechando el contenido del tubo de colecta
17. Se agregaron 500µl de buffer AW2 y se centrifugó por 3 minutos a 13 200 rpm, se desechó lo colectado en el tubo de colecta
18. En un tubo limpio de 2 ml se colocó la columna y se agregaron 200µl de buffer AE dejando reposar por 1 minuto
19. Se centrifugó a 8 000 rpm por 1 minuto
20. Nuevamente se colocó la columna en el tubo de 2 ml y se agregaron 200µl de buffer AE a la columna dejando reposar por 1 minuto
21. Se centrifugo a 8 000 rpm por 1 minuto

Siguiendo el mismo procedimiento se extrajo el DNA de otras 2 series de 10 cercarias en cada tubo de 1.5 ml. También se extrajo DNA del tejido del caracol para comparar con los resultados. Se utilizó el mismo kit y se siguió el procedimiento anterior desde el paso 6.

Las extracciones obtenidas se corrieron en un gel de agarosa al 1% (TBE 1x) a 110 V por 20 minutos.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se amplificó la región ITS 1-5.8s-ITS 2 y el gen 28s. Para la amplificación del gen 28s ribosomal se utilizaron los oligonucleótidos NRy 5' -CTA ACC AGG ATT CCC TCA GTA ACG GCG AGT- 3' (ida) NRz 5' -AGA CTC CTT GGT CCG TGT TTC AGG AC- 3' (regreso) (Hillis y Dixon, 1991); 28sa (ida) 5' -GAC CCG TCT TGA AAC ACG GA- 3' y 28sb (regreso) 5' -TCG GAA GGA ACC AGC TAC- 3' (proporcionados por la Dra. Gabriela Parra, Laboratorio de Herpetología, Instituto de Biología, UNAM). La región ITS 1 y 5.8s-ITS 2 se amplificó utilizando el oligonucleótido Nay 5' -GTC GTA ACA AGG TTT CCG TA- 3' (ida) y Naz 5' -TAT GCT TAA ATT CAG CGG GT- 3' (regreso) (Luton et al., 1992).

Para la amplificación se utilizaron 1µl de cada DNA, 1µl de cada oligonucleótido (10pmol/µl), 5µl buffer 10x, 1µl dNTP's, 0.25µl Taq, 2.5µl MgCL₂ y lo correspondiente de agua destilada para llevar a un volumen final de 50 µl. Se utilizó el kit Taq Core PCR. La reacción se llevó a cabo en una termocicladora Applied Biosystems modelo 9700.

Para amplificar la región 28s se usó con el siguiente programa:

92 °C, 1 min.; 32 ciclos de 92°C, 30 seg., 50 °C, 30 seg., 72 °C, 1 min.; extensión final a 72 °C por 4 min.

Para la región ITS 1-5.8s-ITS 2 (oligonucleótidos Nay –Naz) a 94 °C, 5 min. 30 ciclos a 94 °C, 30 seg., 55 °C, 30 seg., 72 °C, 30 min. Una extensión final a 72 °C por 7 min.

Para la otra porción del gen 28s con los oligonucleótidos 28sa y 28sb se utilizó el siguiente programa 94 °C, 5 min., 38 ciclos a 94 °C, 1 min., 49 °C, 1 min., 72 °C, 1 min. Y una extensión final a 72 °C por 5 min.

Los productos obtenidos se corrieron en un gel de agarosa al 1% (TBE 1x) y se compararon con un marcador de peso molecular de 1 Kb (Fermentas). El gel se dejó correr en la cámara de electroforesis durante 20 minutos a 110 V.

El producto de la PCR se purificó con el Kit QIAquick® (QIAGEN) siguiendo el procedimiento que se anota :

1. Se añadió a cada producto de PCR 250µl de buffer PB y se mezcló en el vortex
2. Se colocó una columna de QIAquick en un tubo de colecta de 2 ml
3. Se agregó la muestra en la columna QIAquick y centrifugó por 1 minuto a 12 300 rpm
4. Se desechó lo colectado, se puso de nuevo la columna QIAquick en el tubo de colecta
5. Para lavar, se añadieron 750 µl de buffer PE a la columna QIAquick y centrifugó a 13 000 rpm durante 1 minuto
6. Se desechó lo colectado y se pasó de nuevo a la columna QIAquick en el mismo tubo de colecta. Se centrifugó la columna 1 minuto a velocidad máxima
7. Se pasó la columna QIAquick a un tubo de microcentrifuga nuevo de 1.5 ml
8. Para eluir el DNA se agregaron 50 µl de agua destilada en el centro de la membrana del tubo de colecta QIAquick y se centrifugó la columna por 1 minuto a 13 000 rpm

Con los productos purificados se preparó la reacción de secuencia , utilizando el big dye V.2 (Applied Biosystems) en un volumen final de 20µl. Se purificó con columnas CentriSep y se secuenciaron en el secuenciador automático modelo 310 de Applied Biosystems. Los cromatogramas se observaron en el programa "Chromas" para comparar con los registros del Banco Genético (Genbank: www.ncbi.nlm.nih.gov)

RESULTADOS

Las cercarias fueron obtenidas mediante la estimulación de 2100 caracoles *Physella cubensis cubensis* infectados naturalmente, de los cuales solo un caracol resultó parasitado. Las cercarias comenzaron a emerger del caracol a las 8 hrs de estimulación; esto se repitió tres veces más durante dos días. Las cercarias se observaban a simple vista, presentando movimientos giratorios sobre su propio eje y desplazándose de forma zigzagueante, dirigiéndose hacia la parte superficial del agua del tubo de ensayo expuesta hacia el haz de la luz (fotopositivas) (Fig. 4).



Fig. 4 Cercaria de *Glythelmins quieta* observada *in vivo* en microscopio óptico 40x.

Descripción morfométrica

Se basó en el estudio morfológico de cercarias vivas y otras que se fijaron y montaron en preparaciones permanentes. Las cercarias se midieron en un analizador de imágenes ha objetivo 40x de 15 ejemplares montados en preparaciones permanentes:

Presentan un cuerpo ovoide (Fig. 5) cubierto de espinas, el cual mide de 228-333 μ (294) de largo y 81-129 μ (109) de ancho. La ventosa oral está localizada en la región subterminal del cuerpo, mide 41-64 μ (53) de largo y 24-65 μ (54) de ancho; presenta un estilete que mide 2-5 μ (4) de largo y 3-5 μ (4) de ancho, en la punta de la base del estilete mide de ancho 12 μ . El acetábulo es más pequeño que la ventosa oral está situado postecuatorialmente y mide 31-53 μ (42) de largo y 18-45 μ (35) de ancho. La faringe es esférica, mide de 25 a 57 μ (39) de largo por 23-53 μ (35) de ancho. El esófago comienza a robustecerse a partir de la faringe midiendo 35-114 μ (60), la bifurcación cecal se localiza en la región ecuatorial del cuerpo, poco antes del acetábulo y en los márgenes del cuerpo. Los ciegos intestinales son robustos, se extienden hasta la región posterior del cuerpo miden de 132-233 μ (174) de largo. La cola es larga y delgada, se observan constricciones y un velo que se origina en la parte media y se extiende hasta la parte posterior de la cola (Fig. 6) la cual mide 270-410 μ (350) de largo y 21-38 μ (32) de ancho. La longitud total de la cercaria (cuerpo más cola) es de 449-733 μ (637) (figura 5). En vivo se observaron 17 células en flama (Fig. 5) no se determinó la fórmula flamígera.

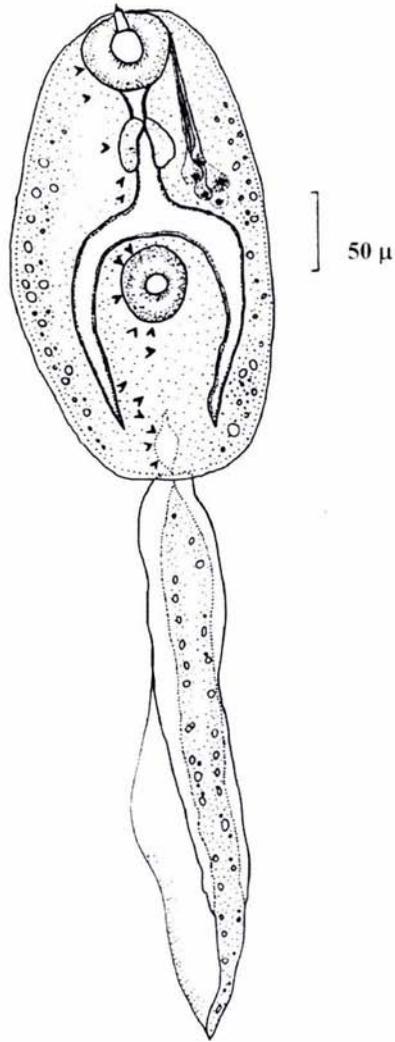


Fig. 5 Cercaria de *Glythelmins quieta* obtenida por infección natural del caracol *Physella cubensis cubensis* observada analizador de imágenes 40x.

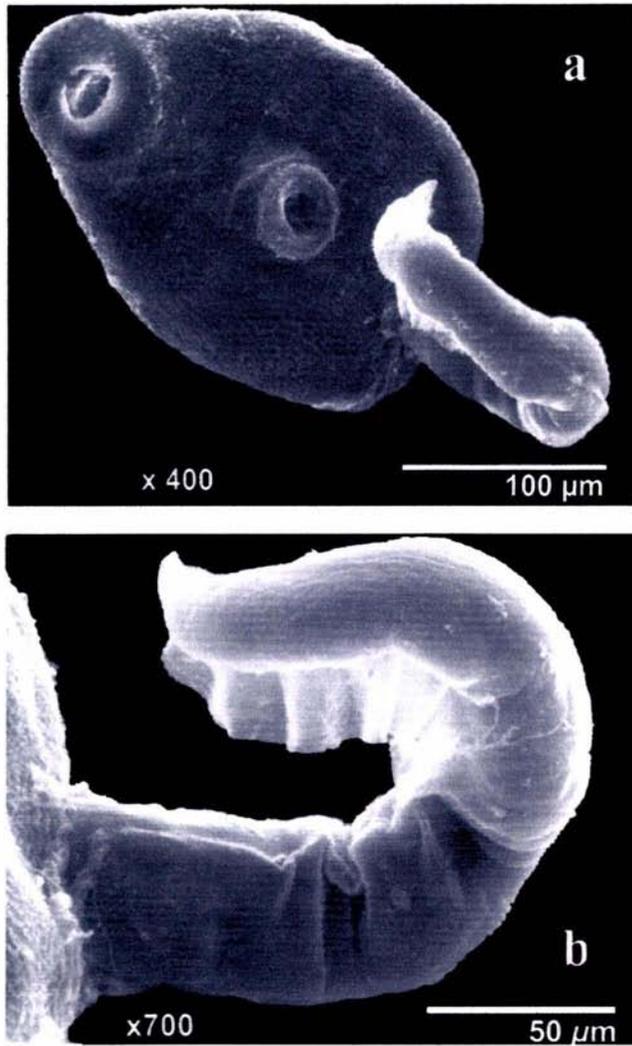


Fig. 6 Fotografía en microscopio electrónico de barrido de la cercaria de *Glypthelmins quieta*; a. cuerpo completo vista ventral donde se observa la ventosa oral en la parte anterior del cuerpo, el acetábulo ubicado en la parte media del cuerpo, b. vista de la cola ubicada en la región posterior del cuerpo mostrando claramente el velo.

Caracterización molecular de la cercaria

De las regiones amplificadas se obtuvieron bandas bien definidas (Fig. 7). En el caso de la región 28S se observan alrededor de 500 pares de bases utilizando los oligonucleótidos 28sa y 28sb. En la figura 7b se presenta el amplificado de la región ITS 1-5.8S-ITS 2 con 800 pares de bases se utilizaron los oligonucleótidos NAz y NAY; y en el caso de la figura 7c se utilizaron los oligonucleótidos NRz y NRY, presentando alrededor de 1 500 pares de bases (región 28S).

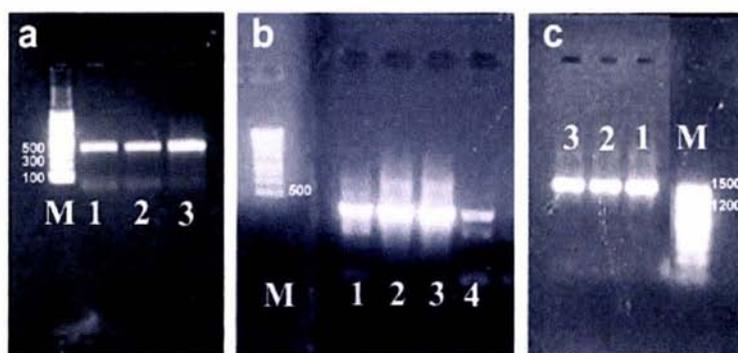


Fig. 7 Fragmento amplificado por PCR de la región ITS 1-5.8S-ITS 2 y el gen 28S para *Glythelmins quieta*, con los oligonucleótidos a. 28sa, 28sb; b. NAz, NAY; c. NRz, NRY; en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio con escala, M. marcador de peso molecular de 1k y 100b. Donde 1, 2, 3. extracción de la cercaria de *Glythelmins quieta*, 4. extracción de tejido del caracol *Physella cubensis cubensis*.

Se secuenciaron el gen 28S y 5.8S junto con los espaciadores ITS 1 e ITS 2 de la cercarias *Glythelmins quieta* obtenidas del caracol. Además se obtuvo la secuenciación de los espaciadores del tejido del caracol, para asegurarse que las muestras del parásito no se combinaran con las del hospedero. Las secuencias fueron obtenidas en ambas direcciones para los tres tipos de oligonucleótidos utilizados para la amplificación, mismas que coincidieron entre sí, dando como tamaño total secuenciado alrededor de 350 pares de

bases para el gen 28S con los oligonucleótidos 28sa y 28sb. Alrededor de 800 pares de bases con los oligonucleótidos NAz y Nay, 700 pares de bases aproximadamente para los oligonucleótidos NRz y NRY.

Las secuencias se revisaron en el programa “Chromas”; se copiaron los archivos a un procesador de texto para su lectura. El archivo trasladó las secuencias de los ejemplares obtenidos a la página del banco genético NCBI (Genbank) para analizarse y alinearse manualmente. Las secuencias obtenidas de la cercarias se alinearon y compararon con los datos de *Glythelmins quieta* reportado en el Genbank de gen 28S y 5.8S y los espaciadores ITS 1 e ITS 2. Se compararon 290 pares de bases para el espaciador ITS 1, 116 pares de base para el gen 5.8S, 273 pares de bases para el espaciador ITS 2 y 345 de pares de bases para el gen 28S como se muestra en la fig. 8.

Esta comparación mostró 100% de identidad con las secuencias de *Glythelmins quieta* registradas con el número AY278049. Así mismo se encontró 100% de identidad para el gen 5.8S y su espaciador ITS 2, cuando se comparó con los datos del Genbank número de registro AY278063. No se encontró registro para el espaciador ITS 1 para *Glythelmins quieta*.

ITS 1

*G. quieta** GTGCAGACTA GGCTCAGCCT TTTTACGCAA AGCGTATTTT GTCAATGTGG GTTGTCATGT CCACTTCCAT
*G. quieta** GCCTCGCGCG TGTATTTTTT ATTGGTAACT CGGTGCTGAG GCGTCGGTGT GGGCGTATTT TCGTAAGTGG
*G. quieta** TTATACACCA ACGTTGACCT ATGTAATCCC TCTTCGGTAT CTAGACTGTT GGGAGTTATT TATTAGTTAT
*G. quieta** TGGTTATACT CCC--TTAGT ACAGTCGACC GTTCTGGGTT CGGTGCTGAT TAAGGGGAG CACTATCAAA

5.8S

*G. quieta** TATTCGGCTG GG GTCGATGAAG AGCGCAGCCA ACTGTGTGAA TTAATGTGAA CTGCATACTG
G. quieta®
*G. quieta** CTTTGAACAT CGACATCTTC AACGCACATT GCGGCCATGG GTTGTCCTCAT GGCCACGCCT GTCCGAGGGT
G. quieta®
*G. quieta** CGGCTTATAA ACTATC ACGACGCCA ATTAGTCGTG GCTTGGGTCT TGGCCAGCTG ACATGATTCC
G. quieta®

ITS 2

*G. quieta** CTCATATTGG TTATTGATTA TTTATTGAGG GTTGTCAGAT CTATGGCTTC TCCCTAATGT ATCCAGTTGC
G. quieta®
*G. quieta** AACCACATAT TGGTGAATGC TTTTATGCGG GTGTGGCTGC GGAGTCGTGG CTCAATGGTT ATTTTTTATG
G. quieta®
*G. quieta** TGCGCGCTCC GTACCTTCAC CTGTACTGTT GGGGTAACT GTTTTTATGC GAAACGCATT TTTCTGACCTC
G. quieta®

28S

*G. quieta** GGATCAGACG TGAATA CATGTGCGCG AGTCATTGGG CGTTACGAAA CCCACAGGCG AAGTGAAAGT
G. quieta®
*G. quieta** AAAGGTCTGA CTGTTCAGG CTGAGGTGAG ATCTGTCTGT TTCCACGCG CGGTAATACC AAGCATCGAG
G. quieta®
*G. quieta** CGGCAGGCGC CGTCCCATGG ATCACCAGCC CATTGATTT CGGTGAGTTT TCGGTGCGGG CGGAGCATGA
G. quieta®
*G. quieta** GCGTACATGT TGAGACCCGA AAGATGGTGA ACTATGCTTG CGCAGGTTGA AGCCAGAGGA AACTCTGGTG
G. quieta®
*G. quieta** GAGGACCGCA GCGATTCTGA CGTGCAAATC GATCGTCAAA CGTGAGTATA GGGGCGAAAG ACTAATCGAA
G. quieta®
*G. quieta** CCATCTAGTA
G. quieta®

Fig. 8 Alineamiento de las secuencias de la región ITS 1-5.8s-ITS 2y del gen 28s de la cercaria de *Glythelmins quieta** obtenidas en este trabajo y *Glythelmins quieta*® en comparación con las registradas en el banco genético de NCBI. Estado idéntico a la secuenciada en el trabajo (.); deleción o inserción de pares de bases (-). Las bases que se representan son: Adenina (A), Timina (T), Guanina (G), Citocina (C).

DISCUSIÓN

La identificación taxonómica y estudios evolutivos de los tremátodos se basa primordialmente en la morfología de los adultos, pero también en las características de los estadios larvarios. La descripción incompleta de organismos o la carencia de datos sobre su ciclo de vida conlleva a la proliferación de datos confusos y determinación taxonómica incierta. Para resolver este problema es usualmente necesario completar el ciclo de vida en condiciones de laboratorio. Sin embargo, en la mayoría de los casos, es un proceso muy complicado y su probabilidad de éxito es circunstancial.

En este trabajo las cercarias fueron descritas con base en estudios *in vivo* y de cercarias fijadas y procesadas para hacer preparaciones permanentes que se estudiaron con microscopía óptica y electrónica de barrido. La cercaria descrita en el presente trabajo coincide con la morfología de la cercaria de *Glyphelmims quieta* (Stafford, 1900) Stafford, 1905. El ciclo de vida de esta especie fue descrito por Rankin (1944) y complementado por Leigh y Van Cleave, 1945 y Leigh, 1946 mediante desarrollos experimentales en los que se obtuvieron adultos.

Los datos descritos por Leigh 1946 de las cercarias de *Glyphelmims quieta* de las partes más significativas del cuerpo como son la forma y longitud, anchura del cuerpo, longitud de la cola, y proporción respecto de la longitud del cuerpo; la presencia del estilete oral, las dimensiones de la ventosa oral y del acetábulo, así como el número y disposición de las células flamígeras nos permite un amplio grado de confiabilidad respecto de esta identificación en comparación con las medidas obtenidas de este trabajo (Tabla 1).

Leigh en su trabajo no profundiza en la descripción de la cercaria, proporcionando pocas medidas del cuerpo que son importantes para hacer una comparación.

Algunas veces el mal procesamiento del material no permite una buena fijación del parásito y como consecuencia las medidas varían ampliamente.

μ	Leigh 1946	Trabajo presente 2003
Largo cuerpo extendido	576 x 196	228-333 (294)
Largo cola	30 - 60	27-41 (35)
Ventosa oral	84	41-64 (53)
Acetábulo	60	31-53 (42)

Tabla 1 Datos morfométricos comparativos entre órganos de la cercaria *Glyphelmims quieta* descrita por Leigh 1946 y este trabajo.

Los resultados obtenidos por microscopía electrónica de barrido no proporcionan mucha información general de la cercaria, más que a detalle se observó una discrepancia previamente observada en el microscopio óptico en el tegumento que recubre el cuerpo de los ejemplares; presenta el cuerpo recubierto de espinas en la superficie. Estas espinas no habían sido descritas anteriormente en las cercarias de *Glyphelmims quieta* o en cualquier otra especie del mismo género. El adulto, se describe como recubierto de escamas (Fig. 9) lo que nos sugiere que existe una amplia plasticidad de caracteres morfológicos para este género. Se recurrieron a técnicas moleculares para corroborar la identidad del estadio larvario con el adulto.

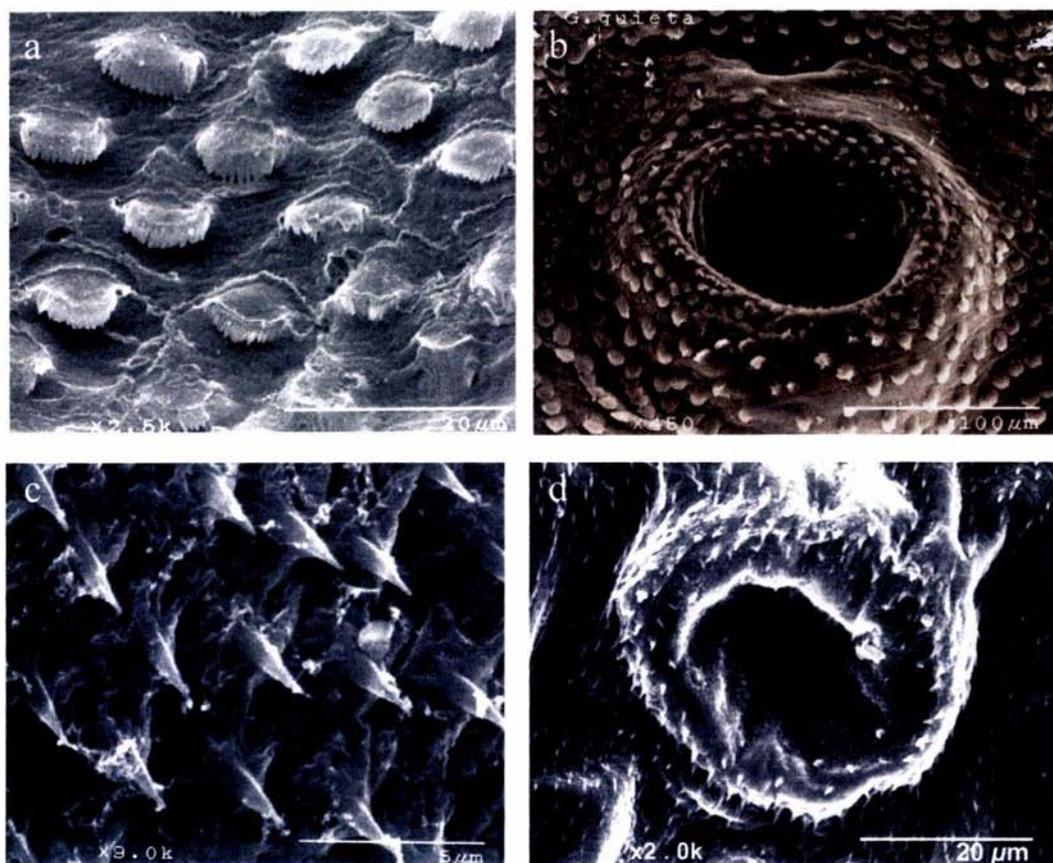


Fig. 9 Fotografía en microscopio electrónico de barrido mostrando las estructuras que recubren el tegumento, a. b. *Glythelmins quieta* adulto mostrando el cuerpo cubierto de escamas (proporcionadas por Ulises Razo-Mendivil, Laboratorio de Helmintología, Instituto de Biología, UNAM); c. d. cercaria de *Glythelmins quieta* obtenida en este trabajo recubierta de espinas.

Al comparar la amplificación de la región del gen 28S y 5.8S-ITS 1 con los datos publicados del banco genético, se confirma la identificación de la especie. Los resultados confirman que el gen ribosomal 28S y 5.8S sirve para distinguir especies de tremátodos Digeneos en estadios larvarios además de mostrarnos su historia evolutiva, ya que al ser un gen muy conservado muestra similitudes ancestrales entre especies, en contraste con los espaciadores, que proporcionan información más reciente al ser muy variables.

El estudio mostró las ventajas de utilizar herramientas moleculares, el análisis puede ser de gran ayuda para identificar estadios larvarios de Digeneos y eludir cerrar el ciclo de vida en condiciones de laboratorio. Las secuencias de las cercarias examinadas en este estudio mostraron 100% de identidad a las secuencias correspondientes de estadios adultos. La afinidad entre los diferentes estadios del parásito han sido confirmado en otras especies de Digeneos (Jousson et al., 1999, 1998)

Los resultados muestran la utilidad de los genes del rDNA, mostrando un alto potencial de las técnicas moleculares para completar los estudios clásicos morfológicos.

Podemos concluir que los datos moleculares son una alternativa útil para la identificación de especies; ya que pueden complementar los desarrollos tradicionales, como la infección experimental con estadios larvarios para completar ciclos de vida. Aunque todavía no existan suficientes trabajos que documenten los caracteres moleculares para la identificación de especies, es de primordial importancia la comparación con caracteres morfológicos. No obstante, las secuencias moleculares no son la única fuente que nos proporcionan datos, por lo que no debemos reemplazarlos o eliminarlos, especialmente a los que no son moleculares. Por lo contrario un estudio taxonómico se basa en la información disponible en el momento en que se hace, ya que no se puede reemplazar los estudios clásicos taxonómicos, únicamente complementarlos.

En el presente trabajo la aplicación de técnicas moleculares, se apoyan en el hecho de que otros genes y regiones han sido empleados en estudios enfocados a Platelminos. Este trabajo abre el camino para que en estudios subsecuentes relacionados o no con esta especie se apliquen las técnicas moleculares para determinar las especies de larvas por comparación con las secuencias de estadios adultos. Sin embargo, es necesario fomentar que se relacionen secuencias de los organismos adultos y sobre todo que se publiquen en el banco de genes. En la medida en que se conozca la secuencia molecular de las especies, por comparación y sin necesidad de completar los ciclos de vida podrán determinarse las formas larvarias.

CONCLUSIONES

- Nuestros datos sugieren el genoma entre cercarias y adultos no cambia.
- Es posible utilizar técnicas moleculares para la identificación de estadios larvarios hasta nivel de especies.
- El gen ribosomal 28s sirve para distinguir especies de tremátodos Digeneos en estadios larvarios mostrando pocas modificaciones genéticas a lo largo del tiempo.
- Se confirma la susceptibilidad de los espaciadores mostrando alta confiabilidad en las variaciones genéticas por ser las regiones más variables del rDNA.

BIBLIOGRAFÍA

- ABDUL-SALAM, J. and S. N. B. SREELATHA.** 1995. Studies on cercariae from Kuwait Bay. VI Description and surface topography of *Cercaria kuwaitae* VI sp. n. (Trematoda : Haplosporididae). *The Korean Journal of Parasitology* 33: 147-153.
- ALMEYDA-ARTIGAS, R. J.; M. D. BARGUES and S. MAS-COMA.** 2000. ITS 1 rDNA sequencing of *Gnathostoma* species (Nematoda) and elucidation of the species causing human gnathostomiasis in the Americas. *Journal of Parasitology* 86: 537-544.
- BURSEY, R. C. and GOLDBERG, R. S.** 2001. *Falcaustra lowei* n. sp. and other helminths from the tarahumara frog, *Rana tarahumara* (Anura: Ranidae), from Sonora, Mexico. *Journal of Parasitology* 87: 340-344.
- CABALLERO y CABALLERO, E. y FLORES-BARROETA E HIDALGO.** 1961. Investigación sobre dermatitis esquistosómica en el Lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. *Revista Biología Tropical* 9: 17-21.
- CAMPBELL, J. D.; R. B. GASSER and N. B. CHILTON.** 1995. Differences in a ribosomal DNA sequence of *Strongylus* species allows identification of single eggs. *Journal of Parasitology*, 25: 359-365.
- CAMPOS, A., M. P. CUMMINGS, J. L. REYES and J. P. LACLETTE.** 1998. Phylogenetic relationships of Platyhelminthes based on 18s ribosomal gen sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 10: 1-10.
- CHILTON, N. B., R. B. GASSER and I. BEVERIDGE.** 1997. Phylogenetic relationship of Australian strongloid nematodes inferred from ribosomal DNA sequence data. *Journal of Parasitology* 27: 1481-1494.

- CHILTON, N. B., R. B. GASSER and I. BEVERIDGE.** 1995. Differences in a ribosomal DNA sequence of morphologically indistinguishable species within the *Hypodontus macropi* complex (Nematoda: Strongyloidea) *International Journal of Parasitology* 25: 647-51.
- CRIBB, T. H., G. R. ANDERSON, R. D. ADLARD and R. A. BRAY** 1998. A DNA-based demonstration of a three-host life-cycle for the Bivesiculidae (Platyhelminthes: Digenea). *International Journal of Parasitology* 28: 1791-1795.
- DeMARCO, R., A. T. KOWALTOWSKI, R. A. MORTARA and S. VERJOVSKI-ALMEIDA.** 2003. Molecular characterization and immunolocalization of *Schistosoma mansoni* ATP-diphosphohydrolase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 307: 831-838.
- DITRICH, O., T. SCHOLZ, M. L. AGUIRRE-MACEDO and J. VARGAS-VAZQUEZ.** 1997. Larval stage of trematodes from freshwater molluscs of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Folia Parasitologica* 44: 109-127.
- GASSER, R. B.** 2001. Molecular taxonomic, diagnostic and genetic studies of parasitic helminths. *International Journal of Parasitology* 31: 860-864.
- GASSER, R. B.** 1999. PCR-based technology in veterinary parasitology. *Veterinary Parasitology* 84: 229-258.
- GOLDBERG, R. S. and BURSEY R. C.** 2002. Helminth parasites of seven anuran species from northwestern Mexico. *Western North American Naturalist* 62: 160-169.
- GOLDBERG, R. S.; R. C. BURSEY and E. J. PLATZ.** 2000. Helminths of the plains leopard frog, *Rana blairi* (Ranidae). *The Southwestern Naturalist* 45: 362-363.

- HILLIS, D. M. and T. M. DIXON.** 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology* 66: 411-453.
- HOSTE, H., N. B. CHILTON; I. BEVERIDGE and R. B. GASSER.** 1998. A comparison of the first internal transcribed spacer of ribosomal DNA in seven species of *Trichostrongylus* (Nematoda: Trichostrongylidae). *Journal of Parasitology* 28: 1251-1260.
- IVANCHENKO, M. G.; J. P. LERNER, R. S. McCORMICK, A. TOUMADJE, B. ALLEN, K. FISHER, O. HEDSTROM, A. HELMRICH, D. W. BARNES and C. J. BAYNE.** 1999. Continuous *in vitro* propagation and differentiation of cultures of the intramolluscan stages of the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Cell Biology* 96: 4965-4970.
- JOHNSON, D. A.; R. A. KANE and D. ROLLINSON.** 1993. Small subunit (18S) ribosomal RNA gene divergence in the genus *Schistosoma*. *Parasitology* 107: 147-156.
- JOUSSON, O.; P. BARTOLI and J. PAWLOWSKI.** 1999. Molecular identification of developmental stages in Opecoelidae (Digenea). *International Journal of Parasitology* 29: 1853-1858.
- JOUSSON, O.; P. BARTOLI, L. ZANINETTI and J. PAWLOWSKI.** 1998. Use of the ITS rDNA for elucidation of some life-cycle of Mesometridae (Trematoda: Digenea). *International Journal of Parasitology* 28: 1403-1411.
- LAMOTHE-ARGUMEDO, R.** 1997. *Manual de técnicas para preparar y estudiar los parásitos de animales silvestres*. AGT editor, México 42 pp.

- LAMOTHE-ARGUMEDO, R.** 1981. Hospedero definitivo e intermediario de *Paragonimus mexicanus*, Miyasaki e Ishii, 1968 en México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Autónoma de México* 52: 39-44.
- LEIGH, H. W. and H. J. VAN CLEAVE.** 1945. Metamorphosis of the host as a factor in cercarial penetration by *Glythelmins quieta*. *Journal of Parasitology* 31: 205-209.
- LEIGH, H. W.** 1946. Experimental studies on the life cycle of *Glythelmins quieta* (Stafford, 1900) a trematode of frogs. *American Midland Naturalists* 35: 460-483.
- LEÓN-RÉGAGNON, V., D. R. BROOKS and D. A. ZELMER.** 2001. Morphological and molecular description of *Haematoloechus meridionalis* n. sp. (Digenea: Plagiorchioidae: Haematoloechidae) from *Rana vaillanti brocchi* of Guanacaste, Costa Rica. *Journal of Parasitology* 87: 1423-1427.
- LEÓN-RÉGAGNON, V., D. R. BROOKS and G. PÉREZ-PONCE DE LEÓN.** 1999. Differentiation of mexican species of *Haematoloechus* Looss, 1899 (Digenea: Plagiorchiformes): molecular and morphological evidence. *Journal of Parasitology* 85: 935-946.
- LEÓN-RÉGAGNON, V.** 1992. Fauna helmintológica de algunos vertebrados acuáticos de la Ciénaga de Lerma, Estado de México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México* 63: 151-153.
- LUTON, K.; D. WALKER and D. BLAIR.** 1992. Comparisons of ribosomal internal transcribed spacers from two congeneric species of flukes (Platyhelminthes: Trematoda: Digenea). *Molecular and Biochemical Parasitology* 56: 323-328.

- MARTÍNEZ-SALAZAR, E. A.** 2001. *Estudio de la variación morfológica y molecular de las larvas del tercer estadio avanzado de Gnathostoma sp. (Netamoda: Gnathostomidae) en algunos peces de la Laguna de Tres Palos, Guerrero, México.* Tesis profesional, Facultad de Ciencias UNAM, México 76 pp.
- McDONNELL, A.; S. LOVE, A. TAIT, J. R. LICHTENFELS and J. B. MATTHEWS.** 2000. Phylogenetic analysis of partial mitochondrial cytochrome oxidase c subunit 1 and large ribosomal RNA sequence and nuclear internal transcribed spacer 1 sequence from species of *Cyathostominae* and *Strongylina* (Nematoda, Order Strongylida), parasites of the horses. *Parasitology* 121: 649-659.
- McMANUS, D. P. and J. BOWLES.** 1996. Molecular genetic approaches to parasite identification: Their value in diagnostic parasitology and systematics. *International Journal for Parasitology* 26: 687-704.
- MORGAN, J. A. and D. BLAIR.** 1998. Relative merits of nuclear ribosomal internal transcribed spacer and mitochondrial COI and NDI genes for distinguishing among *Echinostoma* species (Trematoda). *Parasitology* 116: 289-297.
- MUZZAL, P. M. and R. C. PEEBLES.** 1991. Helminths of the wood frog, *Rana sylvatica*, and spring peeper, *Pseudacris c. crucifer*, from southern Michigan. *Journal Helminthology Society of Whashington* 58: 263-265.
- NADLER, S. A., R. L. LINDQUIST and T. J. NEAR.** 1995. Genetic structure of midwestern *Ascaris suum* populations: a comparison of isoenzyme and RAPD markers. *Journal of Parasitology* 81: 385-394.
- NADLER, S. A.** 1992. Phylogeny of some arcaridoid nematodes, inferred from comparison of 18s and 28s sequences. *Molecular Biology and Evolution* 9: 932-944.

- NADLER, S. A.** 1990. Molecular approaches to studying helminth population genetics and phylogeny. *International Journal of Parasitology* 20: 11-29.
- OBWALLER, A.; H. SATTMANN, R. KONECNY, C. HÖRWEIG, H. AUER and H. ASPÖCK.** 2001. Cercarial dermatitis in Austria: the recent situation and future aspects. Workshop on bird schistosomes and cercarial dermatitis held at Dolní Věstonice (Czech Republic) September 10-14, 2001 in: *Helminthologia* 38: 243-250.
- OLSON, P. D.; T. H., CRIBB, V. V. TKACH, R. A. BRAY and D. T. J. LITTLEWOOD.** 2003. Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). *International Journal of Parasitology* 33: 733-755.
- PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G.; V. LEÓN-RÉGAGNON; L. GARCÍA-PRIETO; U. RAZO-MENDIVIL and A. SÁNCHEZ-ALVAREZ.** 2000. Digenean fauna of Amphibians from Central Mexico: Neartic and Neotropical influence. *Comparative Parasitology* 67: 92-106.
- PROKOPIČ, J. and K. KRIVANEC.** 1974. Trematodes of the genus *Haematoloechus* Looss, 1899 and their variability. *Helminthologia (Bratislava)* 15: 779-802.
- PULIDO, F. G.** 1994. Helmintos de *Rana dunni* especie endémica del Lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México* 65: 205-207.
- RANKIN, J. S. Jr.** 1944. A review of the trematode genus *Glythelmins* Stafford, 1905, with an account of the life cycle of *Glythelmins quieta* (Stafford, 1900) Stafford, 1905. *Transactions of the American Microscopical Society* 1: 30-43.
- RAZO-MENDIVIL, U.; V. LEÓN-RÉGAGNON and G. PÉREZ-PONCE DE LEÓN** 2004. Molecular differentiation of two new species of *Glythelmins* Stafford, 1905 (Digenea: Macroderoididae) in *Rana* spp. From Mexico (en prensa).

- RAZO-MENDIVIL, U.** 2004. *Sistemática, filogenia y biogeografía del género *Glythelmins* (Stafford, 1905) parásito de anuros*. Tesis de Doctorado, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (en prensa).
- RAZO-MENDIVIL, U.; J. P. LACLETTE and G. PÉREZ-PONCE DE LEÓN.** 1999. New host and locality records for three species of *Glythelmins* (Digenea: Macroderoididae) in anurans of Mexico. *Journal Helminthology Society of Washington* 66: 197-201.
- RAZO-MENDIVIL, U.** 1998. *Utilización de caracteres morfológicos y moleculares para la identificación de tres especies de *Glythelmins* (Digenea), parásitos de anuros de México*. Tesis profesional, Facultad de Ciencias UNAM, México 50 pp.
- SALGADO-MALDONADO, G.; N. MERCADO-SILVA, G. CABAÑAS-CARRANZA, J. M. CASPETA-MANDUJANO, R. AGUILAR-AGUILAR and L. I. IÑIGUEZ-DAVALOS.** 2004. Helminthes of the freshwater fishes from Ayuquila river, Sierra de Manantlán biosphere reserve west central Mexico. *Comparative Parasitology* (en prensa).
- SALGADO-MALDONADO, G.; G. CABAÑAS-CARRANZA, J. M. CASPETA-MANDUJANO, E. SOTO-GALERA, E. MAYÉN-PEÑA, D. BRAILOVSKY and R. BÁEZ-VÁLE.** 2001a. Helminth parasites of freshwater of the Balsas river drainage basin of southwestern México. *Comparative Parasitology* 68: 196-203.
- SALGADO-MALDONADO, G.; G. CABAÑAS-CARRANZA, E. SOTO-GALERA, J. M. CASPETA-MADUJANO, R. G. MORENO-NAVARRETE, P. SÁNCHEZ-NAVA and R. AGUILAR-AGUILAR.** 2001b. Checklist of helminth parasite of freshwater fishes from Lerma-Santiago river basin, México. *Comparative Parasitology* 68: 204-218.

- SHABAAN, A. M.; M. M. MOHAMED, M. S. ABDALLAH, H. M. IBRAHIM and A. M. KARIM.** 2003. Analysis of *Schistosoma mansoni* genes using expressed sequence Tag approach. *Acta Biochemica Polonica* 50: 259-268.
- STAFFORD, J.** 1905. Trematodes from Canada vertebrates. *Zoologischer Anzeiger* 21: 681-695.
- STAFFORD, J.** 1900. Some undescribed trematodes. *Zoology Jahrbuch Abstracts System* 13: 399-414.
- SERENO-URIBE, A. L.** 2003. *Ciclo de vida de Ochetosoma brevicaecum (Caballero y Caballero, 1941) y Posthodiplostomum minimum (MacCallum, 1921) en condiciones de laboratorio.* Tesis de Maestría, Instituto de Biología, UNAM, México 55 pp.
- SERENO-URIBE, A. L.** 2001. *Ciclo de vida de Echinoparyphum recurvatum (Linstow, 1873) (Trematoda: Echinostomatidae) en condiciones de laboratorio.* Tesis profesional, Facultad de Ciencias UNAM, México 42 pp.
- SCHOLZ, T.; M. L. AGUIRRE-MACEDO, A. T. FLORES-DÍAZ DE LEÓN and O. DITRICH.** 2000. Larval stages of trematodes in mexican freshwater molluscs: a review of present state and methodology for future research. In: *Metazoan parasites in the Neotropical: a systematic and ecological perspective.* G. Salgado-Maldonado, A. N. García-Aldrete and U. M. Vidal-Martínez (eds) Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México: 77-100.
- SMYTH, J. and M. SMYTH.** 1980. *Frog as host-parasites systems I.* MacMillan Press LTD. Hong Kong 112 pp.

- THIENGO, S. C.; M. A. FERNANDEZ, M. F. BOAVENTURA, M. G. MAGALHÃES and S. B. SANTOS.** 2002. Freshwater snails and Schistosomiasis mansoni in the state of Rio de Janeiro, Brazil: III – Baixadas mesoregion. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97: 43-46.
- UNNASCH, T. and P. A. ZIMMERMAN.** 1995. Systematics; questions and approaches for the molecular parasitologist. *In: molecular approaches to parasitology*, Boothroyd, J. C. and K. M. Komuniek (eds). Wiley-Liss Inc. New York: 5-20.
- YAMAGUTI, S.** 1975. *A synoptical review of life histories of Digenetic trematodes of vertebrates*. Keigaku Publishing Co. Tokyo 590 pp. + 219 Lams.