



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Identificación de las metacercarias de *Posthodiplostomum minimum* por técnicas de PCR en peces dulceacuícolas de México.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A:
MIRIAM ERANDI REYNA FABIÁN

DIRECTOR DE TESIS:
DR. GUILLERMO SALGADO MALDONADO
CO-DIRECTOR DE TESIS:
DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ



2005

m341861





UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Identificación de las metacercarias de Posthodiplostomum minimum por técnicas de PCR en peces dulceacuícolas de México"

realizado por Miriam Erandi Reyna Fabián

con número de cuenta 9715104-1 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

- | | | |
|----------------------|------------------------------------|--|
| Director de Tesis | Dr. Guillermo Salgado Maldonado | |
| Propietario | Dr. Julio César Carrero Sanchez | |
| Co-Director de Tesis | | |
| Propietario | Biól. Guillermina Cabañas Carranza | |
| Propietario | M. en C. Eduardo Soto Galera | |
| Suplente | Biól. Luis José Delaye Arredondo | |
| Suplente | | |

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



DEDICATORIA.

A la persona más noble y bondadosa, buen ejemplo y mi guía en esta complicada vida,
gracias por tu infinito e incondicionable amor: te amo mamá.

A mis hermanos, por que en las buenas y en las malas siempre estaremos juntos, los adoro.

A mi padre que se preocupa de nuestra superación.

A la familia Fabián y mi tía Kenya por ser tan buenos con la familia y mantenerse siempre juntos, los quiero a todos. A mis primos: Kathy, Max y Ximena por ser fuente de inspiración y recordarme que la vida esta llena de inmensas alegrías.

A mi abuelita que me recuerda que ante todo la vida sigue adelante y hay que vivirla, siempre estas en mi corazón.

A mi Jesusito (Chucho) por enseñarme otro lado de la vida lleno de cariño y tolerancia, sabes lo que significas para mi chiquito.

A mis amigos del alma: Ale, Irma, Mariel, Andrés, Ana, Idalia, Nancy, Laura, Wendy y David por estar siempre a mi lado y quererme tal como soy.

A todos los que me han apoyado a que termine este sueño y empiece el que sigue.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi “alma mater” por permitirme crecer y superarme en esta gran institución tanto en lo personal como en lo profesional.

A la Facultad de Ciencias por permitirme crecer y enriquecer mis conocimientos, así como por darme la oportunidad de conocer a maestros que impulsaron mis deseos de disfrutar día a día la carrera que elegí.

A las autoridades del Instituto de Biología por permitirme hacer uso del material e instalaciones durante la elaboración de esta tesis.

A las autoridades del Instituto de Investigaciones Biomédicas por brindarme todo el apoyo técnico indispensable para la elaboración del trabajo de laboratorio.

Al Maestro Eduardo Soto Galera por darme parte del apoyo necesario en la investigación de campo, sin la cual no hubiese sido posible el desarrollo de este trabajo.

A Memo no solo por la dirección de este trabajo de investigación, si no por permitirme expresar mis ideas y dejarme llevarlas a cabo en el área que tanto me apasiona, gracias por despertar en mí el interés hacia la investigación.

Al Dr. Julio César Carrero Sánchez por dirigirme en conjunto esta tesis y por ampliar de una manera extraordinaria mis conocimientos en el área de biología molecular y sobre todo por creer en la idea de que áreas tan distintas pueden fusionarse en un tema de investigación.

Al Dr. Juan Pedro Laclette por permitirme hacer uso del laboratorio de Inmunología, así como por sus ideas y comentarios al trabajo realizado.

A Guille Cabañas Carranza por ser mi guía, apoyo, maestra y sobre todo mi amiga en todos los momentos que la necesité. Jamás terminaré de agradecerte lo que me enseñas de la vida.

A Luis Delaye por su gran enseñanza durante mi formación de Bióloga, por ser una persona muy accesible y por contribuir en gran medida a la revisión de esta tesis.

A Patricia Escalante por todo su apoyo técnico en la obtención de secuencias, en la orientación y enseñanza del uso de los aparatos de laboratorio, gracias por estar siempre al pendiente del trabajo.

A mis compañeros del laboratorio de Inmunología y Helminología Hugo, Adrián, Claudia, César, Paty, Dr. Pedro y Carlos por hacerme tan amena la estancia en los momentos de trabajo y sobretodo por ser tan buenos amigos. A Petrix, Ana, Mirza, Carlos, Andrés y Rogelio mis compañeros desde el inicio de este proyecto.

Y a todos los que contribuyeron de alguna manera a mi motivación para concluir este trabajo que aunque parezca corto requirió gran dedicación.

Este trabajo fue realizado mediante el apoyo económico de los proyectos:

CONACYT, SEMARNAT-2002-CO1-1107

D.G. P.A. IN206102-3

CONACYT 41693-M

AL PROGRAMA DE BECAS DE TESIS, PROBETEL DE JULIO-DICIEMBRE DEL 2004.

INDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Plantamiento del problema	4
ANTECEDENTES	6
<i>Posthodiplostomum minimum</i>	6
Reacción en cadena de la polimerasa	8
OBJETIVOS	10
MATERIAL Y MÉTODO	11
RESULTADOS	21
Morfología de metacercarias y adultos	21
Purificación de ADN y PCR	26
Análisis de las secuencias	29
DISCUSIÓN	35
APENDICES	39
ANEXOS	42
BIBLIOGRAFÍA	43
DIBUJOS Y TABLAS	52

RESUMEN

Posthodiplostomum minimum constituye una de las especies de helmintos más ampliamente distribuidas como parásito de peces dulceacuícolas de México (Salgado-Maldonado y Kennedy 1997; Salgado-Maldonado *et al.* 2001a, 2001b; Aguilar-Aguilar *et al.* 2003). Dentro de estos peces se encuentra el estadio larvario denominado “metacercaria”, del cual resulta difícil establecer su determinación taxonómica específica debido principalmente al poco desarrollo de los órganos reproductores, estructuras en las cuales se basa parte de la taxonomía.

Con el fin de identificar las metacercarias de los hospederos *Alloophorus robustus* (Lago de Pátzcuaro), *Chapalichtys encaustus* (Lago de Chapala) y *Poecilia mexicana* (Villa Flores, Chiapas) se secuenció la subunidad ribosomal 18S rADN mediante la técnica de la PCR y se comparó con las secuencias de la base de datos “GeneBank”. Estas metacercarias se identificaron como miembros de la especie *Posthodiplostomum minimum* ya que concuerdan con la única secuencia parcial del 18S rADN reportada previamente para esta especie en México.

La extracción de ADN se llevó a cabo con distintos métodos de extracción evaluando la efectividad de cada uno de ellos, siendo más eficiente el Kit de amplificación de ADN total de “Genomiphi”. Por otro lado, se estandarizó una técnica de extracción de ADN a partir de una sola metacercaria, así como la técnica de la PCR para la amplificación de la subunidad 18S rADN.

Este trabajo aporta la secuencia parcial del 18S de las metacercarias de *P. minimum* en tres hospederos de distintas localidades, comprobando que todos pertenecen a la misma especie.

INTRODUCCIÓN

La identificación de los parásitos en cualquier estadio de desarrollo es básica para su diagnóstico, además tiene implicaciones importantes por ejemplo en el estudio de control de enfermedades. Sin embargo, la identificación específica de estadios larvales de helmintos parásitos es casi imposible con base en caracteres morfológicos.

Los digeneos presentan ciclos de vida complejos con 2 o 3 hospederos y varios estadios de desarrollo. El primer hospedero intermediario de la mayoría de los digeneos es un gastrópodo y el hospedero final un vertebrado (Pearson, 1972). Se desconocen los estadios larvarios de la mayoría de las especies de este grupo y resulta difícil establecer la relación entre larvas y adultos de una misma especie viviendo en organismos diferentes.

Una herramienta útil para la identificación de larvas es el empleo de infecciones experimentales, las cuales proporcionan los mejores resultados para discernir los ciclos de vida de los digeneos (Scholz *et al.* 1997), así como datos importantes para su estudio evolutivo (Turceková, 2003 y Pearson, 1972). Sin embargo, estos métodos involucran una inversión considerable de tiempo y no siempre resultan exitosos.

Adicionalmente, las aproximaciones tradicionales utilizando la morfología comparativa son de valor limitado para resolver problemas de taxonomía e identificación de parásitos, debido a que algunos caracteres no son informativos filogenéticamente.

El uso de análisis de secuencias de ADN en taxonomía ha ayudado a resolver estos problemas debidos a que el código genético es degenerativo, lo que significa que la tercera base no juega un papel en la determinación de los aminoácidos. Por lo tanto, algunos cambios en los aminoácidos son neutrales funcionalmente ya que no alteran las propiedades

del fenotipo. Como consecuencia, si el taxónomo reconoce similitudes significativas entre dos secuencias de nucleótidos alineadas de organismos diferentes, estas dos secuencias se conocen como homólogas, lo que indica con amplio margen de seguridad que pertenecen a una misma especie.

Las ventajas de las técnicas moleculares, especialmente aquellas que se basan en la amplificación de los ácidos nucleicos es que permiten una identificación rápida y certera de las especies y aseguran resultados utilizando muy poca cantidad de material inicial.

El alcance de la biología molecular también se ha desarrollado como una alternativa para dilucidar algunos ciclos de vida de parásitos como los digeneos (Jousson, 1998), entre otros.

En las dos últimas décadas la biología molecular ha tenido avances significativos en la aplicación de técnicas que implican la manipulación de ADN y ARN para identificación y diagnóstico.

La tecnología del ADN ha provisto estrategias alternativas para la identificación de parásitos en estadios donde los caracteres morfológicos son de valor limitado. En específico, las secuencias de ADN ribosomal (rADN) representan una herramienta útil para la identificación de estadios de desarrollo con pocas diferencias morfológicas como es el caso de las cercarias y metacercarias en tremátodos. Los métodos más utilizados para esta finalidad son los basados en la PCR de análisis genotípico, con los cuales es posible identificar taxonómicamente a los parásitos en cualquier estadio de desarrollo (Jousson *et al.* 1999). Itagaki, *et al.*, en 1998 llegan a la conclusión al mencionar que el análisis de secuencias de ADN ofrece la aproximación más directa para la caracterización genética de diferentes especies de parásitos.

La secuencia de la región del espacio de transcripción interna (ITS) del rADN ha permitido diferenciar especies en *Fasciola* (Adlard, 1992), *Schinostoma* (Desprès, 1995), o para establecer relaciones sistemáticas entre diplostómidos (Niewiadomska y Laskowski, 2002).

Diversos autores (Morgan & Blair 1995, Jousson *et al.* 1998) han utilizado el ITS-1 de esta región para la determinación de afinidades filogenéticas entre especies de digeneos muy emparentados entre sí.

Planteamiento del problema

Las metacercarias tipo “Neascus”, que son las metacercarias asociadas a la especie *Posthodiplostomum minimum*, se han registrado en México por Pineda- López *et al.*, 1985; 1986, Aguirre-Macedo y García-Magaña, 1995. Vidal-Martínez *et al.*, (2001), sugiriendo que todas estas metacercarias correspondían a la especie *P. minimum*. En el mismo orden, el estudio morfométrico de metacercarias de peces del Lago de Pátzcuaro sugirió que todas las metacercarias de este tipo correspondían a *P. minimum* (Pérez, 1995). Sin embargo, en el sureste mexicano Scholtz *et al.*, (1995) documentaron la presencia de dos formas distintas de metacercarias de *Posthodiplostomum* sp. en cenotes de la Península de Yucatán.

La amplitud de la distribución de las metacercarias identificadas morfológicamente como *P. minimum* en peces de agua dulce de México pone de manifiesto variaciones morfológicas que ponen en duda la identidad específica de estas metacercarias. Las principales variaciones morfológicas documentadas en la literatura para las metacercarias del tipo de *P. minimum* incluyen el tamaño del cuerpo, la disposición de la ventosa oral,

forma del órgano tribocítico y la localización del primordio del ovario. Estas variaciones se han observado en adultos en infecciones experimentales y se ha encontrado que dependen del tipo de hospedero que parasita, efectos derivados de la densidad poblacional del parásito y como resultado de distintos métodos de fijación (Palmieri 1977a, 1977b, 1977c; Pérez 1995, Sitko 1995, Martorelli e Ivanov 1996).

Para *P. minimum* solo existen reportadas 2 secuencias de la subunidad ribosomal 18S (18S rADN), dichas secuencias pertenecen a metacercarias de México y de U.S.A.

Con este proyecto se pretende corroborar la determinación específica de metacercarias y los adultos a los que dan lugar en infecciones experimentales, mediante morfología y secuencias moleculares de la subunidad ribosomal 18S para verificar la presencia inequívoca de *P. minimum* en el Lago de Pátzcuaro y corroborar la hipótesis de que todas las metacercarias obtenidas de este lago, incluyendo sus variaciones, corresponden a esta especie.

Una vez obtenida la secuencia de las metacercarias y adultos de esta especie con material del Lago de Pátzcuaro, se pretenden identificar metacercarias identificadas morfológicamente como *P. minimum* para corroborar molecularmente su identidad específica, en particular metacercarias del hígado de *Chapalichthys encaustus* del lago de Chapala y de los ojos de *Poecilia mexicana* en Villa flores, Chiapas mediante la alineación de sus secuencias parciales obtenidas de la subunidad ribosomal 18S.

ANTECEDENTES

Posthodiplostomum minimum (MacCallum, 1921) Dubois, 1936

Yamaguti (1971) reconoce para el Continente Americano 10 especies del género *Posthodiplostomum*: *P. minimum* (Mac Callum, 1921), *P. obesum* (Lutz, 1928), *P. microsicya* (Dubois, 1936), *P. grande* (Dubois, 1937), *P. macrocotyle* (Dubois, 1937), *P. nanum* (Dubois, 1937), *P. prosostomum* (Dubois & Rausch, 1948), *P. boydae* (Dubois, 1969), *P. opisthosicya* (Dubois, 1969), y *P. giganteum* (Dubois, 1988).

Posthodiplostomum minimum es una especie de origen Neártico; sus metacercarias han sido registradas en peces de América del Norte, incluyendo Canada (Gibson, 1996) y Estados Unidos de Norte América (Margolis & Kabata 1996; Hoffman 1999), México y una parte de Centroamérica.

Las metacercarias de *P. minimum* constituyen una de las especies de helmintos más ampliamente distribuidas como parásito de peces dulceacuícolas de México (Salgado-Maldonado y Kennedy 1997; Salgado-Maldonado *et al.* 2001a, 2001b; Aguilar-Aguilar *et al.* 2003). Hasta la fecha se han registrado en 131 especies de peces dulceacuícolas, de 19 familias y 12 órdenes en las Cuencas del Papaloapan, Balsas, Lerma-Santiago y Grijalva-Usumacinta.

La forma adulta de *P. minimum* se ha registrado en México en intestinos de aves *Casmerodius albus*, *Egretta thula*, *Nycticorax nycticorax*, *Larus delawarensis* y *Ardea alba* en Michoacán, Tabasco y Yucatán (Pineda-López *et al.*, 1985a; Lamothe-Argumedo y Pérez, 1986; Aguirre-Macedo y García-Magaña, 1994; Pérez, 1995, Ortega-Olivares, 2004).

En Pátzcuaro se ha registrado la presencia de los adultos de *P. minimum* en tres especies de aves ictiófagas *Egretta thula*, *Casmerodius albus* y *Nycticorax nycticorax* (Pérez, 1992).

Como infecciones esporádicas en donde el parásito adulto no alcanza la madurez sexual se encuentra en la salamandra *Ambystoma dumerilii* y en la tortuga *Kinosternon hirtipes* (Pérez, 1992), como metacercaria se tienen registros de esta especie por Osorio *et al.*, 1986; Lamothe y Pérez, 1986; Salgado-Maldonado y Osorio, 1987; Salgado-Maldonado *et al.*, 2001b.

Para el estado de Chiapas existen pocos reportes de infecciones por esta metacercaria, uno de ellos es en *Cichlasoma hartwegi* y el registro de este trabajo en *P. mexicana*.

La forma adulta de *P. minimum* se encuentra en el intestino de aves predominantemente Ciconiformes y Caradriformes. Algunos mamíferos, reptiles y anfibios han sido registrados como hospederos experimentales de esta especie, logrando obtener adultos maduros sexualmente.

Los huevos producidos por el parásito dentro de los hospederos definitivos garzas y avocetas, son depositados en el intestino y salen junto con las heces al cuerpo de agua. En el agua, los huevos desarrollan miracidios que penetran al primer hospedero intermediario, el cual para el caso de *P. minimum* es un caracol del género *Physa*; en Pátzcuaro el hospedero intermediario es *Physella cubensis cubensis* (Sereno-Uribe, 2004). Dentro del caracol se desarrollan dos generaciones de esporocistos y una de redia antes de liberar a las cercarias. La cercaria infecta a los peces, su segundo hospedero intermediario, en las 24 horas después de ser liberada. La cercaria alcanza activamente las escamas y penetra por debajo de ellas. Migra desde el punto de penetración a vísceras a través del sistema circulatorio en las 3 ó 4

horas posteriores a la infección. La metacercaria enquistada se localiza en casi todos los órganos del pez, siendo más común en el hígado, corazón y riñón. Cuando el hospedero intermediario infectado es comido por el hospedero definitivo se cierra el ciclo de vida de este parásito.

Reacción en cadena de la polimerasa

Saiki *et al* (1988) perfeccionaron el método de Mullis (Mullis, K. 1990) que provee una solución al problema de ensayos de hibridación con baja sensibilidad de ADN, o bajas cantidades de ADN blanco en los parásitos. Utilizando la *Taq* ADN polimerasa, una enzima termoestable aislada de la bacteria *Thermus aquaticus*, es posible amplificar del ADN blanco millones de copias con un método llamado Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Durante la PCR se amplifican enzimáticamente regiones específicas de ADN mediante ciclos sucesivos. Cada ciclo consiste de tres pasos; en el primero o de desnaturalización, la cadena de ADN se desnaturaliza separando las dos hebras de ADN. En el segundo paso o de alineamiento, dos oligonucleótidos diferentes (conocidos como “primers”) se hibridan a las secuencias complementarias en cada hebra del ADN blanco. En el tercer paso o de extensión, la enzima ADN polimerasa cataliza la unión de los desoxinucleótidos trifosfatos, que se encuentran presentes en la solución, a los dos oligonucleótidos en dirección 5’ a 3’ (Singh, 1997). En los ciclos subsecuentes, el ADN blanco original y los fragmentos sintetizados sirven como templados. Cada ciclo de la PCR duplica la cantidad de ADN específico, resultando después de 30 ciclos una cantidad

considerable de amplificadas de la secuencia blanco (10^8 del producto original). Cada paso se lleva acabo a diferentes temperaturas: generalmente la desnaturalización es a 94°C , la extensión a 72°C y la temperatura de alineamiento depende del largo y contenido de los oligonucleótidos utilizados en la PCR. Una vez que se obtiene el producto de la PCR, el resultado puede ser detectado por varios métodos. El método más común es analizando el producto con una electroforesis en un gel de agarosa.

A pesar de que este método es muy utilizado en la actualidad, no existe un protocolo único para todos los casos, por lo que cada prueba de la PCR requiere de condiciones específicas de experimentación. El método de la PCR es tan sensible que puede ser amplificada una sola molécula de ADN, permitiendo así reconocer las copias de genes a partir de mezclas complejas de secuencias.

Los avances en la ingeniería genética permiten realizar exploraciones en los genes, algo que anteriormente era prácticamente imposible y que recientemente sirve para distinguir variaciones genéticas entre especies y cepas de algunos organismos (Rollison, *et al.* 1986).

Las pruebas de la PCR basadas en ADN han revolucionado cada área en específico y su aplicación ha enriquecido los datos moleculares disponibles, como la base de datos “Genebank” entre otras, siendo ésta la más consultada.

OBJETIVOS

General.

- Verificar por secuenciación del gen 18s rADN la identidad de metacercarias identificadas morfológicamente como *P. minimum*.

Particulares.

- Estandarizar un método para la extracción de ADN a partir de una sola metacercaria así como la técnica de la PCR para la amplificación de la subunidad ribosomal 18S.
- Utilizar este método para identificar metacercarias colectadas de Pátzcuaro, Chapala y Chiapas, comparando con las secuencias registradas en la base de datos “GeneBank”.

MATERIAL Y MÉTODO

Recolección y procesamiento de hospederos

Se recolectaron 21 peces *Allophorus robustus* (Goodeidae) del Lago de Pátzcuaro, Michoacán (19° 32' y 19° 42' N, 101° 32' y 101° 43' W) del 12 al 14 de marzo de 2004, con la ayuda de pescadores de la región, quienes capturaron la muestra por encargo utilizando redes agalleras.

En el lago de Chapala (20° 07' y 20° 21' N, 102° 40' 45'' y 103° 25' 30'' O) se recolectaron 50 peces *Chapalichtys encaustus* (Goodeidae) del 18 al 19 de marzo de 2003, con la ayuda de pescadores de la región. En Villa Flores, Chiapas (16° 21'05'' N y 93° 30'57'') se capturaron 15 *Poecilia mexicana* (Poeciliidae) del 6 al 8 de febrero de 2004 con equipo de electropesca.

Los peces capturados se colocaron en refrigeración hasta su análisis helmintológico, el cual se llevó acabo dentro de las 20 hrs posteriores a su captura.

Para cada hospedero de cada localidad se tomaron datos merísticos: longitud total, longitud patrón, altura máxima (en milímetros), peso (en gramos) y sexo.

Obtención de las metacercarias

En el Lago de Pátzcuaro los hospederos de *A. robustus* se disecaron mediante un corte longitudinal desde el ano hasta la base de la boca. Se removieron los aparatos digestivo y genital para revisar por separado los órganos colocándolos en cajas de Petri con

solución salina al 0.75%. El hígado se comprimió entre dos cristales con amortiguador PBS (1X) para facilitar la observación y conteo de metacercarias de *P. minimum*, verificando que todas y cada una de ellas se encontraran vivas.

Todos los parásitos recolectados se obtuvieron del hígado, que es el órgano con mayor infección por metacercarias de *P. minimum*. Las metacercarias se contaron y separaron en tres cajas de Petri con solución fisiológica PBS 1X. Cada caja de Petri se identificó como lote A (Pátz), lote B (Pátz) y lote C (Pátz). El número de metacercarias en cada lote no fue el mismo, siendo el Lote A el de mayor cantidad.

En el Lago de Chapala los hospederos *C. encaustus* se examinaron con la finalidad de extraer el hígado completo, éste se colocó en una caja de Petri con solución salina al 0.75% y se comprimió entre dos cristales con solución amortiguadora PBS (1X) para facilitar la observación y conteo de las metacercarias.

Todas las metacercarias recolectadas del hígado, se contaron y separaron proporcionalmente en dos cajas de Petri con PBS 1X. Cada caja de Petri se identificó como: lote B (Chap) y lote C (Chap).

En Villa Flores, Chiapas, a los hospederos *P. mexicana* se les realizó un examen externo e interno para la búsqueda de metacercarias de *P. minimum* ya que no se cuenta con reportes previos de los sitios de infección por éstas metacercarias. El examen externo incluyó la superficie corporal, la cabeza, ojos, escamas, la base de las aletas (caudal, dorsales, anal, pectoral y pélvicas) y los orificios del cuerpo (boca, ano y nostrilos). El examen interno incluyó la disección del pez haciendo un corte longitudinal desde el ano a la altura de las aletas pectorales, prolongando el corte hasta la boca; el aparato digestivo y genital fueron removidos, separándolos en cajas de Petri con solución salina al 0.75%. El

hígado, bazo y corazón se seccionaron y cada parte fue comprimida entre dos vidrios para facilitar la búsqueda.

Las metacercarias se encontraron únicamente dentro de los ojos de los hospederos, éstos organos se mantuvieron en solución salina al 0.75%, posteriormente se rompieron con la ayuda de agujas de disección para extraer las metacercarias, las cuales se contaron y separaron en dos cajas de Petri. Cada caja se identificó como: lote B (Chiap) y lote C (Chiap).

Tratamientos de las metacercarias.

Las metacercarias obtenidas del los hígados de *A. robustus* en el Lago de Pátzcuaro tuvieron 3 destinos de acuerdo al lote en donde se clasificaron: Lote A) infección experimental de pollos para la obtención de adultos, Lote B) fijación para su estudio taxonómico y Lote C) fijación para estudio de biología molecular. Las metacercarias obtenidas del hígado de *C. encaustus* y de los ojos de *P. mexicana* se fijaron para su estudio taxonómico (Lote A) y para biología molecular las del lote B.

a) Infección experimental de pollos domésticos con metacercarias para la obtención de adultos

Para este fin se utilizaron solamente las metacercarias de *A. robustus* del Lote "A". Se empleó como hospederos definitivos a pollos domésticos de 96 a 144 h de nacidos.

Cada hospedero se mantuvo en ayuno al menos 6 horas antes de la infección. Los pollos se infectaron con pipetas Pasteur forzándolos a ingerir un número variado de metacercarias procedentes de un solo pez. Se infectaron en total 21 pollos con 36 a 351 metacercarias por hospedero (Tabla 2). Las metacercarias solo se contaron, no se manipularon más allá de esto y se conservaron en cajas de Petri con PBS 1X, aún con los tejidos de hígado de sus hospederos.

Los pollos infectados se mantuvieron en el laboratorio en condiciones apropiadas de temperatura y se les alimentó únicamente con galletas y agua.

Al cabo de 72- 196 h post infección, fueron pesados, sacrificados y disecados. El intestino de cada pollo se colocó en una caja de Petri con solución PBS 1X para su revisión bajo microscopio estereoscópico.

Los adultos recuperados se dividieron en dos lotes (D y E), uno para su estudio morfológico y el segundo para su estudio molecular. Como en el caso de las metacercarias (ver siguiente sección, abajo) los adultos del lote D se fijaron directamente con formol al 4% caliente y por aplanamiento ligero. Posteriormente (48 h), se lavaron en agua y se conservaron en viales con alcohol etílico al 70% para su tinción. Los especímenes del lote E se fijaron con alcohol etílico al 100%.

b) Fijación de metacercarias para su estudio morfológico

Las metacercarias del lote "B" de Pátzcuaro se contaron y desenquistaron subdividiéndolas a su vez en dos o tres sublotes (B₁, B₂ y B₃). Las metacercarias del sublote B₁ se fijaron con formol al 4% caliente, las de la subporción B₂ por aplanamiento ligero con

formol al 4%, y en algunos casos por aplanamiento ligero con líquido de Bouin (B₃). Cuarenta y ocho horas posteriores a la fijación en formol, las metacercarias se lavaron en agua destilada (varios cambios) y en agua de la llave (varios cambios) durante 6-8 h. Posteriormente, se conservaron en frascos viales con alcohol etílico 70% hasta su procesamiento y tinción con paracarmin de Mayer. Las metacercarias fijadas con Bouin se lavaron directamente en alcohol etílico al 70% (varios cambios) hasta desprender el color amarillo adquirido por el fijador y se conservaron en viales con alcohol etílico al 70%.

Al igual que éstas, las metacercarias del lote “B” de Chapala y Chiapas se contaron y desenquistaron para fijarlas únicamente en formol al 4% caliente. Cuarenta y ocho horas posteriores a la fijación, las metacercarias se lavaron en agua destilada (varios cambios) y en agua de la llave (varios cambios) durante 6 a 8 h. Posteriormente, se conservaron en frascos viales con alcohol etílico 70% para teñirlas con paracarmin de Mayer.

C) Fijación de metacercarias para estudios de biología molecular

Las metacercarias del Lote “C” de las tres localidades; Pátzcuaro, Chiapas y Chapala, se separaron, contaron y desenquistaron colocándolas en alcohol absoluto para su uso posterior en los análisis de biología molecular.

Procesamiento de metacercarias y adultos para su estudio morfológico

Para el estudio morfológico y determinación taxonómica, se procesaron aquellas metacercarias y adultos que se fijaron con formol al 4% caliente y por aplanamiento ligero con formol al 4%. Los especímenes se lavaron con agua destilada y agua de la llave, y se conservaron en alcohol etílico al 70% hasta su tinción.

Todos los organismos se tificaron con Paracarmín de Meyer, se aclararon en salicilato de metilo y se montaron en bálsamo de Canadá (Técnica completa en Apéndice I) para hacer preparaciones totales permanentes sobre las cuáles se llevó acabo la determinación taxonómica. Los ejemplares se midieron con ayuda del microscopio óptico y un ocular micrométrico.

Purificación de ADN a partir de metacercarias y adultos.

La extracción de ADN se realizó a partir de una sola metacercarias obtenida del hígado u ojos de los tres hospederos de las distintas localidades.

Cada organismo por separado se colocó con la ayuda de un pincel fino en un tubo de 1.5 ml y se lavó 2 veces con agua destilada durante 2 min por cada lavado. Una vez lavado, se eliminó el exceso de agua y se extrajo el ADN genómico mediante 5 técnicas: I) Kit para extracción de ADN de tejidos¹, II) Kit para extracción de ADN genómico², III) Kit para

¹ QIAGEN, USA

² QIAGEN, USA

extracción de ADN de sangre³, IV) Reactivo DNAzol⁴ y V) Protocolo para extracción de ADN genómico para bacterias con bromuro de cetiltrimetil amonio, CTAB (Ausubel *et al*, 1994-1996). Ya que el método de CTAB modificado para metacercarias y adultos fue el más eficiente para la purificación de ADN, se utilizó en todos organismos analizados en esta tesis. Este método de purificación consta de los siguientes pasos:

Se resuspendió la metacercaria en 567µl de buffer TE (Tris-HCl 10mM – EDTA 1 mM, amortiguador de pH 7.6 junto con 30 µl de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% y 3 µl de proteinasa K (20mg/ml) y se colocó en baño Maria durante 3 h a 37°C. Posteriormente, se agregaron 100 µl de Cloruro de Sodio (NaCl) 5 M y 80 µl de solución CTAB/NaCl, se mezcló y se incubó a 65°C durante 10 min. A continuación se realizó una extracción agregando 500 µl de cloroformo/alcohol isoamílico en proporción 24:1, se mezcló y centrifugó durante 5 min a 14,000 rpm. Después se tomó la fase acuosa y se le realizó una extracción fenólica añadiendo 800 µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico en proporción 25:24:1 respectivamente, se mezcló y centrifugó por 5 min a 14,000 rpm; se extrajo el sobrenadante y se colocó en un tubo de 1.5 ml nuevo. Los ácidos nucleicos presentes en el sobrenadante se precipitaron agregando 420 µl de isopropanol, mezclando y centrifugando por 5 min a 14,000 rpm. Se eliminó el sobrenadante obteniendo una pequeña pastilla a la que se le efectuó un lavado con 300 µl de etanol frío al 70% y centrifugando por 5 min a 14,000 rpm. Se retiró el etanol al 70% con la ayuda de una pipeta sin tocar la pastilla de ADN, la cual se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez seca, la pastilla se resuspendió en 30 µl de buffer TE y se guardó a -21°C hasta su procesamiento.

³ QIAGEN, USA

⁴ INVITROGEN, USA

Para la extracción de ADN en adultos obtenidos experimentalmente, se utilizó el Kit de amplificación de ADN total “Genomphi⁵” (técnica completa en Apéndice 2).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR (Palumbi, 1996) se llevó a cabo utilizando “primers” ó iniciadores derivados de las secuencias reportadas para el gen de la subunidad ribosomal 18S de algunas especies de la familia Diplostomidae, y en particular de regiones altamente conservadas: MERF1 (forward) 5'-CTTAATTCGACTCAACACGG-3' y MERF2 (Reverse) 5'-GGGCACTTGCTCCTTAAG-3'.

La amplificación se realizó en un volumen final de 50 µl, utilizando la siguiente mezcla de reacción:

DNA molde	30 µl (Volumen en que se resuspendió el ADN de un organismo)
Buffer 10X ⁶	5 µl
MgCl ₂ ¹	2.5 µl
Primer MERF1 (100nm/ml)	0.5 µl
Primer MERF2 (100nm/ml)	0.5 µl
DNTP's 10X (10mM)	5 µl
Taq polimerasa ¹	0.5 µl
Agua	6 µl

⁵ Genomphi, Amersham. USA.

⁶ BIOTECNOLOGIAS UNIVERSITARIAS S.A. de C.V. UNAM. México, D.F.

Las temperaturas y tiempos programados en el termociclador⁷ para la prueba de la PCR en tubos de 0.2 ml fueron los siguientes (Anexo 1):

- ◆ Ciclo inicial de 94°C por 5 min
- ◆ 35 ciclos:

Desnaturalización: 94°C durante 30 seg.

Alineación: 50°C durante 30 seg.

Extensión: 72°C durante 30 seg.

- ◆ Finalizando con un ciclo de 8 minutos a 72°C.
- ◆ Conservación del producto a 4°C por tiempo indefinido (∞)

Los productos de la PCR, se corrieron en geles de agarosa TAE (Tris/acetato/EDTA) preparados con 12 μ l de bromuro de etidio por cada 100 ml de solución. Se mezclaron 30 μ l de producto de la PCR de cada muestra con 2 μ l de amortiguador de carga y se depositaron en los carriles del gel para su separación junto con el marcador de peso molecular λ Hind III. El resultado se observó en un transiluminador de luz UV registrando el resultado en una fotografía por medio de un digitalizador de imágenes.

Las bandas correspondientes a los productos amplificados se cortaron del gel con la ayuda de una navaja de disección. Los fragmentos del gel se pesaron y los productos de la

⁷ Eppendorff. Modelo del PCR.

PCR se purificaron mediante un Kit de Purificación de ADN a partir de geles⁸ (técnica completa en Apéndice 3).

Secuenciación

Los productos de la PCR se secuenciaron en un secuenciador automático (ABI PRISM 310) utilizando el método de terminación de cadena por deoxinucleótidos (Sanger, 1977).

⁸ Marligen de Bioscience Inc.

RESULTADOS

Morfología de metacercarias y adultos.

Descripción de metacercarias obtenidas del hígado de *A. robustus* (Figura 1a y 1b).

Los 21 *A. robustus* examinados del Lago de Pátzcuaro resultaron positivos a la infección con metacercarias morfológicamente identificadas como *P. minimum* (prevalencia 100%). Se recolectaron de 36 a 351 metacercarias por pez (intensidad promedio 140 ± 83) (Tabla 3).

La descripción de las metacercarias está basada en 10 ejemplares recolectados enquistados en el hígado de *A. robustus*, en el lago de Pátzcuaro, Michoacán.

La longitud total del cuerpo es de 0.59-0.89 (0.80). El cuerpo se encuentra dividido en dos segmentos bien definidos. El segmento anterior mide 0.16-0.65 (0.55) de largo y 0.04-0.20 (0.17) de ancho, es cóncavo y más grande que el segmento posterior que es de forma ovoide y mide 0.15-0.55 (0.24) de largo por 0.04-0.20 (0.17) de ancho. La ventosa oral es alargada, se encuentra dentro de un pliegue de la región anterior que forma un surco. En algunos ejemplares la ventosa oral es terminal en el extremo anterior del cuerpo. Mide 0.029-0.049 (0.039) de largo por 0.024-0.036 (0.027) de ancho. La relación de las ventosas es en promedio de 1:1.25 de largo y 1:1.64 de ancho.

El acetábulo se localiza por encima del órgano tribocítico, hacia la base del segundo tercio de la región anterior del cuerpo, mide 0.040-0.055 (0.048) de largo y 0.036-0.050 (0.043) de ancho, es esférico. El órgano tribocítico es ovoidal, voluminoso y glandular. Está

situado en la base del segmento anterior del cuerpo, en la parte media ventral y es casi dos veces más grande que el acetábulo y mide 0.072-0.091 (0.080) de largo, 0.057-0.086 (0.074) de ancho

La boca dentro de la ventosa oral se continúa con la faringe, la cual tiene forma oval, alargada y pequeña, que mide 0.016-0.033 (0.024) de largo y 0.012-0.028 (0.018) de ancho. En dos de los 10 ejemplares observados se presenta una prefaringe. La faringe se abre al esófago que es corto de 0.022-0.068 (0.045), y se bifurca por encima del acetábulo dando lugar a un par de ciegos intestinales delgados que alcanzan el extremo posterior del cuerpo por encima de la bolsa copulatríz.

En el segundo segmento se encuentran los esbozos de los órganos reproductores, observándose en algunos ejemplares bien formados. Los testículos están dispuestos uno detrás del otro ocupando la mayor parte del segmento posterior. El testículo anterior tiene forma más o menos esférica, mide 0.031-0.065 (0.054) de largo y 0.052-0.10 (0.078) de ancho. El testículo posterior presenta forma de "V", mide 0.026-0.089 (0.055) de largo y 0.072-0.16 (0.105) de ancho. El ovario es pequeño, ovoidal y se localiza entre los testículos, diestral o sinistral al testículo anterior, mide 0.027-0.06 (0.043) de largo por 0.026-0.067 (0.043) de ancho. La bolsa copulatríz es ovoidal y se encuentra invaginada en la región terminal del segmento posterior con 0.053-0.089 de largo y 0.050-0.082 de ancho.

Descripción de los adultos obtenidos de la infección experimental de pollos con metacercarias del hígado de *A. robustus*

De los 21 pollos sometidos a infección experimental 15 resultaron positivos. Se recuperaron de 1 a 78 adultos en cada pollo con un total de 308 adultos de *P. minimum* (Tabla 3). Los primeros adultos con huevos se recuperaron a las 50 horas post infección.

Se observó una relación positiva entre el número de metacercarias administradas a cada pollo y el número de adultos obtenidos ($r= 0.7146$, $p= 0.0002$) (Tabla 2).

El estudio morfológico de los adultos obtenidos experimentalmente, muestra 2 morfotipos distinguibles por las dimensiones de la bolsa copulatríz (Figuras 2 y 3). Estas diferencias en el largo y ancho de la bolsa copulatríz al ser comparadas mediante una prueba de t resultaron significativas ($p=0.02317$ largo; $p=0.0090$ ancho).

Morfotipo 1

La descripción está basada en 10 ejemplares recolectados de las infecciones experimentales con metacercarias en pollos domésticos (Figura 2).

El cuerpo del adulto es cóncavo, mide de 0.75 a 1.09 (0.88). Está dividido en dos segmentos bien definidos. El segmento anterior es largo y delgado, cóncavo u ovalado, los bordes laterales y posteriores presentan ondulaciones, este segmento mide 0.052-0.073 (0.60) de largo y 0.19-0.31 (0.24) de ancho. El segmento posterior es ovoide, algunas veces cilíndrico al nivel en donde alcanza su longitud máxima; este segmento se origina de la superficie dorsal de la región anterior y se separa de ésta por una constricción transversal;

mide 0.21-0.36 (0.27) de largo por 0.19-0.32 (0.24) de ancho. La ventosa oral es pequeña, está situada terminalmente en el extremo anterior del cuerpo y mide 0.027-0.058 (0.041) de largo y 0.024-0.040 (0.033) de ancho. El acetábulo mide 0.043-0.06 (0.049) de largo por 0.045-0.06 (0.055) de ancho, está situado en el último tercio del segmento anterior por encima del órgano tribocítico, es pequeño con una abertura en el centro. La relación de las ventosas es en promedio de 1:1.14 de largo y 1:1.92 de ancho. La faringe es musculosa de forma elipsoidal poco más pequeña que la ventosa oral, mide 0.022-0.033 (0.029) de largo y 0.017-0.029 (0.023) de ancho. El esófago es corto, su longitud es de 0.048-0.096 (0.065); la bifurcación cecal queda muy por encima del acetábulo, más próxima al extremo anterior y da lugar a los ciegos intestinales delgados que corren casi centralmente a lo largo del cuerpo, paralelos al eje principal de éste, y llegan hasta muy próximos al borde del extremo de la región posterior del cuerpo. El órgano tribocítico es elíptico a esférico, se encuentra en la base del segmento anterior del cuerpo por debajo del acetábulo y es casi 2 veces más grande que éste, mide 0.082-0.15 (0.106) de largo por 0.077-0.17 (0.108) de ancho.

El aparato reproductor masculino está constituido por un par de testículos situados en el segmento posterior del cuerpo, ocupando gran parte de éste. El testículo anterior es ensanchado transversalmente; casi rectangular, mide de largo 0.055-0.11 (0.079) y de ancho 0.10-0.28 (0.178). El testículo posterior, en la mayoría de los ejemplares presenta forma de "V", ensanchado transversalmente y en algunos casos bilobulado, mide 0.053-0.10 (0.078) de largo por 0.089-0.26 (0.175) de ancho.

El aparato reproductor femenino consta de un ovario situado lateralmente hacia la base del segmento posterior y por debajo y opuesto al testículo anterior. Es de forma elipsoidal a redondo y se presenta a la derecha o izquierda indistintamente.

La bolsa copulatríz está invaginada y situada en el extremo posterior del cuerpo, mide 0.053-0.10 (0.083) de largo y 0.094-0.115 (0.105) de ancho. Los huevos son alargados con una división vertical en el centro, miden 0.06-0.098 (0.080) de largo por 0.038-0.096 (0.058) de ancho.

Morfotipo 2

De estos ejemplares se midieron 10 ejemplares de la infección experimental de *G. gallus* con metacercarias del hígado de *A. robustus* (Figura 3).

La morfología general y las medidas son similares a las descritas en el morfotipo 1, la variación se presenta en la forma y tamaño (largo y ancho) de la bolsa copulatríz. En estos ejemplares se encuentra por fuera del segmento posterior dividida transversalmente en dos segmentos; mide 0.077-0.20 (0.119) de largo por 0.072-0.216 (0.154) de ancho. La vesícula seminal se encuentra por debajo del testículo posterior y el receptáculo seminal por encima del ovario.

Metacercarias de *C. encaustus* del Lago de Chapala.

De los 50 *C. encaustus* examinados 44 resultaron positivos a la infección con metacercarias de *P. minimum* (prevalencia 88%). Se recolectaron de 1 a 776 metacercarias por pez.

La descripción de las metacercarias encontradas en el hígado de *C. encaustus* (Figura 4) es similar a la de las metacercarias encontradas en *A. robustus*. Las medidas basadas en 10 ejemplares se reportan en la Tabla 4.

Metacercarias de *P. mexicana* de Villa Flores, Chiapas (Figura 5).

De los 15 *P. mexicana* examinados, 11 resultaron positivos a la infección con metacercarias de *P. minimum* (prevalencia 73.3%) en los ojos de estos peces. Se recolectaron de 1 a 30 metacercarias por pez (intensidad promedio 14.6 ± 10.61).

Las metacercarias encontradas en los ojos de *P. mexicana* recolectados en Villa Flores, Chiapas, son similares a las de las dos localidades anteriores, sin embargo, la diferencia es la ausencia de faringe y esófago en todas las metacercarias examinadas. Las medidas están basadas en 10 ejemplares y se reportan en la Tabla 4.

Estandarización de la metodología de purificación de ADN de una sola metacercaria y de la técnica de la PCR para la amplificación de la subunidad ribosomal 18S.

De los métodos de purificación de ADN empleados, el que utiliza CTAB modificado para tremátodos y el Kit "Genomiphi" de amplificación de ADN total, fueron los únicos que funcionaron para la obtención de ADN de una sola metacercaria y en consecuencia para la

amplificación de parte de la subunidad ribosomal 18S. Sin embargo, el método de CTAB fue poco reproducible ya que solo 1 de cada 2 extracciones fueron exitosas.

La concentración de ADN obtenida de metacercarias de Pátzcuaro se midió con la ayuda de un espectrofotómetro⁹ de capilares, lo que permitió una comparación de la cantidad de ADN obtenida por los dos métodos.

Con el método de CTAB para bacterias modificado para tremátodos se utilizaron 10 metacercarias y la cantidad de ADN obtenido fue de 37 ng/ μ l , lo que equivale a 3.7 ng/ μ l de 1 metacercaria; con el Kit Genomiphi a partir de 1 metacercaria se obtuvo una cantidad de 23 ng/ μ l. Estos resultados indican que el método de “Genomiphi”, en el que todo el ADN es amplificado previo al PCR, es mas eficiente para la obtención de ADN a partir de cantidades limitadas de muestra (Figura 6).

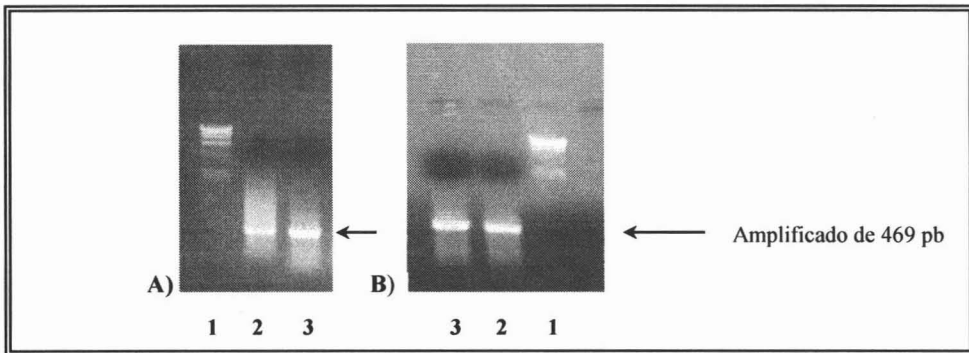


Figura 6. Corrimiento en gel de agarosa de los amplificados de 469 pb de la subunidad ribosomal 18S a partir del ADN obtenido por los 2 diferentes métodos: A) CTAB y B) Genomiphi. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular; 2 y 3 son duplicados de los amplificados.

⁹ Modelo del espectro

Durante la estandarización de la técnica de la PCR para amplificación de parte del gen 18S rADN se evaluaron 2 variables: temperatura de alineamiento y concentración de cloruro de magnesio ($MgCl_2$). Las temperaturas de alineamiento se evaluaron en intervalos de $5^\circ C$, desde $45^\circ C$ hasta $60^\circ C$ con ADN de 5 metacercarias extraído con CTAB. La temperatura óptima para la amplificación del 18S rADN fue de $50^\circ C$, por lo que el programa de la PCR utilizado en todos los casos incluyó esta temperatura de alineamiento, como se describió anteriormente en la metodología (Figura 7).

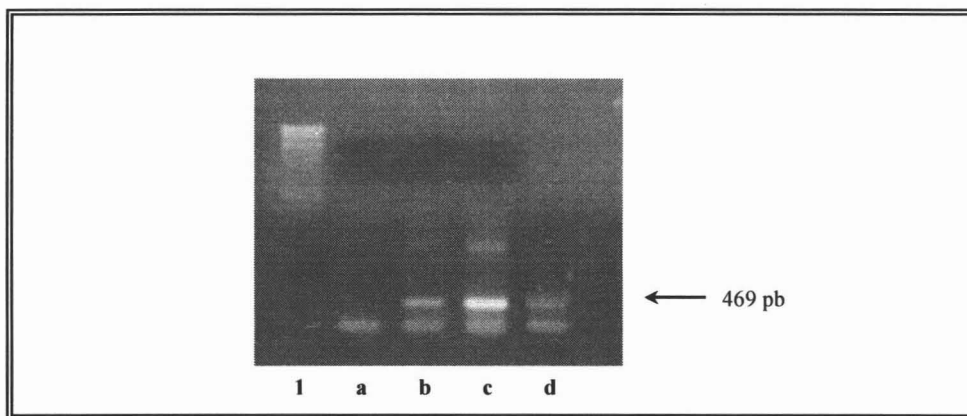


Figura 7. Corrimiento en gel de agarosa al 1% de los resultados de la PCRs con ADN de 5 metacercarias a diferentes temperaturas de alineamiento: a) $60^\circ C$, b) $55^\circ C$, c) $50^\circ C$ y d) $45^\circ C$. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular.

Las pruebas de $MgCl_2$ se realizaron con 2 concentraciones: 1.5 mM y 2.25 mM, todas con una temperatura de alineamiento de $50^\circ C$. La concentración óptima de $MgCl_2$ para lograr mas producto de la PCR fue de 1.5mM en cada reacción (Figura 8), por lo que en todas las pruebas de la PCR se utilizó ésta concentración.

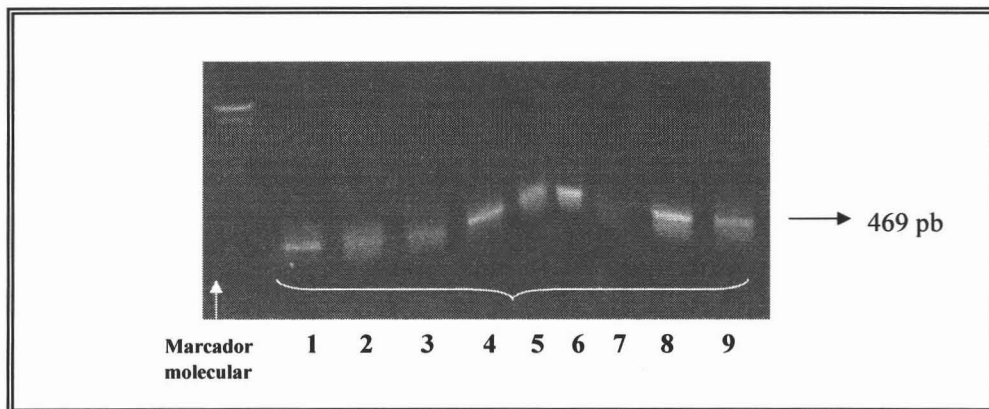


Figura 8. Corrimiento en gel de agarosa al 1% de los resultados de la PCRs con ADN diferentes concentraciones de MgCl₂. Carriles 1,4,6 y 8 con 1.5mM de MgCl₂, carriles 2,3,5,7 y 9 con 2.25mM de MgCl₂.

Análisis de las secuencias

Secuencia parcial de la subunidad ribosomal 18S

Con la finalidad de determinar con bases moleculares si las metacercarias de *A. robustus* pertenecen a la especie *P. minimum*, se procedió a secuenciar una parte del 18S rADN de una sola metacercaria.

La secuencia obtenida del amplificado de 469 pb (Fig 9, metacer 1) se comparó mediante un BLAST con la base de datos del “GeneBank” obteniendo los resultados mostrados en la Tabla 8.

Secuencia reportada	Secuencia de 1 metacercaria		
	% de similitud	identidades	Bits / e
<i>Posthodiplostomum minimum</i>	99.78%	457/458	900 / 0.0
<i>Apharyngostrigea cornu</i>	98.68%	452/458	860 / 0.0
<i>Bolbophorus damnificus</i>	98.25%	450/458	844 / 0.0
<i>Bolbophorus confusus</i>	98.03%	449/458	837 / 0.0
<i>Diplostomum phoxini</i>	98.03%	450/459	831 / 0.0

Tabla 8. Similitud de la secuencia de una metacercaria del hígado de *A. robustus* con las descritas en la base de datos "GeneBank". (e) se refiere al error.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observa que la secuencia reportada en la base de datos "GenBank" con mayor similitud a la secuencia obtenida de una metacercaria es la de la especie *P. minimum* (99.78%), variando solamente en una base de las 458 comparadas del 18S rADN. Las otras cuatro secuencias mostraron entre 98.68- 98.03% de similitud con la obtenida, con un número de identidades que oscila entre 450- 452 de 458 pares de bases, lo que indica que son secuencias muy semejantes, sin embargo no idénticas.

Comparación de las secuencias de 2 metacercarias de *A. robustus* y 2 adultos obtenidos experimentalmente.

Para corroborar la identidad específica de las metacercarias obtenidas de *A. robustus* como *P. minimum*, se compararon las secuencias parciales de una región del gen 18S de 2 metacercarias obtenidas de 2 hospederos diferentes, con 2 adultos de los 2 morfotipos (con bolsa y sin bolsa) obtenidos experimentalmente mediante la infección de pollos domésticos con metacercarias de *A. robustus* (Figura 9).

Para confirmar si los 2 morfotipos (con bolsa y sin bolsa) de los adultos obtenidos experimentalmente pertenecieran a la misma especie se realizó una comparación de la subunidad ribosomal 18S rADN registrando que el porcentaje de similitud entre los morfotipos es del 99.75% con una sola sustitución de una T por una G en la posición 288 (Figura 9).

```

Adultc/bolsa -----GATAGCTCTT 10
Adultos/bolsa -----AAAACTCACCCGGCCCGGACACTGTGAGGATTGACAGATTGATAGCTCTT 50
Metac1 --AACACGGGAAAACCTCACCCGGCCCGGACACTGTGAGGATTGACAGATTGATAGCTCTT 58
Metac2 TCAACACGGGAAAACCTCACCCGGCCCGGACACTGTGAGGATTGACAGATTGATAGCTCTT 60

Adultc/bolsa TCTTGATTCGGTGGTTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCCATTTGTCTGGT 70
Adultos/bolsa TCTTGATTCGGTGGTTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCCATTTGTCTGGT 110
Metac1 TCTTGATTCGGTGGTTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCCATTTGTCTGGT 118
Metac2 TCTTGATTCGGTGGTTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCCATTTGTCTGGT 120

Adultc/bolsa TAATTCGGATAACGAACGAGACTTTGACCTAGCTAATTAGTTTGCCTATCTTCTGTGCTC 130
Adultos/bolsa TAATTCGGATAACGAACGAGACTTTGACCTAGCTAATTAGTTTGCCTATCTTCTGTGCTC 170
Metac1 TAATTCGGATAACGAACGAGACTTTGACCTA-CTAATTAGTTTGCCTATCTTCTGTGCTC 177
Metac2 TAATTCGGATAACGAACGAGACTTTGACCTA-CTAATTAGTTTGCCTATCTTCTGTGCTC 179

Adultc/bolsa GTGCAAGGCTCGGTTTTCAGTTGCCTCCTTGAGGGGTGGTGGAGCCGTTGACCCGGCGGTA 190
Adultos/bolsa GTGCAAGGCTCGGTTTTCAGTTGCCTCCTTGAGGGGTGGTGGAGCCGTTGACCCGGCGGTA 230
Metac1 GTGCAAGGCTCGGTTTTCAGTTGCCTCCTTGAGGGGTGGTGGAGCCGTTGACCCGGCGGTA 237
Metac2 GTGCAAGGCTCGGTTTTCAGTTGCCTCCTTGAGGGGTGGTGGAGCCGTTGACCCGGCGGTA 239

Adultc/bolsa CGGCGTGGTGCTTACTTCTTAGAGGGACAAGCGGCATAGCAAGTCGCACGAAATTGAGCA 250
Adultos/bolsa CGGCGTGGTGCTTACTTCTTAGAGGGACAAGCGGCATAGCAAGTCGCACGAAATTGAGCA 290
Metac1 CGGCGTGGTGCTTACTTCTTAGAGGGACAAGCGGCATAGCAAGTCGCACGAAATTGAGCA 297
030411F CGGCGTGGTGCTTACTTCTTAGAGGGACAAGCGGCATAGCAAGTCGCACGAAATTGAGCA 299

Adultc/bolsa ATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCGGGGCCGCACGTGCGCTACAATGACGGTGC 310
Adultos/bolsa ATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCGGGGCCGCACGTGCGCTACAATGACGGTGC 350
Metac1 ATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCGGGGCCGCACGTGCGCTACAATGACGGTGC 357
Metac2 ATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCGGGGCCGCACGTGCGCTACAATGACGGTGC 359

Adultc/bolsa CAGCGAGCATGGAAACCTGGCCCGAAAGGGTTGGGCAAACCTTTTCATCACCCTCGTGAAC 370
Adultos/bolsa CAGCGAGCATGGAAACCTGGCCCGAAAGGGTTGGGCAAACCTTTTCATCACCCTCGTGA-C 409
Metac1 CAGCGAGCATGGAAACCTGGCCCGAAAGGGTTGGGCAAACCTTTTCATCACCCTCGTGA-C 416
Metac2 CAGCGAGCATGGAAACCTGGCCCGAAAGGGTTGGGCAAACCTTTTCATCACCCTCGTGA-C 418

Adultc/bolsa TGGGATCGGGGCTTGCAATTGTTCCCCGTGAACGA-GGAA----- 409
Adultos/bolsa TGGGATCGGGGCTTGCAATTGTTCCCCGTGAACGA-GGAATTC-- 451
Metac1 TGGGATCGGGGCTTGCAATTGTTCCCCGTGAACGA-GGAATTC- 459
Metac2 TGGGATCGGGGCTTGCAATTGTTCCCCGTGAACGAAGGAATTC- 463

```

Figura 9. En rojo se muestran las secuencias parciales del 18S rADN de un adulto con bolsa y un adulto sin bolsa. En azul las de dos metacercarias de diferentes hospederos. Con * se denota la posición en donde son diferentes las 4 secuencias y en negro se muestran la base que hace la diferencia.

El porcentaje de identidad entre las secuencias fue de 99.5% lo que indica que las metacercarias y los adultos aquí estudiados derivados de *A. robustus* son la misma especie, y en particular las determinamos como *P. minimum*.

Comparación de secuencias de las metacercarias de *C. encaustus* del Lago de Chapala

Con la finalidad de determinar si las metacercarias de *C. encaustus* de Chapala también pertenecen a la especie *P. minimum*, se alinearon las secuencias de 2 metacercarias de individuos diferentes, así como de una mezcla de 10 metacercarias de otros 4 individuos con la secuencia reportada en la base de datos “Genebank” para dicha especie (Figura 10).

Chapalala	-----GATTGATAGCTCTTTCTTGATTTCGGTGGTGGTGGTGCATCGGCCGTTCT	50
Chapalalb	-----GACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTTCGGTGGTGGTGGTGCATCGGCCGTTCT	54
Chapalal0	-----CAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTTCGGTGGTGGTGGTGCATCGGCCGTTCT	52
REPORTADA	AGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTTCGGTGGTGGTGGTGCAT-GGCCGTTCT	1379
Chapalala	TAGTTGGTGGAGCGATTGTCTGGTTAATTCCGATAACGAACGAGACTTTGACCTACTAA	110
Chapalalb	TAGTTGGTGGAGCGATTGTCTGGTTAATTTCGATAACGAACGAGACTTTGACCTACTAA	114
Chapalal0	TAGTTGGTGGAGCGATTGTCTGGTTAATTTCGATAACGAACGAGACTTTGACCTACTAA	112
REPORTADA	TAGTTGGTGGAGCGATTGTCTGGTTAATTCCGATAACGAACGAGACTTTGACCTACTAA	1439
	*	
Chapalala	TCAGTTATGCCTATCCTCTGTGCGTCGTGCAGGGCTCGGTTTCAGTTGCCTCCTTGAGGG	170
Chapalalb	TCAGTTATGCCTATCCTCTGTGCGTCGTGCAGGGCTCGGTTTCAGTTGCCTCCTTGAGGG	174
Chapalal0	TCAGTTATGCCTATCCTCTGTGCGTCGTGCAGGGCTCGGTTTCAGTTGCCTCCTTGAGGG	172
REPORTADA	TTAGTT-TGCCTATCCTCTGTGC-TCGTGCAGGGCTCGGTTTCAGTTGCCTCCTTGAGGG	1497
	*	
Chapalala	GTGGTGGAGCCGTTGACCGGCGAGTACGGCGTGGTGCTTACTTCTTAGAGGGACAAGCGG	230
Chapalalb	GTGGTGGAGCCGTTGACCGGCGAGTACGGCGTGGTGCTTACTTCTTAGAGGGACAAGCGG	234
Chapalal0	GTGGTGGAGCCGTTGACCGGCGAGTACGGCGTGGTGCTTACTTCTTAGAGGGACAAGCGG	232
REPORTADA	GTGGTGGAGCCGTTGACCGGCGAGTACGGCGTGGTGCTTACTTCTTAGAGGGACAAGCGG	1557
Chapalalb	CGCAGCAAGTCGCACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCGGGG	294
Chapalal0	CGCAGCAAGTCGCACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCGGGG	292
Chapalala	CGCAGCAAGTCGCACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCGGGG	290
REPORTADAT	CGCAGCAAGTCGCACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCGGGG	1617
Chapalala	CCGCACGTGCGCTACAATGACGGTGCCAGCGACGCATGGAAACCTGGCCCCGAAAGGGTTG	350
Chapalalb	CCGCACGTGCGCTACAATGACGGTGCCAGCGACGCATGGAAACCTGGCCCCGAAAGGGTTG	354
Chapalal0	CCGCACGTGCGCTACAATGACGGTGCCAGCGACGCATGGAAACCTGGCCCCGAAAGGGTTG	352
REPORTADA	CCGCACGTGCGCTACAATGACGGTGCCAGCGACGCATGGAAACCTGGCCCCGAAAGGGTTG	1676

Chapala1a	GGCAATACTTTTCATCACCGTCGTGACTGGGATCGGGGCTTGCAATTGTTCCCGTGAAC	410
Chapala1b	GGCAATACTTTTCATCACCGTCGTGACTGGGATCGGGGCTTGCAATTGTTCCCGTGAAC	414
Chapala10	GGCAATACTTTTCATCACCGTCGTGACTGGGATCGGGGCTTGCAATTGTTCCCGTGAAC	412
REPORTADA	GGCAA-ACTTTTTCATCACCGTCGTGACTGGGATCGGGGCTTGCAATTGTTCCCGTGAAC	1735
Chapala1a	GAGGAATTCCTAGTAAGTGCAAGTCATAAGCTTGCCTGATTACGTCC-----	458
Chapala1b	GAGGAATTCCTAGTAAGTGCAAGTCATAAGCTTGCCTGATTACGTCC-----	462
Chapala10	GAGGAATTCCTAGTAAGTGCAAGTCATAAGCTTGCCTGATTACGTCC-----	460
REPORTADA	GAGGAATTCCTAGTAAGTGCAAGTCATAAGCTTGCCTGATTACGTCCCTGCCCTTGTGTA	1795

Figura 10. Alineamiento de secuencias de metacercarias en *C. encaustus*. Las secuencias en rojo representan a las metacercarias de *C. encaustus* (Chapala 1a y 1b son de 1 metacercaria, Chapala 2 es de la mezcla de 10 metacercarias). Secuencia en azul se refiere a la secuencia reportada previamente para *P. minimum*. Con * se denota la posición en donde son diferentes las 4 secuencias y en negro se señala la base que hace la diferencia.

El porcentaje de identidad de las secuencias fue de 99.5%, lo que sugiere que todas las metacercarias de *C. encaustus* del lago de Chapala corresponden también a la especie *P. minimum*.

Comparación de las secuencias de metacercarias obtenidas de *P. mexicana* en Chiapas.

Con la finalidad de determinar si las metacercarias de *P. mexicana* de Villa Flores, Chiapas, también pertenecen a la especie *P. minimum*, se alinearon las secuencias de 1 metacercaria y de una mezcla de 3 metacercarias de 2 individuos con la secuencia reportada en la base de datos “Genebank” para dicha especie (Figura 11).

```

Chiapas1 -----TTCGGTGGTTGGTGGTGCATGGCCGTTCT 29
Chiapas2 -----TTCGGTGGTTGGTGGTGCATGGCCGTTCT 29
REPORTADA AGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTTCGGTGGTTGGTGGTGCATGGCCGTTCT 59

Chiapas1 TAGTTGGTGGAGCGATTGTCTGGTTAATTCGGATAACGAACGAGACTTTGACCTACTAA 89
Chiapas2 TAGTTGGTGGAGCGATTGTCTGGTTAATTCGGATAACGAACGAGACTTTGACCTACTAA 89
REPORTADA TAGTTGGTGGAGCGATTGTCTGGTTAATTCGGATAACGAACGAGACTTTGACCTACTAA 119

Chiapas1 TTAGTTTGCCTATCCTCTGTGCTCGTGCAGGGCTCGGTTTCAGTTGCCTCCTTGAGGG 147
Chiapas2 TTAGTTTGCCTATCCTCTGTGCTCGTGCAGGGCTCGGTTTCAGTTGCCTCCTTGAGGG 147
REPORTADA TTAGTTTGCCTATCCTCTGTGCTCGTGCAGGGCTCGGTTTCAGTTGCCTCCTTGAGGG 177

Chiapas1 GTGGTGGAGCCGCTGACCGGCGAGTACGGCGTGGTGCTTACTTCTTAGAGGGACAAGCGG 207
Chiapas2 GTGGTGGAGCCGCTGACCGGCGAGTACGGCGTGGTGCTTACTTCTTAGAGGGACAAGCGG 207
REPORTADA GTGGTGGAGCCGCTGACCGGCGAGTACGGCGTGGTGCTTACTTCTTAGAGGGACAAGCGG 237
*

Chiapas1 CGCAGCAAGTCGCACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCGGGG 267
Chiapas2 CGCAGCAAGTCGCACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCGGGG 267
REPORTADA CGCAGCAAGTCGCACGAAATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCGGGG 297

Chiapas1 CCGCACGTGCGCTACAATGACGGTGCCAGCGA-GCATGGAAACCTGGCCCGAAAGGGTTG 326
Chiapas2 CCGCACGTGCGCTACAATGACGGTGCCAGCGA-GCATGGAAACCTGGCCCGAAAGGGTTG 326
REPORTADA CCGCACGTGCGCTACAATGACGGTGCCAGCGACGCATGGAAACCTGGCCCGAAAGGGTTG 357
*

Chiapas1 GGCAAACTTTTTCATCACCCTCGTACTGGGATCGGGGCTTGCAATTGTTCCCCGTGAAC 385
Chiapas2 GGCAAACTTTTTCATCACCCTCGTACTGGGATCGGGGCTTGCAATTGTTCCCCGTGAAC 385
REPORTADA GGCAAACTTTTTCATCACCCTCGTACTGGGATCGGGGCTTGCAATTGTTCCCCGTGAAC 416

Chiapas1 GAGGAATTCAT----- 396
Chiapas2 GAGGAATTCAT----- 396
REPORTADA GAGGAATTCCTAGTAAGTGCAAGTCATAAGCTTGCCTGATTACGTCCTGCCTTTGTA 476
*

```

Figura 11. Alineamiento de secuencias de metacercarias en *P. mexicana*. Las secuencias en rojo representan a las metacercarias de *P. mexicana* (Chiapas1 es de una metacercaria y Chiapas 2 es la mezcla de 3 metacercarias). La secuencia en azul se refiere a la secuencia reportada previamente para *P. minimum*. Con * se denota la posición en donde son diferentes las 3 secuencias y en negro se señala la base que hace la diferencia

El porcentaje de identidad de las secuencias fue de 99.5% con un “gap” en la posición 299 en ambas secuencias de Chiapas, lo que sugiere que todas las metacercarias de *P. mexicana* de Villa Flores, Chiapas corresponden también con la especie *P. minimum*.

DISCUSIÓN

Los adultos recuperados de las infecciones experimentales se determinaron como *P. minimum* ya que coinciden con las descripciones morfológicas disponibles para la especie (ver Yamaguti 1971; Schell 1985). En general las medidas del cuerpo, las dimensiones y proporción relativa entre el segmento anterior y posterior, la proporción entre el largo y ancho de la ventosa oral, acetábulo, órgano tribocítico, la extensión anterior de las glándulas vitelógenas y el tamaño de huevos, coinciden con las reportadas para esta especie (Yamaguti, 1978, Schell, 1985, Dubois 1931, Lamothe-Argumedo y Pérez 1986).

Sin embargo se presentan dos morfotipos distinguibles por las dimensiones de la bolsa copulatríz en donde la del morfotipo 2 es más grande que la del morfotipo 1 (ANOVA $f= 8.008$, $p>0.05$) y también con las reportadas con anterioridad para dicha especie (Tabla 5), lo que indica que existe una variación entre individuos de esta especie en cuanto al tamaño de la bolsa copulatríz. Estas diferencias pueden deberse a que éste órgano presenta la característica de ser evaginable, con capacidad de expandirse una vez fuera del organismo. Con esto en mente se supone que la bolsa puede ser pequeña cuando se encuentra dentro del organismo y tener dimensiones mayores cuando se encuentra evaginada.

La comparación molecular de la subunidad ribosomal 18S rADN permitió despejar la duda sobre la presencia de una misma especie con 2 “morfotipos”, en realidad con o sin bolsa copulatríz evaginable.

Campbell. 1977 y Palmieri. 1977a, 1977b, 1977c sostiene que las variaciones intraespecíficas para *P. minimum* incluyen modificaciones en el tamaño y forma del cuerpo,

tamaño y proporción relativa de las ventosas, posición del ovario con respecto a los testículos y la estructura de la superficie del tegumento y son inducidas por el hospedero que parasita de forma natural o experimental.

Las metacercarias descritas morfológicamente de los hospederos *A. robustus*, *C. encaustus* y *P. mexicana* en este trabajo, se compararon con las reportadas en la literatura (Pineda-López 1985; Osorio-Sarabia *et al.* 1986a; Aguirre-Macedo y García-Magaña 1994; Ramos-Ramos 1994; Scholz *et al.* 1995, Ortega- Olivares 2004 para México y Hoffman 1999, para Estados Unidos), encontrando gran similitud con las reportadas para la especie *P. minimum* (Tabla 4). Sin embargo las metacercarias de *P. mexicana* de Villa Flores, Chiapas no presentan faringe ni esófago visible.

Esta similitud morfológica se corroboró mediante el estudio molecular en donde se analizó la subunidad ribosomal 18S rADN de cada grupo de metacercarias de acuerdo a la especie de hospedero donde se presentaron. Se encontró que tomando una sola metacercaria de un individuo o un grupo de metacercarias mezcladas de diferentes individuos de la misma especie de hospedero se obtienen los mismos resultados en ambas secuencias (Figura 10 y 11), lo que señala que todas las metacercarias de diferentes organismos de una sola especie de hospedero pertenecen a la misma especie. Esto hace más fácil el estudio de las metacercarias encontradas, ya que se pueden realizar mezclas de diferentes organismos de una misma especie de hospedero y corroborar si pertenecen a una sola especie y a cuál.

En los resultados de la Tabla 8 se observa que la secuencia obtenida con la subunidad 18s rADN para *P. minimum* de adultos obtenidos experimentalmente con metacercarias de *A. robustus* del Lago de Pátzcuaro tiene mayor similitud con especies de la Familia Strigeidae que con especies de la familia Diplostomidae a la que pertenece *P. minimum*, sin embargo no se puede asegurar que esta especie este mas emparentada con

otras familias ya que la unidad que se amplificó no revela características de este tipo por ser una región altamente conservada. Si se desea analizar el nivel de parentesco con otras familias se tendrían que amplificar regiones con mayor variación genética. Para las especies en general, las mayores variaciones se esperan en el espacio de transcripción interna (ITS-1 y -2) y en el Citocromo C. Sin embargo, estas variaciones en las secuencias de los ITS entre individuos puede dar información de poblaciones relacionadas muy estrechamente, complicando la interpretación de las comparaciones de las secuencias entre individuos.

En la Figura 9 y 10 se puede observar que existen algunas variaciones entre secuencias de organismos de la misma especie lo que indica que existen variaciones intraespecíficas muy pequeñas en esa región, lo cual es de esperarse ya que estas variaciones intraespecíficas se observan muy rara vez en las subunidades ribosomales (Rosenthal 2001). En el caso de las metacercarias de Chiapas (Figura 11) no se presentan variaciones en las secuencias entre organismos de la misma especie, lo cual puede ser interpretado como una evidencia de que la función del gene es crítica para el organismo y no es susceptible a variaciones. Esto es, los individuos que sufren cambios drásticos en esta región y heredan sus copias alteradas están en desventaja competitiva entre la población. En este trabajo se estudió una región altamente conservada (18S rADN) que no presenta variaciones significativas para la especie. Algunas variaciones en las secuencias se pueden presentar por la calidad de la enzima Taq Polimerasa, la cual puede cometer errores cuando amplifica en la PCR. Se calcula que se puede presentar 1 error por cada 450 ó 500 pares de bases.

Si bien la morfología de los adultos y de las metacercarias de *P. minimum* están bien reconocidas en la literatura los datos que aportamos en este trabajo permiten corroborar inequívocamente que las metacercarias en los peces corresponden molecularmente, con los adultos obtenidos experimentalmente de pollos domésticos. Nuestro trabajo aporta la

secuencia molecular tanto de éstas metacercarias como de los adultos obtenidos. Lo cual permitió posteriormente, realizar comparaciones moleculares de metacercarias (con material de otras localidades, Chapala y Chiapas y hospederos *C. encaustus* y *P. mexicana*) para su identificación la cual se logra con un amplio margen de confiabilidad, sin necesidad de completar el ciclo de vida del parásito.

El presente trabajo aporta una técnica de gran utilidad para la identificación específica de formas larvarias de helmintos, sin requerir a completar el ciclo de vida. Esto es de suma importancia, puesto que la identificación de larvas de helmintos con procedimientos taxonómicos, tradicionales basados en el estudio morfológico, no es posible.

Las metacercarias de *P. minimum* son una de las especies de helmintos más ampliamente distribuidos entre los peces dulceacuícolas de México. Así también existen muchas formas larvarias de parásitos sin identificar por las limitaciones que las técnicas tradicionales tienen.

Debido a las posibles variaciones intraespecíficas que presentan algunos parásitos en distintos estadios de desarrollo, se propone utilizar en estudios posteriores regiones con mayor variación como las ITS-1 y -2 ó el citocromo C.

APÉNDICE I.

Tinción de metacercarias y adultos con Paracarmin de Mayer

1. Fijar en formol al 4% o en Bouin
2. Conservar en alcohol 70%
3. Teñir con Paracarmin (30 seg. a 1 min.) dependiendo del grosor del helminto.
4. Lavar con alcohol 70% (10 minutos)
5. Diferencial en alcohol acidulado al 2% con ácido clorhídrico.
6. Lavar con alcohol 70% (15 minutos)
7. Alcohol 80% (15 minutos)
8. Alcohol 90% (15 minutos)
9. Alcohol 96% (15 minutos)
10. Alcohol absoluto (20 minutos)
11. Aclarar en salicilato de metilo o en aceite de clavo
12. Montar en bálsamo de Canadá.

APENDICE II

Kit de Amplificación de ADN total de Amersham, Genomiphi.

- 1.- Mezclar la metacercaria con 9 µl de Buffer de muestra.

Calentar a 95°C por 3 min

Enfriar a 4°C en hielo.

- 2.- Para cada reacción de amplificación combinar 9 μl de Buffer de reacción con 1 μl de la mezcla de enzima proporcionada en el Kit. Agregar a la muestra en frío.
- 3.- Incubar la muestra a 30°C por 16-18 h
- 4.- Calentar la muestra a 65°C por 10 minutos. Enfriar a 4°C.
- 5.- Colocar la muestra a temperatura ambiente.
- 6.- Agregar 20 μl de agua pura a cada tubo.
- 7.- Agregar 4 μl de acetato de Sodio/EDTA a cada reacción, mezclar bien.
- 8.- Agregar 100 μl de etanol 100% a cada reacción y mezclar bien.
- 9.- Centrifugar los tubos a temperatura ambiente 15 minutos a 14,000 rpm.
- 10.- Remover el sobrenadante, la mayor cantidad de líquido posible.
- 11.- Lavar la pastilla de ADN con etanol al 70%. Utilizar la cantidad de etanol que pueda almacenar el tubo. Centrifugar 1 minuto a 14,000 rpm.
- 12.- Remover el sobrenadante. Secar la pastilla y resuspender en 30 μl de Buffer TE.

APENDICE III

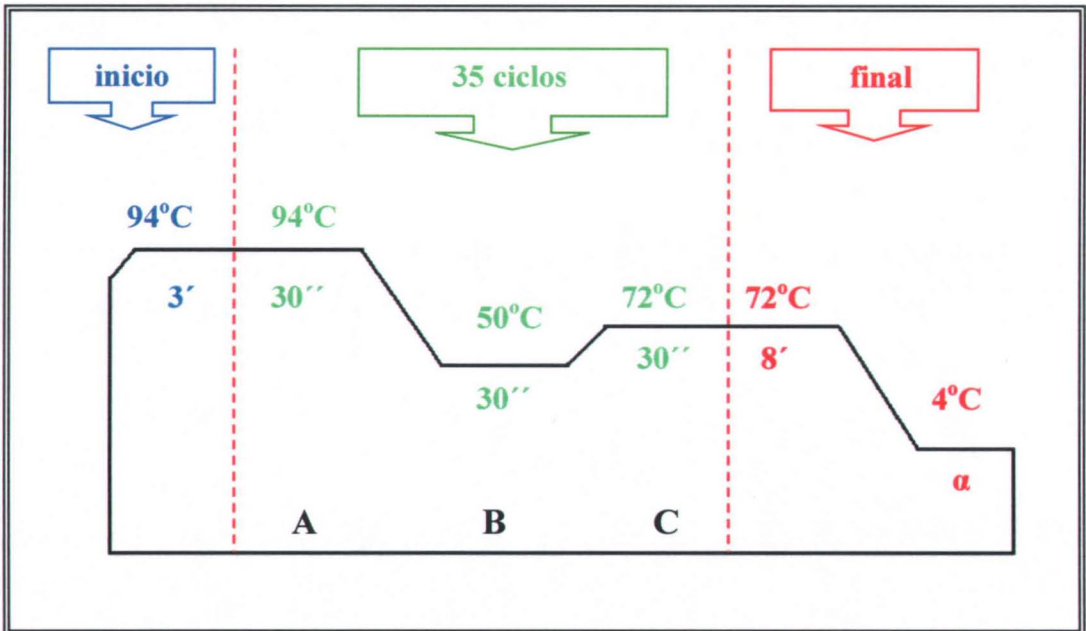
Kit de Purificación de ADN a partir de geles

- 1.- Cortar el área del gel con la banda.
- 2.- Pesar el gel. Para < 2% de agarosa colocar en un tubo y agregar 30 μl de amortiguador solubilizador de gel por cada 10 mg.
- 3.- Incubar a 50°C por 15 min. Agitar cada 3 min hasta que el gel parezca solubilizado.
- 4.- Colocar un cartucho en 1 tubo de 2ml para lavar. Pipetear la mezcla del paso 3 en el cartucho y centrifugar 1 min a 14,000 rpm. Descargar el residuo.

5.-Colocar el cartucho nuevamente en el tubo de lavado de 2ml. Agregar 700 μ l de Buffer de lavado al cartucho e incubar por 5 min a temperatura ambiente. Centrifugar 1 min a 14,000 rpm. Descargar el residuo. Centrifugar de nuevo por 1 min.

6.- Colocar el cartucho en un tubo de recuperación de 1.5 ml. Agregar 35 μ l de amortiguador TE caliente directamente al centro del cartucho. Incubar por 1 min a temperatura ambiente, centrifugar por 2 min a 14,000 rpm.

ANEXO 1



Condiciones de tiempo y temperatura para la amplificación del 18S rADN de *P. minimum* en la prueba de la PCR. A) Desnaturalización, B) Alineación y C) Extensión.

LITERATURA CITADA

- Aguirre-Macedo M.L., García-Magaña L. 1994. Metacercarias de cíclidos nativos del Sureste de México: taxonomía y claves para su reconocimiento. *Universidad y Ciencia* 11: 5- 35.
- Ausubel M. F., Brent, R., Kingsto, E. R., Moore, D.D., Seidman, G. J., Smith, A. J y K. Struhl. 1994- 1966. *Current Protocols in Molecular Biology*. Massachusetts General Hospital. Harvard Medical School. John Wiley & Sons, Inc. E.U.A.
- Barrer, R. H. 1994. Use of PCR in the field. *Parasitology Today*. 10 (3): 117- 119.
- Barrera, B. N. 1987. El balance morfogénesis-pedogénesis de una cuenca lacustre del Eje Neovolcánico Transmexicano; La región natural de Pátzcuaro, Michoacán. En: La morfología en la ordenación de los paisajes naturales. Conceptos y primeras aplicaciones en México. Ed. por Geissert y J. Rossignol. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos e Instituto Francés de Investigación Científica para el desarrollo en Cooperación, 65- 75.
- Barrera, S. H., J. Rivera. y P. D. Reséndez. 1993. Reacción en cadena de la polimerasa. *Ciencia y desarrollo*. Enero/febrero: 50- 60.
- Bell, J. 1989. The Polymerase Chain Reaction. *Immunology Today*. 10: 351- 355.
- Bernal- Brooks F. W., 1998. La Limnología del Lago de Pátzcuaro: una visión alternativa a conceptos fundamentales. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Boyle, P. J & T. P. Yoshino. 2003. Gene manipulation in parasitic helminths. *International Journal for Parasitology* 33: 1259- 1268.

- Brooks, R. D. & R. Elwyn. 2002. Functional genomics of parasitic worms: the dawn of a new era. *Parasitology International* **51**: 319- 325.
- Campbell, R. A. 1972. New experimental host of *Posthodiplostomum minimum* (Trematoda: Diplostomatidae). *Journal of Parasitology* **58**: 1051.
- Comisión Nacional del Agua, 1991. Estudio básico del comportamiento hidráulico del Lago de Pátzcuaro y sus causas. Comisión nacional del Agua. 106pp.
- Chacón, T.A., L.G. Ross & M.C.M. Beveridge. 1989. Lake Patzcuaro, México: results of a new morphometric study and its implications for productivity assessments. *Hidrobiología* **184**: 125- 132.
- Cheng, C. T. 1986. General Parasitology. Segunda edición. Academia Press Collage Division. EUA.
- De Buen, F., 1944a. Los lagos michoacanos. II. Pátzcuaro. *Rev. Soc. Mex. His. Nat. México*. **5**: 99-125.
- De Buen, F., 1944b. Limnobiología de Pátzcuaro. *An. Inst. Biol. Univ. Nac. Auto.de México*. **5**: 261-312.
- De la Lanza, G. & J.L. García (comp.). 2002. *Lagos y presas de México*. AGT Ed. México. D.F. 1 ed. 680 p.
- Erlich, H. A., D. Gelfand, y J. Sninsky. 1991. Recent advances in the Polymerase Chain Reaction. *Science*. **252**: 1643- 1650.
- Espinosa- Pérez, H (1993) Riqueza y diversidad de peces. *Ciencias* (México, Distrito Federal) Volumen especial **7**: 77- 84.
- Espinosa-Pérez, H., P. Fuentes-Mata, M. T. Gaspar-Dillanes, & V. Arenas. 1993. Notes on Mexican Ichthyofauna. Páginas 229-251 en T. P. Ramamoorthy, R. Bye,

- A. Lot, y J. Fa, editors. Biological diversity of México: origins and distribution. Oxford University Press, New York.
- Flores R., V. Magallanes & J. E. Mestre. 1992. Evaluación de las técnicas para el control de la erosión. Comisión Nacional del Agua. Gerencia Regional Lerma-Balsas. 47p.
 - García, E (1973) Modificación al sistema de clasificación climática de Köppen Ed. Instituto de Geografía, UNAM. México 246 pp.
 - Gibson, D. I. 1996. Trematoda In L. Margolis and Z. Kabata (eds). Guide to parasites of fishes of Canada Part IV. Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences 124. 373 pp.
 - Guzmán-Arroyo, M., S. Peniche, & M. Villagomez. 2002. Lake Chapala. *In* 7th Internacional Living Lakes Conference. Johannesburg, South Africa.
 - Guzmán-Arroyo, M. y E. N. Merino. Diagnóstico de la problemática de la contaminación del agua en el estado de Jalisco. Secretaria de Desarrollo Urbano y Ecología. Delegación Jalisco/ Instituto de Limnología UDG. 1990. 62 pp.
 - Gyllensten U. 1989. PCR and Sequencing. *BioTechniques* 7: 700- 706.
 - Hoffman, G. L. 1999. Parasites of North America freshwater fishes. Cornell University Press, USA 539 pp.
 - Itagaki T, Tsutsumi K-I, Ito K, Tsutsumi Y. 1998. Taxonomic status of the Japanese triploid forms of *Fasciola*: comparison of mitochondrial ND1 and COI sequences with *F. hepatica* and *F. gigantica*. *Journal for Parasitology* 84: 445- 448.
 - Jousson, O., Bartoli, P., L. Zaninetti & J. Pawlowski. 1998. Use of the ITS r DNA for elucidation of some life- cycles of Mesometridae (Trematoda, Digenea). *International Journal for Parasitology* 28: 1403- 1411.

- Jousson, O., P. Bartoli & J. Pawlowski. 1999. Molecular identification of developmental stages in *Opecoelidae* (Digenea). *International Journal for Parasitology* **29**: 1853- 1858.
- Kunz, W. 2002. When is a parasite species a species?. *Trends in Parasitology* **18**: 121- 124.
- Lamothe-Argumedo R., Pérez-Ponce de León G. 1986. Hallazgo de *Posthodiplostomum minimum* (MacCallum, 1921) Dubois, 1936 (Trematoda: Diplostomidae) en *Egretta thula* en México. Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, *Serie Zoología* **57**: 235- 246.
- Margolis, L. & Z. Kabata. 1996. Guide to the parasites of fishes of Canada. National Research Council of Canada, Ottawa 373 pp.
- Martínez-Aquino, A., G. Salgado-Maldonado, R. Aguilar-Aguilar, G. Cabañas-Carranza y M. P. Ortega-Olivares. 2004. Helminth parasites of *Chapalichthys encaustus* (Pisces: Goodeidae), an endemic freshwater, fish from Lake Chapala, Jalisco, Mexico. *Journal of Parasitology* **90**: 889- 890.
- Martorelli, S. R. y V. A. Ivanov. 1996. Host-induced and geographical variation in *Levinseniella cruzi* Travassos, 1920 (Digenea: Microphallidae). *Journal of Helminthological Society of Washington* **63**: 130- 135
- Matsui, Y (1937) Informe de la explotación realizada en el Lago de Chapala. Bol. Dpto. Forestal, Caza y Pesca. México (2): 151- 164.
- McManus, D. P. y J. Bowles. 1996. Molecular genetic approaches to parasite identification: Their value in diagnostic parasitology and systematics. *International Journal of Parasitology*. **26**: 687- 704.

- Meelis, T., Durand, P. & F. Renaud. 2003. Species concepts: what for?. *Trends in Parasitology* **19**: 425- 426.
- Miller, R. R. 1982. Pisces. In: Aquatic Biota of México, Central America and the West Indies. S. H. Hilbert & A. Villalobos. Figueroa eds. San Diego State University. San Diego Calif. 1982.
- Miller, R. R. & M. L. Smith. 1986. Origin and Geography of the fish fauna Central México. 491- 519. In: the zoogeography of North American Freshwater Fishes C. R. Howitt y E. O. Wiley Interscience. New York.
- Miller, R. R. 1966. Geographical distribution of Central America freshwater Fishes. *Copeia* **4**: 773- 800.
- Monis, T. P., Andrews, H. R. & C. P. Saint. 2002. Molecular biology techniques in parasite ecology. *International Journal for Parasitology* **32**: 551- 562.
- Morelos, M. G. & M. Guzmán-Arroyo. 1995. Ictiofauna del lago. En: Guzmán-Arroyo, M. (comp). La pesca en el lago de Chapala: hacia su ordenamiento y explotación racional. Univ. de Guad. Com. Nac. Agua. México.
- Morgan, J.A. & D. Blair. 1995. Nuclear rDNA ITS sequence variation in the trematode genus *Echinostoma*: an aid to establishing relationship within the 37-collar-spine group. *Parasitology* **111**: 609- 615.
- Mullis, K. B. 1990. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American* **262**: 43- 46.
- Niewiadomska, K. & Z. Laskowski. 2002. Systematic relationship among six species of *Diplostomum Nordmann*, 1832 (Digenea) based on morphological and molecular data. *Acta Parasitologica* **47**: 20- 28.

- Ortega-Olivares, M. P., 2004. Estudio taxonómico y distribución geográfica de tres helmintos de aves, en tres estados de la República Mexicana. Tesis. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Palmieri, J. R. 1977a. Host-induced morphological variations in the strigeoid trematode *Posthodiplostomum minimum* (Trematoda: Diplostomatidae).II. Body measurements and tegument modifications. *The Great Basin Naturalist* **37**: 129-137.
- Palmieri, J. R. 1977b. Host-induced morphological variations in the strigeoid trematode *Posthodiplostomum minimum* (Trematoda: Diplostomatidae). III. Organs of attachment. *The Great Basin Naturalist*. **37**: 375- 382.
- Palmieri, J. R. 1977c. Host-induced morphological variations in the strigeoid trematode *Posthodiplostomum minimum* (Trematoda: Diplostomatidae). IV. Organs of reproduction (ovary and testes), vitelline gland, and eggs. *The Great Basin Naturalist*. **37**: 481- 488.
- Palumbi, S. 1996. The Polymerase Chain Reaction. In. *Molecular Systematics*, D. M. Hillis, C. Moritz & B. K. Mable, (eds). Sinauer, Sunderland, M. A., p: 205- 247.
- Pearson, J.C.1972. A phylogeny of life- Cycle patterns of the Digenea. *Adv. Parasitol* **58**: 760- 788.
- Passer, B. R. 2001. Molecular taxonomic, diagnostic and genetic studies of parasitic helminths. *International Journal for Parasitology* **31**: 860- 864.
- Pérez-Ponce de León, G. 1992. Sistemática del género *Posthodiplostomum minimum* Dubois, 1936 y algunos aspectos epizootiológicos de la postodiplostomiasis en el Lago de Pátzcuaro. Michoacán, México. Tesis Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 181 pp.

- Pérez-Ponce de León G. 1995. Host induced morphological variability in adult *Posthodiplostomum minimum*. *Journal of Parasitology* **81**: 818- 820.
- Pineda-López R., Andrade-Salas O., Páramo-Delgadillo S., Trejo, P.L., Almeida-Artigas J., Osorio-Sarabia D., Pérez-Ponce de León G. 1985a. Estudio del control sanitario de la piscifactoría Benito Juárez y en los vasos de las presas la Angostura y Malpaso. Dirección de Acuacultura, Secretaría de Pesca. México, 309pp.
- Prichard, R. 1997. Application of molecular biology in veterinary parasitology. *Veterinary Parasitology*. **71**: 155- 175.
- Rollison, D., Walker, T. K. & A. J. Simpson. 1986. The application of recombinant DNA technology to problems of helminth identification. *Parasitology* **91**: 53- 71.
- Rosenthal, M. B. 2001. Defining and interpreting intraspecific molecular variation. *Veterinary Parasitology* **101**: 187- 200.
- Rundle, H. D. *et al.* 2001. Natural selection and parallel speciation in sympatric sticklebacks. *Science* **287**: 306-308.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich H.A. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487- 491.
- Salgado-Maldonado, G., Cabañas-Carranza, G., Caspeta-Mandujano, J. M., Soto-Galera, E., Mayén-Peña, E., Brailowsky, D. & R. Báez-Vale. 2001a. Helminth parasites of freshwater fishes of the Balsas River Drainage Basin of Southwestern México. *Comparative Parasitology* **68**: 196- 203.
- Salgado-Maldonado, G., Cabañas-Carranza, G., Soto-Galera, E., Caspeta-Mandujano, J. M., Moreno-Navarrete, G., Sánchez-Nava, P. & R. Aguilar-Aguilar.

- 2001b. A Checklist of Helminth Parasites of Freshwater Fishes from the Lerma-Santiago River Basin, México. *Comparative Parasitology* **68**: 204- 218.
- Schell, S. C. 1985. Trematodes of North America. North of Mexico. University Press of Idaho. 263pp.
 - Schmit G. D. y S. L. Roberts. 1989. Foundations of Parasitology. International Edition IE. Times Mirror/Mosby Collage Publishing. Fourth edition. USA.
 - Sereno-Uribe, A. I. 2004. Ciclo de vida de *Ochetosoma brevicaecum* (Caballero y Caballero, 1941) y *Posthodiplostomum minimum* (MacCallum, 1921) en condiciones de laboratorio. Tesis Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México. 55pp.
 - Sitko, J. 1995. Variability and systematic status of *Zonorchis clathratum* (Trematoda: Dicrocoeliidae), a parasite of swifts and swallows. *Folia Parasitologica* **42**: 193- 198.
 - Sholtz, T., Vargas- Vázquez, J., Aguirre- Macedo, L. & V. Vidal- Martínez. 1997. Species of *Ascocotyle* Los, 1899 (Digenea: Heterophyidae) of the Yucatán Peninsula, México, and notes on their life cycles. *Systematic Parasitology* **36**: 161- 181.
 - Singh, B. 1997. Molecular Methods for Diagnosis and Epidemiological Studies of Parasitic Infections. *International Journal for Parasitology* **27**: 1135- 1145.
 - Turcekova, L., Snabel, V., D'Amelio, S., M. Busi & P. Dubinsky. 2003. Morphological and genetic characterization of *Echinococcus granulosus* in the Slovak Republic. *Acta Tropica* **85**: 223- 229.
 - Yamaguti, S. 1971. Synopsis of digenetic trematodes of vertebrates I y II. Keigaku Publ. Co. Tokio, Japón. 1070 pp.

- Zeisler, R. & G. D. Ardizzone. 1979. Las aguas continentales de América Latina. FAO Copescal, Tech. Pap: 171 pp.

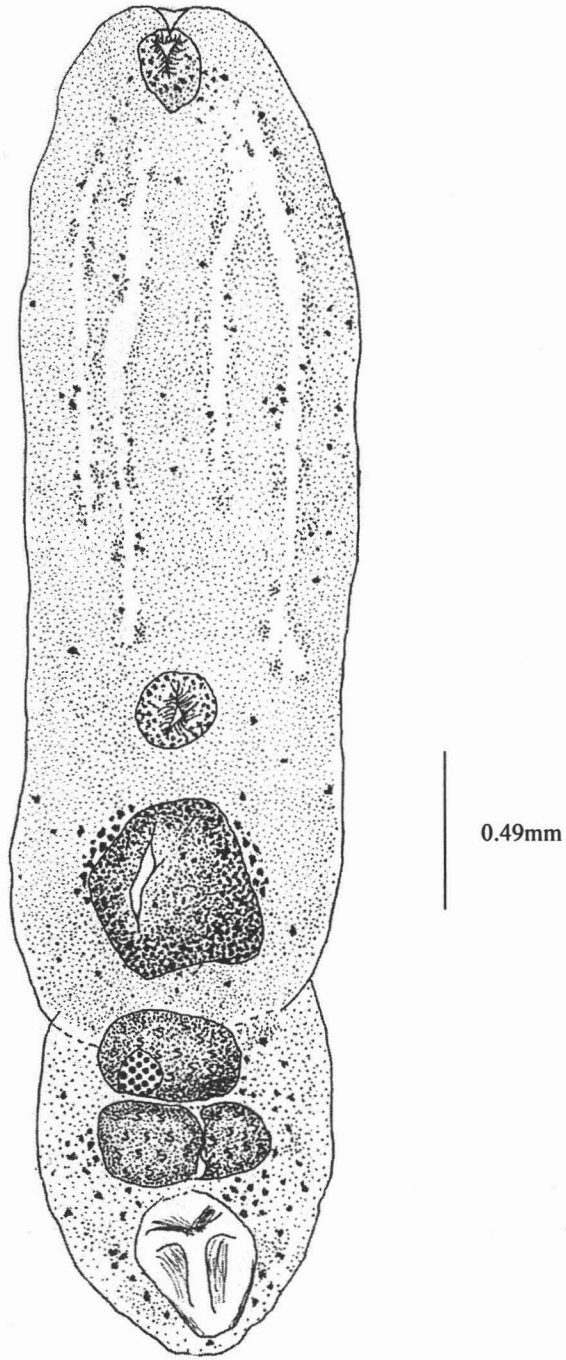


Figura 5. Metacercaria de *P. minimum* de los ojos de *P. mexicana* de Villa Flores, Chiapas.

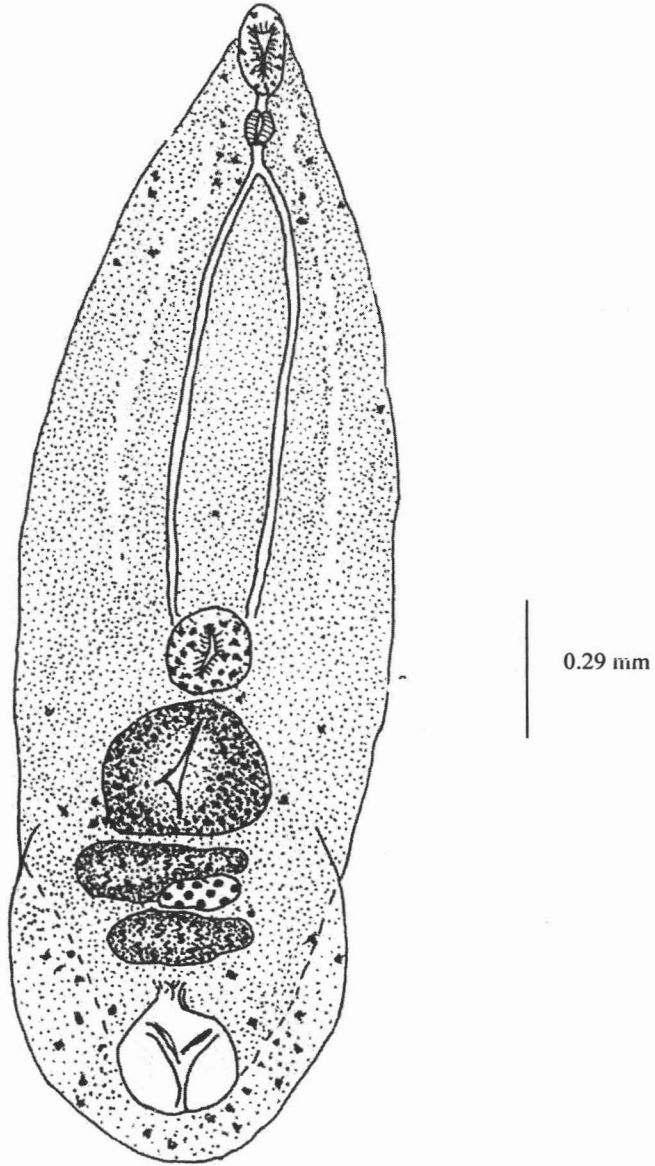


Figura 4. Metacercaria de *P. minimum* del hígado de *C. encaustus* del Lago de Chapala.

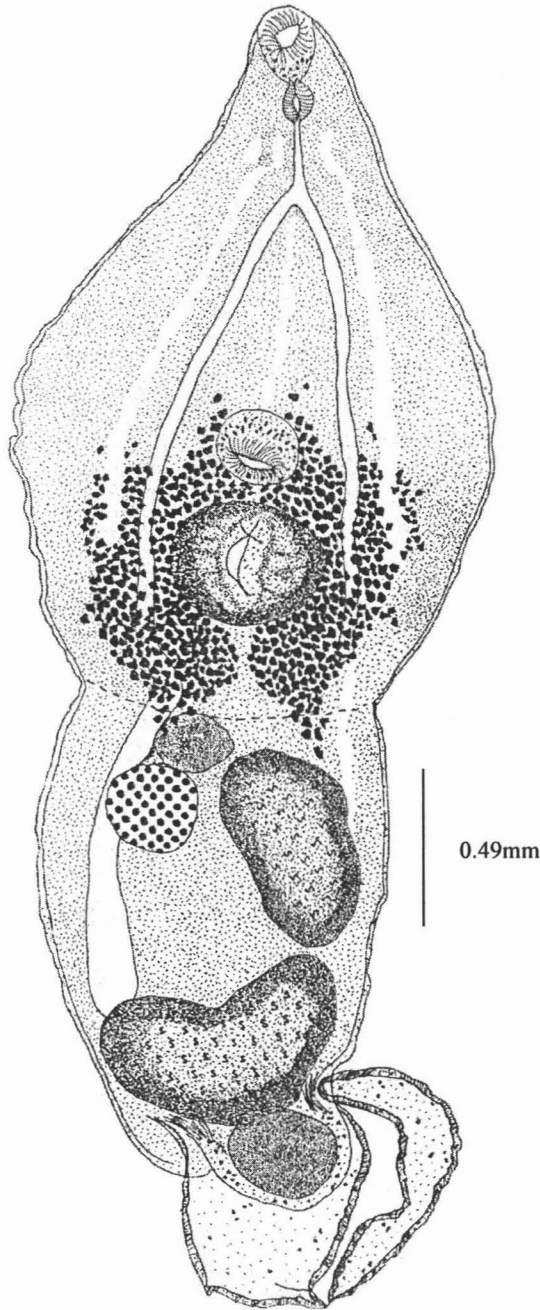


Figura 2. Adulto de *P. minimum* obtenido experimentalmente con metacercarias del hígado de *A. robustus* (Morfotipo 1).

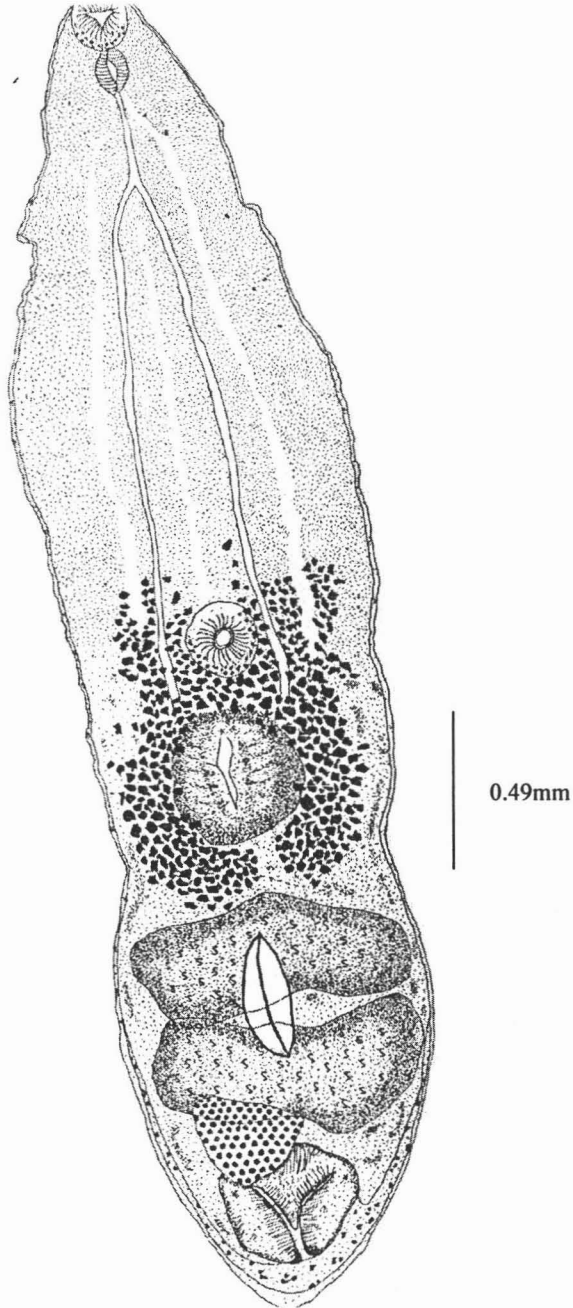
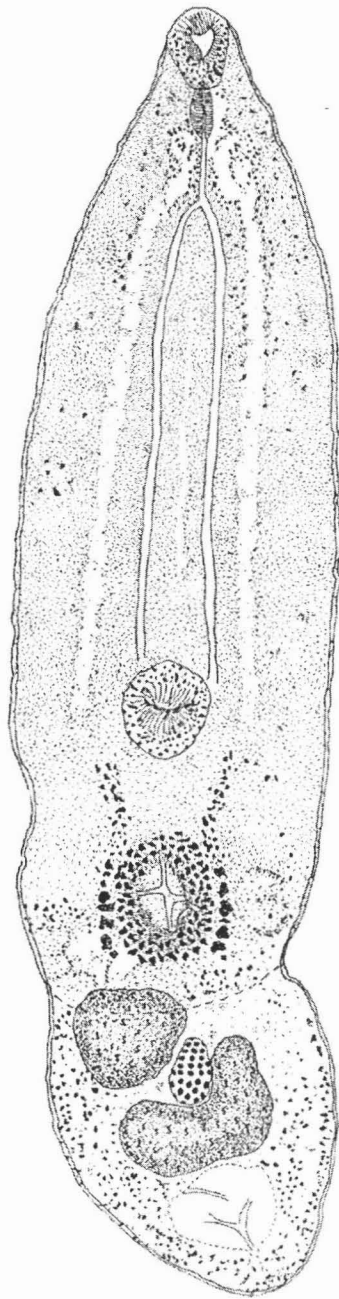


Figura 3. Adulto de *P. minimum* obtenido experimentalmente con metacercarias del hígado de *A. robustus* (Morfortipo 2).



0.49mm

Figura 1a. Metacercaria de *P. minimum* del hígado de *A. robustus* del Lago de Pátzcuaro, Michoacán.

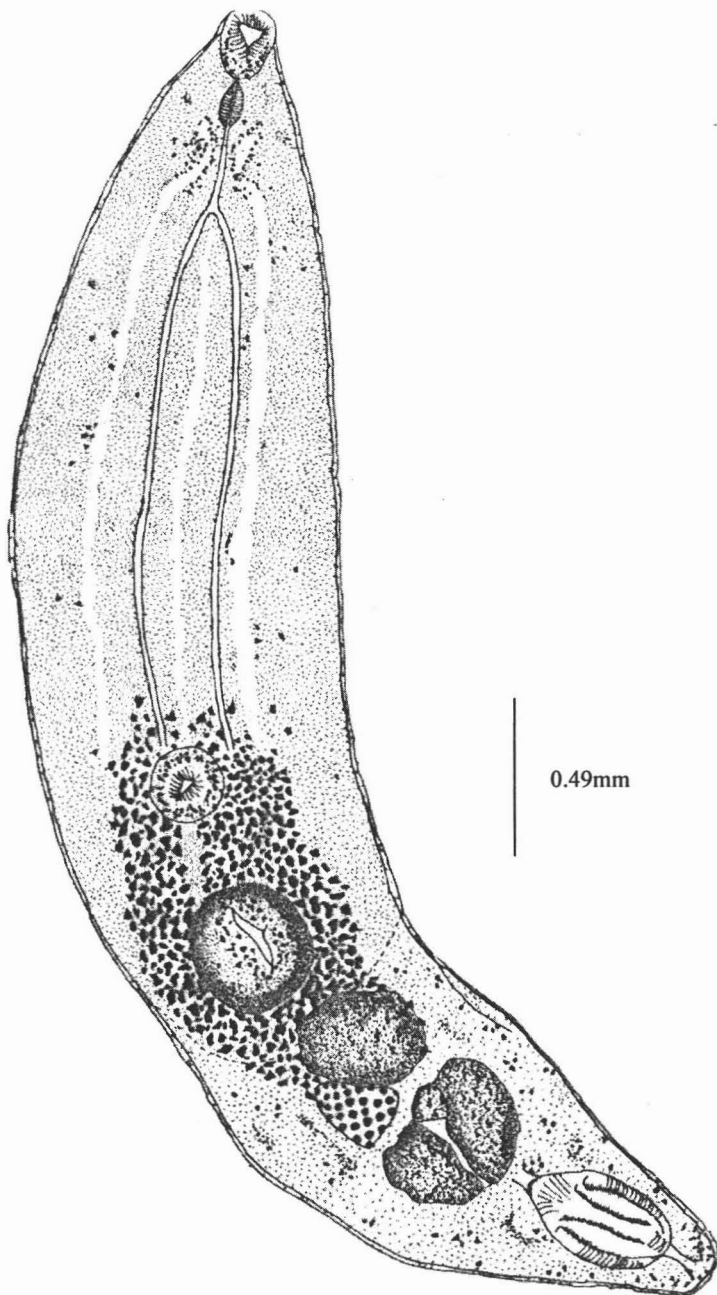


Figura 1b. Metacercaria de *P. minimum* del hígado de *A. robustus* del Lago de Pátzcuaro, Michoacán.

Tabla 1. Infección experimental de pollos domésticos con metacercarias de *P. minimum* de *Alloophorus robustus* en Pátzcuaro, Mich en marzo 2004

pollo #	peso gr	muerte (dd y hh)	Disección (dd y hh)	# de metacercarias para infección	# de adultos recuperados	Lote E		Lote D1		Lote D2	
						# de metacercarias fijadas en EIOH absoluto	# de metacercarias fijadas en formol 4% caliente	# de metacercarias aplastadas con formol 4%	# de metacercarias aplastadas con formol 4%		
1	30,9	20/03/04 19:12	20/03/2004 19:20	19	0	0	0	0	0	0	0
2	37	20/03/04 18:50	20/03/2004 19:00	16	0	0	0	0	0	0	0
3	23,4	17/03/04 17:30	17/03/2004 18:30	63	2	1	1	1	1	0	0
4	28,7	19/03/04 06:00	19/03/2004 13:10	91	21	9	9	6	3	3	3
5	30,1	20/03/04 16:51	20/03/2004 17:00	43	1	1	1	0	0	0	0
6	21,2	15/03/04 14:00	16/03/2004 19:00	52	7	0	0	7	7	0	0
7	17,3	18/03/04 13:35	18/03/2004 13:55	60	1	1	1	0	0	0	0
8	25,1	20/03/04 14:00	20/03/2004 14:30	38	0	0	0	0	0	0	0
9	25,1	19/03/04 18:45	19/03/2004 18:53	238	0	0	0	0	0	0	0
10	32,8	17/03/04 16:30	17/03/2004 20:00	221	78	30	30	30	30	10	10
11	33,7	20/03/04 17:33	20/03/2004 17:40	46	2	1	1	1	1	0	0
12	18,9	18/03/04 21:30	19/03/2004 12:30	207	64	37	37	16	16	7	7
13	35,5	18/03/04 06:00	17/03/2004 11:50	142	12	6	6	4	4	2	2
14	30,5	20/03/04 12:00	20/03/2004 12:17	91	0	0	0	0	0	0	0
15	34,2	20/03/04 17:58	20/03/2004 18:05	63	0	0	0	0	0	0	0
16	31	20/03/04 16:08	20/03/2004 16:21	72	1	0	0	1	1	0	0
17	29,8	20/03/04 12:27	20/03/04 12:36	185	59	29	29	17	17	8	8
18	30,8	19/03/04 15:00	19/03/04 15:22	117	7	4	4	2	2	1	1
19	33	20/03/04 17:25	20/03/2004 17:36	85	8	4	4	2	2	1	1
20	30,3	19/03/04 18:50	19/03/2004 19:07	131	29	15	15	5	5	4	4
21	25,8	18/03/04 17:15	18/03/2004 17:30	121	16	8	8	6	6	2	2

Tabla 2. Metacercarias de *P. minimum* en hígado de *Allophororus robustus* de Pátzcuaro Mich., marzo 2004

# de hosp	Peso (gr)	L. total (mm)	L. patrón (mm)	Altura (mm)	# de metacercarias totales	Lote A		Lote B1		Lote B2		Lote B3		Lote C
						# de metacercarias para infección experimental de pollos	# de metacercarias fijadas con formol 4% caliente	# de metacercarias aplanadas con formol 4%	# de metacercarias aplanadas con Bouin	# de metacercarias fijadas con EIOH 100%				
O30402	16,5	98	80	27	36	19 (12/03/04 15:00)	5	3	-	-	9			
O30401	16,9	102	88	25	48	16 (12/03/04 15:30)	4	10	-	-	15			
O30404	17	106	92	27	120	63 (12/03/04 16:30)	11	4	-	-	26			
O30405	18,3	97	83	22	112	91 (12/03/04 17:00)	4	3	-	-	14			
O30406	12,8	98	86	26	66	52 (12/03/04 17:30)	7	-	-	-	7			
O30407	15,3	98	83	26	59	43 (12/03/04 17:05)	4	3	3	3	6			
O30408	22,7	108	94	29	80	60 (12/03/04 17:31)	-	6	-	-	10			
O30410	15,4	100	84	24	47	38 (12/03/04 17:50)	-	-	-	-	9			
O30411	15,7	100	85	27	351	238 (12/03/04 18:05)	10	5	3	3	50			
O30413	19,3	109	95	28	286	221 (14/03/04 13:10)	21	5	-	-	39			
O30414	21,6	112	98	30	110	46 (14/03/04 13:15)	22	4	-	-	23			
O30412	20,2	110	92	29	242	207 (14/03/04 13:15)	10	5	-	-	20			
O30415	25,1	115	103	30	201	142 (14/03/04 13:20)	15	4	-	-	40			
O30417	16,7	103	85	27	123	91 (14/03/04 13:30)	8	4	-	-	20			
O30416	16,2	105	90	30	104	63 (14/03/04 13:40)	12	4	-	-	25			
O30418	19,5	115	102	28	117	72 (14/03/04 13:45)	20	5	-	-	20			
O30419	22,9	118	108	30	230	185 (14/03/04 13:43)	20	-	-	-	20			
O30420	21,9	115	102	30	168	117 (14/03/04 13:45)	15	4	-	-	30			
O30422	15,3	102	90	28	132	85 (14/03/04 13:55)	15	3	-	-	25			
O30423	13,4	93	78	25	172	131 (14/03/04 14:00)	10	4	-	-	25			
O30421	15	100	89	28	151	121 (14/03/04 14:00)	15	-	-	-	15			

ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

Tabla 3. Morfometría comparada de metacercarias de *P. minimum* en peces de México

Característica	Osoyo-Sarabia, et al. 1986	Aguirre-Macedo et al. 1994	Scholtz, et al. 1995	Ortega, 2004	Presente trabajo (Pátzcuaro)	Presente trabajo (Chapala)	Presente trabajo (Chiapas)
Longitud Total	0.579-0.772(0.667)	0.920-1.320(1.070)	0.663-1.607	0.728-1.085(0.955)	0.597-0.898(0.808)	0.808-0.891(0.838)	0.803-1.029(0.944)
Segmento anterior							
largo	0.434-0.515(0.476)	0.475-0.731(0.630)	0.451-0.952	0.539-0.785(0.688)	0.160-0.656(0.555)	0.626-0.717(0.659)	0.166-0.793(0.705)
ancho	0.161-0.322(0.230)	0.266-0.684(0.439)	0.390-0.560	0.319-0.403(0.355)	0.043-0.205(0.175)	0.186-0.203(0.193)	0.057-0.313(0.245)
Segmento posterior							
largo	0.144-0.257(0.190)	0.275-0.551	0.212-0.655	0.188-0.300(0.266)	0.147-0.552(0.236)	0.153-0.174(0.167)	0.16-0.27(0.239)
ancho	0.161-0.322(0.230)	0.161-0.494	0.230-0.536	0.217-0.319(0.286)	0.045-0.205(0.167)	0.189-0.217(0.20)	0.052-0.264(0.214)
Ventosa oral							
largo	0.037-0.045(0.040)	0.033-0.057(0.048)	0.038-0.057	0.042-0.050(0.045)	0.028-0.046(0.039)	0.032-0.037(0.034)	0.026-0.046(0.037)
ancho	0.026-0.045(0.032)	0.019-0.043(0.031)	0.044-0.047	0.035-0.045(0.038)	0.024-0.036(0.027)	0.025-0.028(0.027)	0.026-0.052(0.037)
Relación entre ventosas							
largo	1:1.6	1:1.3	1:1.38-1:1.61	1:1.1-1:1.14	1:1.05-1:1.67		
ancho	1:1.7	1:1.7	1:1.38-1:1.61	1:1.1-1:1.7	1:1.4-1.2		
Pteríngine							
largo	-	-	-	-	0.0048-0.012(0.0084)	0.0076-0.00143(0.0107)	
ancho	-	-	-	-	0.0024	0.0053	
Faringe							
largo	0.033-0.045(0.038)	0.024-0.043(0.034)	0.030-0.038	0.023-0.029(0.026)	0.016-0.033(0.024)	0.020-0.027(0.023)	
ancho	0.019-0.041(0.023)	0.019-0.026(0.024)	0.018-0.026	0.022-0.027(0.024)	0.012-0.028(0.018)	0.02-0.021(0.0206)	
Esófago							
largo	-	-	-	-	0.021-0.067(0.045)	0.01-0.15(0.057)	
ancho	-	-	-	-	0.0024-0.0072(0.0045)	0.0046-0.02(0.0103)	
Acetábulo							
largo	0.045-0.063(0.054)	0.050-0.072(0.063)	0.047-0.080	0.050-0.071(0.061)	0.040-0.055(0.048)	0.042-0.049(0.045)	0.052-0.072(0.062)
ancho	0.045-0.067(0.054)	0.032-0.074(0.065)	0.062-0.071	0.051-0.060(0.055)	0.036-0.050(0.043)	0.033-0.038(0.036)	0.046-0.067(0.056)
Órgano tribocítico							
largo	0.063-0.112(0.088)	0.115-0.199(0.158)	0.128	0.137-0.168(0.147)	0.072-0.091(0.080)	0.080-0.088(0.085)	0.112-0.144(0.128)
ancho	0.067-0.112(0.095)	0.072-0.184(0.148)	0.143	0.088-0.110(0.101)	0.057-0.086(0.074)	0.086-0.096(0.090)	0.12-0.156(0.132)
Testículo anterior							
largo	0.037-0.082(0.048)	0.048-0.103(0.087)	-	0.038-0.144(0.070)	0.031-0.064(0.054)	0.036-0.046(0.042)	0.06-0.10(0.073)
ancho	0.056-0.112(0.076)	0.148-0.256(0.179)	-	0.065-0.118(0.095)	0.052-0.100(0.078)	0.080-0.105(0.096)	0.086-0.123(0.105)

Tabla 3. Continuación

Característica	Osoño-Sarabia, <i>et al.</i> 1986	Aguirre-Macedo <i>et al.</i> 1994	Scholtz, <i>et al.</i> 1995	Ortega, 2004	Presente trabajo (Pátzcuaro)	Presente trabajo (Chiapala)	Presente trabajo (Chiapas)
Testículo posterior							
largo	0.037-0.082(0.056)	0.057-0.163(0.098)	-	0.047-0.194(0.085)	0.026-0.088(0.055)	0.042-0.045(0.043)	0.050-0.12(0.074)
ancho	0.045-0.101(0.074)	0.114-0.332(0.205)	-	0.060-0.201(0.147)	0.072-0.156(0.105)	0.082-0.116(0.10)	0.069-0.134(0.110)
Ovario							
largo	0.026-0.037(0.033)	0.044-0.077(0.057)	-	0.044-0.063(0.052)	0.026-0.06(0.043)	0.022-0.024(0.023)	0.002-0.069(0.036)
ancho	0.037-0.056	0.046-0.138(0.074)	-	0.047-0.070(0.056)	0.026-0.067(0.043)	0.040	0.019-0.062(0.036)
Bolsa copulatrix							
largo	0.037-0.063(0.049)	0.096-0.176(0.124)	-	0.073-0.127(0.105)	0.052-0.088(0.066)	0.063-0.071(0.067)	0.084-0.108(0.096)
ancho	0.045-0.071(0.054)	0.066-0.136(0.102)	-	0.091-0.128(0.110)	0.050-0.081(0.064)	0.051-0.060(0.056)	0.074-0.108(0.090)

Tabla 4. Comparación morfométrica de los ejemplares adultos obtenidos experimentalmente de pollos con las descripciones de *P. minimum* disponibles en la literatura.

hospedero	Dubois, 1931.	Lamotte-Argumedo y Pérez, 1986	Palmieri 1997a,b,c.	Ortega, 2004	Ortega, 2004	Ortega, 2004	Ortega, 2004	Presente trabajo morfotipo 1	Presente trabajo morfotipo 2
				<i>Egretta thula</i>	<i>Ardea alba</i>	<i>Larus delawarensis</i>	<i>Gallus gallus</i>	<i>Gallus gallus</i>	<i>Gallus gallus</i>
Longitud	0.87-1.17	0.797	0.614	0.789-1.221(1.023)	0.714-0.866(0.798)	0.185-1.336(1.261)	0.754-1.097(0.864)	0.754-1.097(0.864)	0.866-1.245(0.936)
Segmento anterior	Largo Ancho	- -	- -	- -	- -	- -	0.519-0.735(0.608) 0.196-0.313(0.240)	0.519-0.735(0.608) 0.196-0.313(0.240)	0.470-0.833(0.620) 0.196-0.411(0.280)
Segmento posterior	Largo Ancho	- -	- -	- -	- -	- -	0.205-0.362(0.275) 0.196-0.323(0.244)	0.205-0.362(0.275) 0.196-0.323(0.244)	0.235-0.411(0.315) 0.166-0.332(0.246)
Ventosa oral	Largo Ancho	0.039 0.037	0.038 0.031	0.040-0.055(0.044) 0.028-0.055(0.035)	0.031-0.047(0.041) 0.028-0.038(0.032)	0.042-0.044(0.043) 0.030-0.031(0.030)	0.026-0.057(0.041) 0.024-0.040(0.033)	0.026-0.057(0.041) 0.024-0.040(0.033)	0.028-0.055(0.040) 0.024-0.038(0.033)
Faringe	Largo Ancho	- -	- -	- -	0.030-0.042(0.034) 0.020-0.025(0.023)	0.037-0.041 0.021-0.030	0.021-0.033(0.029) 0.016-0.028(0.023)	0.021-0.033(0.029) 0.016-0.028(0.023)	0.024-0.045(0.029) 0.016-0.031(0.024)
Largo esófago	.025-.048	-	-	-	-	-	0.048-0.096(0.065)	0.048-0.096(0.065)	0.064-0.1032(0.081)
Acetábulo	Largo Ancho	0.05 0.045	0.049 0.06	0.033-0.062(0.050) 0.051-0.067(0.057)	0.037-0.052(0.045) 0.039-0.052(0.048)	0.049-0.061(0.052) 0.046-0.072(0.061)	0.043-0.06(0.049) 0.045-0.06(0.055)	0.043-0.06(0.049) 0.045-0.06(0.055)	0.035-0.067(0.048) 0.045-0.062(0.054)
Órgano tribocítico	Largo Ancho	0.082 0.083	0.106 0.127	0.090-0.228(0.140) 0.117-0.229(0.156)	0.067-0.101(0.087) 0.102-0.143(0.110)	0.097-0.099(0.098) 0.072-0.096(0.080)	0.081-0.148(0.106) 0.076-0.170(0.108)	0.081-0.148(0.106) 0.076-0.170(0.108)	0.074-0.208(0.109) 0.081-0.199(0.109)
Ovario	Largo Ancho	0.046 0.046	0.031 0.033	0.038-0.064(0.054) 0.038-0.064(0.054)	0.035-0.068(0.051) 0.035-0.052(0.042)	0.076-0.084(0.081) 0.071-0.089(0.078)	0.033-0.117(0.064) 0.036-0.108(0.065)	0.033-0.117(0.064) 0.036-0.108(0.065)	0.045-0.079(0.066) 0.045-0.115(0.068)
Testículo anterior	Largo Ancho	0.063 0.095	0.066 0.198	0.091-0.108(0.101) 0.075-0.091(0.082)	0.060-0.096(0.076) 0.057-0.104(0.077)	- -	0.055-0.115(0.079) 0.100-0.278(0.178)	0.055-0.115(0.079) 0.100-0.278(0.178)	0.052-0.141(0.085) 0.06-0.177(0.120)
Testículo posterior	Largo Ancho	0.073 0.108	0.068 0.036	0.066-0.094(0.077) 0.132-0.178(0.160)	0.061-0.097(0.085) 0.107-0.160(0.132)	0.095-0.186(0.140) 0.201-0.284(0.233)	0.052-0.103(0.078) 0.088-0.264(0.175)	0.052-0.103(0.078) 0.088-0.264(0.175)	0.048-0.175(0.098) 0.055-0.196(0.107)

Tabla 4. Continuación

hospedero	Dubois, 1931.		Lamothe-Argumedo y Pérez 1986		Palmieri 1997a,b,c.		Ortega, M. 2004		Ortega, M. 2004		Presente trabajo morfotipo 1		Presente trabajo morfotipo 2	
	<i>Ardea herodias</i> *				<i>Egretta thula</i>		<i>Ardea alba</i>		<i>Larus delawarensis</i>		<i>Gallus gallus</i>		<i>Gallus gallus</i>	
Huevos	.085		0,078		0,084		-		0,084-0,107(0,099)		0,075-0,088(0,088)		0,06-0,098(0,080)	
Ancho	.058		0,044		0,058		-		0,048-0,080(0,062)		0,036-0,074(0,057)		0,038-0,066(0,056)	
Bolsa copulatrix	Largo										0,053-0,10(0,083)		0,077-0,20(0,119)	
Ancho											0,094-0,115(0,105)		0,072-0,216(0,154)	