



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Detección de *Reichenowia* (Alphaproteobacteria)
en el bacterioma de *Placobdella ringueleti*
(Hirudinae: Glossiphoniidae) mediante técnicas de
microscopía electrónica y marcadores moleculares

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

ESPECIALISTA EN MICROSCOPIA
ELECTRÓNICA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P R E S E N T A:

Kenia Samantha Contreras Mirón

DIRECTOR:

Dr. Alejandro Francisco Ocegüera Figueroa

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

2017





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mi padre Roberto Contreras, a mi madre Judith Mirón y a mi hermana Elizabeth Contreras por su ejemplo, por siempre apoyar cada uno de mis decisiones y por tratar de enseñarme como hacer mejor las cosas.

«After all, when you're in love, you want to tell the world. The idea that scientist shouldn't talk about their science to the public seems to me bizarre.»

Carl Sagan, 1994

Agradecimientos académicos

El presente trabajo fue financiado por el proyecto PAPIIT 202016 a cargo del Dr. Alejandro Ocegüera-Figueroa.

Al proyecto PAPIIT 202016 por la beca otorgada durante la realización de este proyecto.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Ciencias y la Instituto de Biología, por todo lo brindado a lo largo de mi formación académica y por lo que viene en el futuro.

Al Dr. Alejandro Ocegüera-Figueroa por su esfuerzo, dedicación, ingenio, tutoría y apoyo en la realización de este trabajo y por el interés mostrado en mi superación académica.

A la M. en C. Berenit Mendoza-Garfias por el apoyo para la toma de micrografías en el MEB y por todo el tiempo que ha dedicado a mi crecimiento profesional.

A la Dra. Reyna Lara-Martínez por darse tiempo de revisar mi trabajo y siempre estar pendiente de mis avances.

Al Esp. Mic. Elec. Marco Antonio González Jiménez por su paciencia y apoyo durante la especialidad.

Al Biól. Armando Zepeda Rodríguez por todo el apoyo brindado dentro y fuera del aula, por transmitir el conocimiento de la forma más acertada, eres un excelente maestro, infinitas gracias.

A la M. en C. Silvia Juárez por el apoyo técnica durante la especialidad.

Al Dr. Luis Felipe García-Jiménez por el apoyo durante la realización de este trabajo.

Al Biól. Marco David Ornelas-Cruces por darse el tiempo de revisar este trabajo y por los comentarios tan acertados.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	6
OBJETIVOS	8
OBJETIVO GENERAL	8
OBJETIVOS PARTICULARES	8
MATERIAL Y MÉTODO	9
RECOLECTA	9
PROCESAMIENTO DEL MATERIAL	9
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)	9
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET)	10
BIOLOGÍA MOLECULAR	12
EDICIÓN DE SECUENCIAS	12
CONSTRUCCIÓN DE ÁRBOLES FILOGENÉTICOS	13
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	14
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN	17
BIOLOGÍA MOLECULAR	23
CONCLUSIONES	26
BIBLIOGRAFÍA	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de <i>Haementeria ghilianii</i>	1
Figura 2. Esquema de la distribución de aparatos reproductores de <i>Helobdella atli</i>	2
Figura 3. Estrategias reproductivas.....	3
Figura 4. Esquema general de la morfología de <i>Placobdella ringueleti</i>	5
Figura 5. <i>Placobdella ringueleti</i>	10
Figura 6. Muestra de bacterioma incluida en resina Epon 812.....	11
Figura 7. Bacterioma de <i>Placobdella ringueleti</i>	14
Figura 8. Zona central del bacterioma.....	15
Figura 9. Zona más cercana al esófago de <i>Placobdella ringueleti</i>	15
Figura 10. Microvellosidades del bacterioma de <i>Placobdella ringueleti</i>	16
Figura 11. Micrografía electrónica de transmisión del bacterioma de <i>Placobdella ringueleti</i>	17
Figura 12. Micrografía electrónica de las bacterias.....	18
Figura 13. Micrografía electrónica del baceterioma.....	19
Figura 14. Micrografía electrónica que muestra la doble membrana de las bacterias y el citoplasma de una célula que rodea los sacos.	20
Figura 15. Micrografía del bacterioma.....	21
Figura 16. Microvellosidades.....	22
Figura 17. Neighbor joining de Alphaproteobacterias.....	24
Figura 18. Consenso estricto de cuatro árboles más parsimoniosos para Alphaproteobacterias mediante bootstrap.....	25

RESUMEN

Las sanguijuelas hematófagas que se alimentan única y exclusivamente de sangre y han tenido que establecer relaciones simbióticas con organismos capaces de proveerlos de nutrientes ausentes o poco abundantes en su alimento como lo es la vitamina B. En el caso de las sanguijuelas de la familia Glossiphoniidae, se ha demostrado que tres linajes de sanguijuelas se han asociado independientemente con tres grupos distintos de Proteobacterias. Las sanguijuelas del género *Placobdella*, se encuentran asociadas con Alphaproteobacterias. La relación simbiótica entre bacterias y sanguijuelas presenta características particulares que las hacen de gran interés biológico. Las bacterias se encuentran alojadas en un tipo de células particulares llamadas bacteriocitos, los cuales forman órganos bien definidos llamados bacteriomas. En las especies del género *Placobdella*, los bacteriomas presentan forma de saco y se conectan directamente con el esófago. Las bacterias asociadas a *Placobdella* fueron reconocidas como un grupo nuevo de bacterias las cuales fueron llamadas *Reichenowia* y al parecer únicamente se encuentran en los bacteriomas de las distintas especies de *Placobdella*. En el presente proyecto se detectó la presencia de *Reichenowia* en el bacterioma de *Placobdella ringueleti* con ayuda de Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) y Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), logrando caracterizar y ubicar a dichas bacterias, así como establecer la posición filogenética de *Reichenowia ringueleti*, con base en secuencias del 16S bacteriano y métodos filogenéticos. Estos resultados arrojan información importante acerca de la biología de las bacterias y las sanguijuelas en general, además expone nuevos blancos de investigación para el estudio de endosimbiontes.

INTRODUCCIÓN

El Phylum Annelida (del latín *anellus* anillo y del griego *eidos* forma) incluye aproximadamente 20,000 (Aguado *et al.*, 2014) especies, entre ellas gusanos de tierra o lombrices, poliquetos tubícolas y errantes, además de sanguijuelas o hirudíneos (Brusca & Brusca, 2003; Aguado-Molina *et al.*, 2014; Brusca *et al.*, 2016). De manera general, los anélidos se caracterizan por presentar el cuerpo segmentado y por la repetición de estructuras externas e internas a lo largo del cuerpo, condición conocida como metamerismo (Brusca & Brusca, 2003; Brusca *et al.*, 2016). Sin embargo, en algunos grupos que previamente no eran considerados como anélidos como Echiura, Pogonophora y Vestimetifera, esta condición se encuentra altamente modificada, mientras que en Sipuncula se encuentra ausente (Struck *et al.*, 2007; Edgecombe *et al.*, 2011).

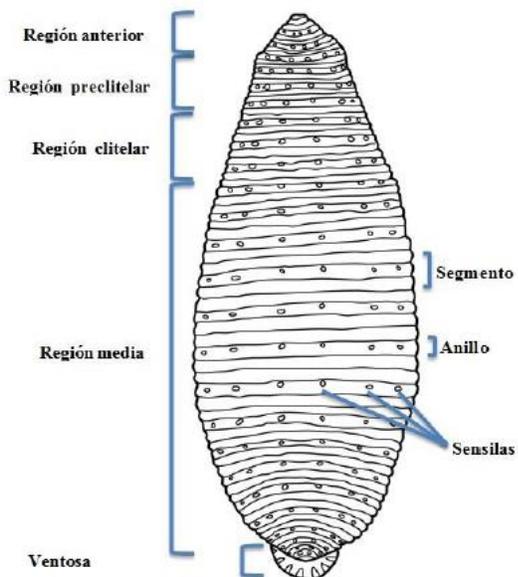


Figura 1. Esquema de *Haementeria ghilianii*. Se observan algunas estructuras del plano corporal básico (Modificado de de Salas-Montiel, et al., en prensa).

Las sanguijuelas pertenecen al orden Hirudinida Lamarck, 1818; que junto con Oligochaeta, Branchiobdellida, y Acanthobdellida son miembros de la clase Clitellata (Siddall *et al.*, 2001), presentan en el tercio anterior del cuerpo una región glandular especializada en la secreción de ootecas llamada clitelo en el tercio anterior del cuerpo; son hermafroditas y su desarrollo es de tipo directo, es decir, sin etapas larvianas (Rouse & Fauchald, 1995). A diferencia de otros clitelados, los hirudíneos presentan el cuerpo formado por 34 somitos constantes, de los

cuales, sólo 27 pueden observarse externamente, y se numeran del I al XXVII empleando números romanos. Cada uno de los somitos puede estar subdividido por anillos superficiales; el patrón general es de tres anillos, nombrándose de adelante hacia atrás como a_1 , a_2 y a_3 . Presentan dos ventosas, cada una situada en cada extremo del cuerpo, las cuales son útiles tanto para la fijación como para el desplazamiento (Figura 1), carecen de quetas y parápodos, además, presentan un celoma reducido a una serie compleja de canales por los que circula el fluido celómico (Sawyer, 1986; Brusca & Brusca 2003; Brusca *et al.*, 2016). El aparato digestivo es completo, con la boca que normalmente se abre en el centro de la ventosa

oral; la faringe es larga y muscular y se continúa con el buche, que en la mayoría de las especies, presenta proyecciones laterales o ciegos arreglados metaméricamente. El intestino es corto y desemboca en el ano localizado en la región dorsal del cuerpo cerca de la ventosa posterior. En las especies hematófagas, el buche es muy flexible y está provisto de divertículos que funcionan como almacén de alimento a largo plazo. Asimismo, presentan una pared corporal fuerte que resiste el ensanchamiento del cuerpo. El almacenamiento del alimento se lleva a cabo mediante la concentración de las células sanguíneas por eliminación del plasma y osmolitos a través de los metanefridios. Estas características son importantes debido a que las sanguijuelas pueden ingerir hasta ocho veces su peso en sangre y permanecer sin alimentarse por largos periodos (Sawyer, 1986; Brusca & Brusca, 2003; Brusca *et al.*, 2016).

Las sanguijuelas poseen un ganglio cerebroide anterodorsal que resulta de la fusión de seis ganglios nerviosos y un cordón nervioso ventral que se extiende longitudinalmente (Mann, 1962). Presentan órganos sensoriales externos y de dos a diez manchas oculares, de complejidad y disposición variable. Los órganos reproductores son complejos, con un aparato reproductor masculino provisto de entre cinco y diez pares de testisacos unidos mediante ductos espermáticos a un órgano copulador, ubicado en el gonoporo masculino a la altura del somito XI (Figura 2-A). El aparato reproductor femenino consta de un par de ovisacos laterales los cuales se extienden longitudinalmente y desembocan en el gonoporo femenino en el somito XII (Figura 2-B) (Sawyer, 1986). La excreción se realiza mediante los metanefridios asociados a los vasos circulatorios celómicos que se extienden de manera pareada a lo largo del cuerpo (Brusca & Brusca, 2003; Brusca *et al.*, 2016).

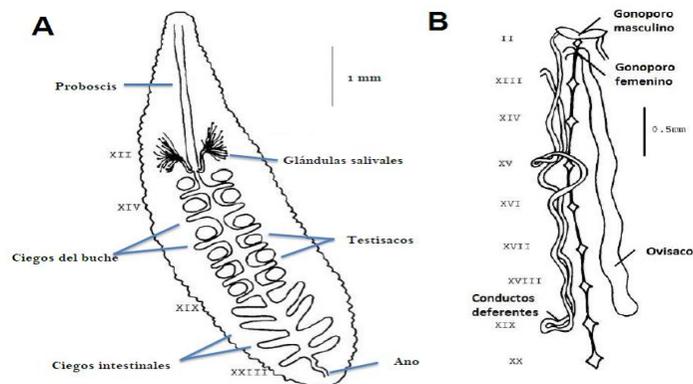


Figura 2. Esquema de la distribución de aparatos reproductores de *Helobdella atli*. (A) aparato digestivo y testisacos. (B) aparato reproductor (Modificado de Ocegüera-Figueroa & León-Règagnon, 2004).

Existen alrededor de 680 especies de hirudíneos que se distribuyen en todos los continentes excepto en la antártica (Sket & Trontelj, 2008). Aproximadamente el 70% de estos clitelados son de hábitat dulceacuícola, sin embargo se han descrito especies marinas y terrestres (Sawyer, 1986; Apakupakul *et al.*, 1999). Algunas especies de la familia Glossiphoniidae muestran una amplia diversidad de estrategias relacionadas con el cuidado parental (Figura 3-A) (Kutschera & Wirtz, 2001) y la puesta de ootecas (Mason *et al.*, 2005). La fertilización es cruzada y puede consistir en la implantación hipodérmica de espermátóforos en la superficie corporal de la sanguijuela (Salas-Montiel *et al.*, en prensa) (Figura 3-B) o bien por la inserción del pene en una vagina bien desarrollada (Siddall *et al.*, 2006).

Contrario a la idea generalmente aceptada, la mayoría de las sanguijuelas son depredadoras de invertebrados de cuerpo blando como oligoquetos y pequeños moluscos (Davies *et al.*, 1981). Cerca del 30% del total de las especies descritas son hematófagas, parásitas de vertebrados, siendo la hemoglobina su principal fuente de energía (Sawyer, 1986; Sket & Trontelj, 2008). El resto son liquidosomatófagas, es decir, se alimentan de fluidos internos y tejidos blandos de moluscos u otros anélidos (Sket & Trontelj, 2008; Ocegüera-Figueroa, 2010). De acuerdo con estudios realizados por Borda & Siddall (2004) el último ancestro común de los hirudíneos debió ser hematófago, una condición que se perdió independientemente en al menos cinco ocasiones.

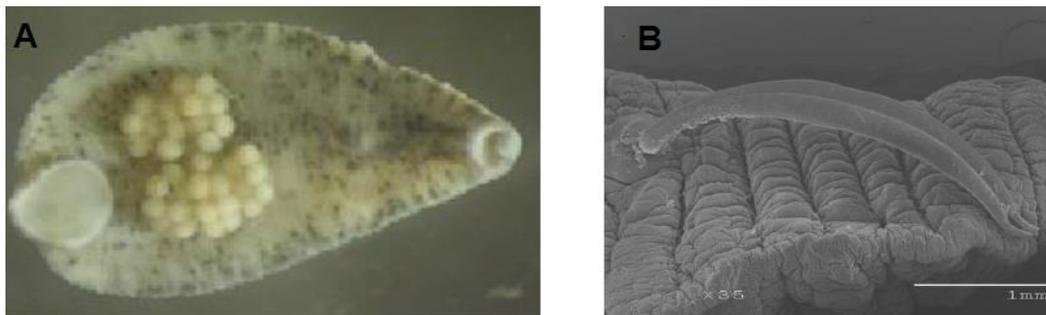


Figura 3. Estrategias reproductivas. (A). Vista ventral de *Helobdella virginiae* Ocegüera-Figueroa, 2007, mostrando un grupo de ootecas adheridas a la superficie corporal (Tomado de Salas Montiel, 2014). (B) Micrografía Electrónica de Barrido de un espermátóforo implantado en la superficie dorsal de *Haementeria officinalis* (Tomado de Salas-Montiel *et al.*, en prensa).

Se ha establecido que las sanguijuelas hematófagas producen vasodilatadores, anestésicos y anticoagulantes como parte de sus secreciones salivales. Así pueden evitar la constricción de las venas y asegurar el flujo de sangre (Salzet, 2001). Entre los

anticoagulantes destaca la hirudina, considerado como uno de los anticuagulantes más poderosos (Greinacher & Warkentin, 2008).

Las especies estrictamente hematófagas de las familias Glossiphoniidae y Piscicolidae, han desarrollado estructuras asociadas al aparato digestivo y que en su momento se consideraba contenían levaduras u hongos, por lo cual se denominaron originalmente micetomas (Buchner, 1965). Recientemente se ha establecido que, en realidad, los organismos contenidos en dichos órganos son bacterias, por lo cual, ahora llevan el nombre de bacterioma (Sawyer, 1986; Perkins *et al.*, 2005). La función de dichas bacterias se ha investigado recientemente y se sugiere que aportan a sus hospederos vitaminas ausentes en la sangre, particularmente de las vitaminas del complejo B (Manzano *et al.*, 2015). A pesar de que se han realizado avances importantes en el estudio de las relaciones simbióticas entre metazoarios y bacterias, el caso de las sanguijuelas ha sido poco estudiado, quedando diversas preguntas por resolverse, como las que se investigan en el presente trabajo.

ORGANISMO DE ESTUDIO

Placobdella ringueleti López-Jiménez & Ocegüera-Figueroa, 2009

De acuerdo con López-Jiménez & Ocegüera-Figueroa (2009), las sanguijuelas de esta especie son de forma lanceolada a ovoide, aplanadas dorsoventralmente y de tegumentos transparentes, observándose a través de ellos los ciegos del buche y otros órganos. Su color es pardo amarillento con tonalidades verdosas sobre todo a nivel de los ciegos. Los somitos completos presentan tres anillos. Posee dos pares de manchas oculares en el somito III, una ventosa oral pequeña, con la boca en el borde anterior y una ventosa posterior circular y de mayor tamaño que la ventosa anterior (Figura 4-A).

Placobdella ringueleti presenta una franja sólida longitudinal ininterrumpida en la línea media de la superficie dorsal, del somito VIII al XXVII, esta ornamentación es blanca en los somitos anteriores y en la región media y posterior del cuerpo es de color negro. El dorso está cubierto por cinco filas longitudinales de papilas de tamaño regular; la fila medial es más visible que las otras, presenta papilas en a_2 y a_3 de cada segmento desde la parte anterior hasta el ano, más evidente en los 2/3 del cuerpo. El espacio no ocupado por las papilas de tamaño regular presenta papilas pequeñas uniformemente distribuidas. El gonoporo masculino se encuentra entre los somitos XI y XII, mientras que el gonoporo femenino en el somito XII a_2/a_3 con dos anillos separando los gonoporos (Figura 4-B). El

ano se encuentra en la superficie dorsal del somito XXVII (López-Jiménez & Ocegüera-Figueroa, 2009).

Placobdella ringueleti presenta una proboscis corta que se extiende posteriormente hasta el somito IX, la proboscis es serpenteada cuando se retrae. Presentan dos pares de glándulas salivales compactas bien desarrolladas, el primer par se extiende en sentido anterior al somito VII-VIII, y el segundo par se extiende hacia la región posterior del cuerpo. El esófago es corto con un par de bacteriomas alargados en forma de saco (Figura 4-C). El aparato reproductor masculino presenta seis pares de testisacos, cada uno conecta con el conducto eferente mediante un conducto deferente corto. Los conductos eferentes, están colocados uno de cada lado del cuerpo, se ensanchan hacia el extremo anterior y forman conductos eyaculatorios musculares bien desarrollados que se unen entre si y desembocan en el gonoporo masculino. El aparato reproductor femenino es simple, presenta ovisacos bilobulados sin oviducto común y con una bifurcación (López-Jiménez & Ocegüera-Figueroa, 2009).

Placobdella ringueleti es una sanguijuela de amplia distribución geográfica, abundante en los estados de Chiapas y Oaxaca y en Centro América hasta Panamá (Ocegüera-Figueroa & León-Régagnon, 2014; Ocegüera-Figueroa & Pacheco-Chaves, 2012; Cornejo *et al.*, 2015). Es una sanguijuela estrictamente hematófaga y se alimenta principalmente de tortugas de agua dulce como *Kinosternon leucostomum*, *Dermatemys mawii* y *Staurotypus triporcatus* (López-Jiménez & Ocegüera-Figueroa, 2009).

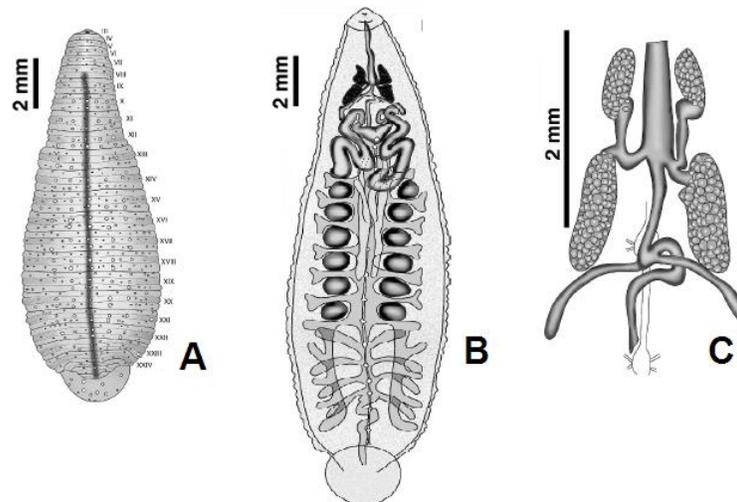


Figura 4. Esquema general de la morfología de *Placobdella ringueleti*. (A) vista ventral, se observa la línea dorsal sólida, así como la distribución de los somitos. (B) Distribución de los órganos internos y aparato reproductor. (C) Esquema de los bacteriomas presentes en *Placobdella ringueleti* (Modificado de López-Jiménez & Ocegüera-Figueroa, 2009).

ANTECEDENTES

Las sanguijuelas hematófagas que se alimentan única y exclusivamente de sangre a menudo han establecido relaciones simbióticas con organismos capaces de proveerlos de nutrientes ausentes o poco abundantes en su alimento, como lo es la vitamina B. En el caso de las sanguijuelas de la familia Glossiphoniidae, se ha demostrado que tres linajes de sanguijuelas se han asociado independientemente con tres grupos distintos de Proteobacterias (Siddall *et al.*, 2004; Perkins *et al.*, 2005, Manzano-Marín *et al.*, 2015). El caso de las sanguijuelas de los géneros *Haementeria* y *Placobdelloides*, se encuentran asociadas con diferentes linajes de Gammaproteobacterias, mientras que las especies de *Placobdella*, objeto de este trabajo, se encuentran asociadas con Alphaproteobacterias (Siddall *et al.*, 2004; Kvist *et al.*, 2011). Por convención, las distintas formas bacterianas del género *Reichenowia* asociadas a las especies de *Placobdella* se denominan de acuerdo a la especie con la que se encuentran asociadas. Por lo tanto a la bacteria simbionte de *Placobdella parasítica*, se le denomina *Reichenowia parasítica*; por lo tanto al endosimbionte de *Placobdella ringueleti* lo denominamos *Reichenowia ringueleti*. La posición filogenética de estas bacterias en los trabajos de Perkins *et al.*, (2005) fue realizada con base en la información del RNA ribosomal 16S, que es un componente de los ribosomas de los eucariontes y ha funcionado como un código de barras bacteriano (Lebonah *et al.*, 2014). Gracias al análisis genómico de las bacterias simbiontes de las sanguijuelas, recientemente se ha podido dilucidar su función y se ha establecido que colaboran activamente en la producción de vitamina B (Kvist *et al.*, 2011; Manzano-Marín *et al.*, 2015).

La relación simbiótica entre bacterias y sanguijuelas presenta características particulares que las hacen de gran interés biológico. Las bacterias se encuentran alojadas en un tipo de células particulares llamadas bacteriocitos, de ahí que se denomine a la bacteria como endosimbionte. Los bacteriocitos forman órganos conspicuos llamados bacteriomas. En las especies del género *Placobdella*, los bacteriomas presentan forma de saco y se conectan directamente con el esófago (Oceguera-Figueroa, 2012). Las bacterias asociadas a *Placobdella* fueron reconocidas como un grupo nuevo de bacterias las cuales fueron llamadas *Reichenowia* (Siddall *et al.*, 2004; Perkins *et al.*, 2005; Kvist *et al.*, 2011) y al parecer únicamente se encuentran en los bacteriomas de las distintas especies de *Placobdella*. Mediante estudios de microscopía electrónica de transmisión y de hibridación *in situ* fluorescente (FISH por sus siglas en inglés) se ha logrado caracterizar y localizar dichas bacterias en sanguijuelas adultas (Perkins *et al.*, 2005).

Asimismo, existe la hipótesis de que las bacterias son heredadas de manera vertical de una generación a otra de sanguijuelas mediante un mecanismo de transporte que no ha sido plenamente identificado. De igual forma, la presencia de bacterias en estadios de desarrollo temprano de las sanguijuelas como cigoto, solamente ha sido sugerida sin que a la fecha se haya demostrado (Siddall *et al.*, 2004; Perkins *et al.*, 2005).

Siddall *et al.*, (2004) describieron el bacterioma de *Placobdella parasítica*, una especie que se distribuye en Canadá y norte de EUA; observando que consta de una sola capa de células epiteliales soportada por una delgada lámina basal. Las células epiteliales, en algunos casos, se encuentra precipitada y el lumen del bacterioma presentaba estructuras en forma de barra que parecían haber sido liberadas por el epitelio dañado. Con la ayuda de microscopía electrónica de transmisión se demostró que el espacio citoplasmático de la mayoría de las células epiteliales del bacterioma se llena casi por completo de bacterias intracelulares en forma de barra. Las bacterias presentan doble envoltura celular típica de bacterias Gram negativas y un citoplasma floculante. Los extremos terminales de cada bacteria presentan un espacio electrolúcido. Los bacteriomas albergan células epiteliales, varias mitocondrias y microvellosidades sólidas dirigidas a la luz del bacterioma; además de densos gránulos de secreción.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Colaborar con el entendimiento de las relaciones simbióticas entre sanguijuelas estrictamente hematófagas con sus bacterias endosimbiontes.

OBJETIVOS PARTICULARES

Localizar mediante Microscopía Electrónica de Transmisión, la presencia de bacterias *Reichenowia ringueleti* en los bacteriomas de ejemplares adultos de *Placobdella ringueleti*.

Describir la ultraestructura del bacterioma de *Placobdella ringueleti* con ayuda de técnicas de Microscopía Electrónica de Transmisión y Microscopía Electrónica de Barrido.

Establecer la posición filogenética de *Reichenowia ringueleti*, bacteria endosimbionte de *Placobdella ringeleti* con base en secuencias del 16S bacteriano y métodos filogenéticos.

MATERIAL Y MÉTODO

RECOLECTA

La recolecta se realizó en el mes de Julio del 2015, en el Zoológico Miguel Álvarez del Toro, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México (16°43'25"N; 93°5'45' O); situado en la reserva ecológica "El Zapotal".

Las sanguijuelas fueron encontradas en un estanque artificial con tortugas de agua dulce (*Kinosternon leucostomum*, *Dermatemys mawii* y *Staurotypus triporcatus*), la recolecta manual buscando debajo de rocas dentro del estanque; las sanguijuelas fueron colocadas en recipientes de plástico con agua del medio para su traslado al laboratorio.

Una vez en el laboratorio, fueron colocadas en un acuario con condiciones ambientales similares al medio natural en el "laboratorio húmedo" del Instituto de Biología, UNAM. Las sanguijuelas fueron alimentadas dos veces, la primera en el mes de octubre de 2015 y la segunda en el mes de febrero de 2016 con una tortuga del género *Kinosternon*.

PROCESAMIENTO DEL MATERIAL

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

Un ejemplar adulto de *Placobdella ringueleti* fue diseccionado con el fin de extraer los bacteriomas (Figura 5); los bacteriomas fueron colocados en un tubo Eppendorf con una solución fijadora de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 2.5% en solución buffer de fosfatos (PBS) al 0.1 M y pH 7.2, durante 24 horas, una vez transcurrido el tiempo, se realizaron tres lavados de cinco minutos cada uno con PBS. Posteriormente la muestra fue deshidratada en etanoles graduales (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 96%) por diez minutos cada uno, finalmente se realizaron dos cambios en etanol absoluto durante diez minutos y la muestra fue desecada por punto crítico con CO₂.

La muestra fue cortada en tres secciones transversales y montada en un portamuestras de aluminio adherido mediante una etiqueta de carbón, con pegamento en ambas caras, el recubrimiento de la superficie se realizó por evaporación de una mezcla de oro-paladio con ayuda de un metalizador Emitech K550. Finalmente la muestra se observó en un microscopio electrónico de barrido de la marca Hitachi S2460N con su sistema de registro de imágenes.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET)

Tres ejemplares de *P. ringueleti* adultos fueron diseccionados con el fin de extraer los bacteriomas; éstos bacteriomas fueron colocados de manera independiente en tubos Eppendorf con una solución fijadora de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 2.5% en PBS 0.1 M y pH 7.2 por 24 horas, una vez transcurrido el tiempo, se realizaron tres lavados de cinco minutos cada uno con PBS. Posteriormente las muestras fueron postfijadas con tetraóxido de osmio al 1% durante una hora; transcurrido el tiempo, se realizaron tres lavados durante cinco minutos en PBS.

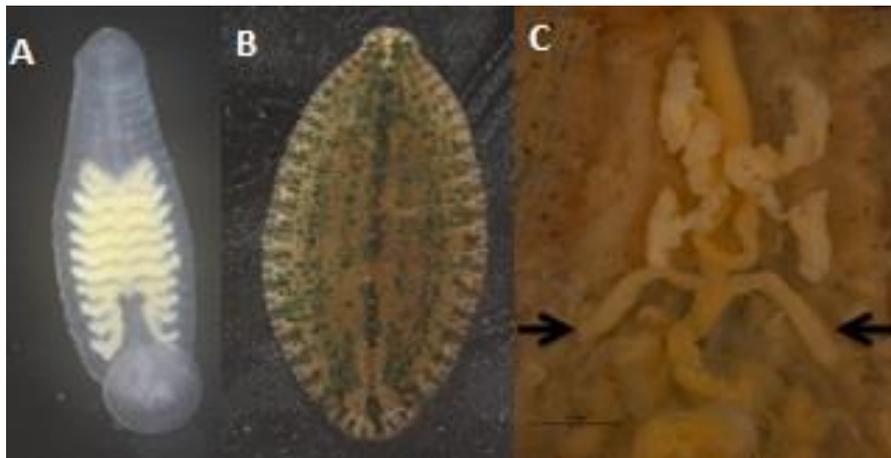


Figura 5. *Placobdella ringueleti* (A) Cría. (B) Ejemplar adulto. (C) Aparato digestivo anterior. Las flechas señalan los bacteriomas en forma de sacos.

La deshidratación de la muestra se llevó a cabo en etanoles graduales (30, 50, 70, 80 y 96%) durante diez minutos cada uno, para concluir la deshidratación, se realizaron dos cambios en etanol absoluto, durante diez minutos cada uno. Posteriormente, fueron inmersos tres veces en el solvente intermediario óxido de propileno durante 10 minutos cada vez.

Para llevar a cabo la infiltración de la muestra, los bacteriomas fueron preincluidos en diferentes mezclas de óxido de propileno y resina Epon 812 por 24 horas a temperatura ambiente en cada una de ellas. Las diluciones utilizadas fueron las siguientes: 4:1, 3:1, 2:1 y 1:1, transcurridas las últimas 24 horas de preinclusión los tubos se destaparon para la evaporación del óxido de propileno. La inclusión se realizó en resina pura Epon 812, utilizando moldes de silicón que fueron polimerizados a 60°C durante 48 horas (Figura 6).

Los bloques con las muestras de bacteriomas incluidos fueron trabajados en un ultramicrotómo modelo Ultracut R de la marca Leica, obteniendo cortes ultra-finos (40-90

nm) y semi-finos (200-600 nm). A cada uno de los bloques se le talló una pirámide con navajas de doble filo y navajas afeitar nuevas y de doble filo de la marca Dorco, para exponer el lugar donde se localizaban los bacteriomas.

De cada uno de los bloques se obtuvieron cortes semifinos de 200 a 250 nm de grosor utilizando cuchillas de vidrio. La preparación de las cuchillas fue de la siguiente forma: se colocó una barquilla hecha de cinta adhesiva que es llenada con agua en la cual, los cortes realizados por el ultramicrotomo flotan en la interfase del aire y agua en donde se mantienen en suspensión dentro de la barquilla. Estos cortes son levantados con la ayuda de un asa de cobre,



montados en portaobjetos de vidrio y fijados con calor para ser teñidos con Azul de Toluidina al 1%, la cual se realizó agregando una gota del colorante sobre la muestra fijada

Figura 6. Muestra de bacterioma incluida en resina Epon 812

para calentar por debajo del portaobjetos por dos segundos, contrastando así la muestra, el excedente del colorante fue lavado con agua destilada, se dejaron secar a temperatura ambiente y fueron observados al microscopio óptico de campo claro de la marca Zeiss modelo Axiostar con un objetivo de 10X y 40X, con el fin de detectar la zona de interés y realizar el retallado de la pirámide para tener una superficie de corte más pequeña.

Los cortes ultrafinos (30-90nm) se obtuvieron de las pirámides retalladas, con ayuda de una cuchilla de diamante de la marca DiATOME, los cortes fueron extraídos de la barquilla de la cuchilla con rejillas de cobre de 200 mesh y cubiertas con membrana de collodion. Los cortes secos se contrastaron flotando la rejilla en una gota de acetato de uranilo al 4%, durante 20 minutos, en una cámara húmeda protegida de la luz. Se lavaron por goteo con agua destilada. Posteriormente las rejillas fueron flotadas sobre una gota de citrato de plomo al 0.35% por 10 minutos en una cámara húmeda en presencia de hidróxido de sodio (NaOH) para crear una cámara libre de CO₂; se realizó un lavado final por goteo con agua destilada. Se dejaron secar a temperatura ambiente para su observación.

Las rejillas fueron observadas en un Microscopio Electrónico de Transmisión de la marca JEOL, modelo JEM 1010a operado a 80kV, equipado con una cámara CCD modelo Gatan Orius SC600 y su sistema digital para el registro de las imágenes.

BIOLOGÍA MOLECULAR

Los bacteriomas de tres ejemplares adultos de *Placobdella ringueleti* fueron diseccionados mediante un corte longitudinal medio en la superficie dorsal. Dichos órganos fueron colocados en tubos Eppendorf por ejemplar y se digirieron en una mezcla de buffer y proteinasa K. En el Laboratorio Nacional de Biodiversidad del Departamento de Zoología del Instituto de Biología, UNAM, se llevó a cabo la extracción y purificación de DNA total (bacteria y sanguijuela) utilizando el protocolo del DNeasy Blood & Tissue Kit fabricado por QIAGEN®.

Usando la muestra de DNA purificado de cada individuo, se amplificó un fragmento del gen 16S rRNA mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando los primers universales BSF8/20 y BSR1541/20. Cada tubo de reacción contenía 0.15 µl de *Taq* polimerasa, 3 µl de buffer 5X, 0.3 µl de cada uno de los primers y 2 µl de DNA. Esto se llevó a un volumen total de 15 µl con agua estéril. La reacción de amplificación se realizó en una termocicladora Arktik™ Thermal Cycler (ThermoFisher Scientific) siguiendo el siguiente perfil térmico: 5 minutos a 94°C seguidos de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 53°C y 90 segundos a 72°C, con una extensión final de 10 minutos a 72°C. El producto de PCR fue enviado al Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud del Instituto de Biología, UNAM para la obtención de secuencias de DNA utilizando un secuenciador de capilares. Las reacciones de secuenciación se realizaron empleando los *primers* BSF8, BSF1099, BSF517, BSR534, BSR1492 y BSR1541.

EDICIÓN DE SECUENCIAS

La edición de secuencias se realizó de manera manual en el programa Geneious 5.1.7 (Biomatters Ltd. Auckland, New Zealand). Se obtuvieron secuencias de Proteobacterias representativas de diversos grupos, disponibles en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, Fecha de acceso 30-08-2016) con el fin de realizar un análisis comparativo de las secuencias aquí generadas. Se utilizó como grupo externo a *Rhodobacter sphaeroides*. Se conformó una matriz de 41 terminales la cual fue alineada en el programa MUSCLE (Edgar, 2004).

CONSTRUCCIÓN DE ÁRBOLES FILOGENÉTICOS

La matriz de datos que incluye secuencias del rRNA 16S de diversos grupos de Gammaproteobacterias, incluyendo las generadas en el presente trabajo y obtenidas de bacterias endosimbiontes de la sanguijuela *Placobdella ringueleti*, fue analizada bajo dos criterios: Análisis de Neighbor Joining empleando el algoritmo K2P en el programa PAUP* (Swofford, 2002). Adicionalmente se realizó un análisis de parsimonia en el programa TNT (Goloboff et al., 2008) empleando los algoritmos de "New Technology Search". Los valores de Bootstrap fueron calculados en TNT realizando 100 pseudoreplicas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Las micrografías electrónicas de barrido nos muestran que el bacterioma de *Placobdella ringueleti* es un saco simple (Figura 7), la luz del bacterioma es de forma oval y al igual que *Placobdella parasitica* sólo se observa una capa de células epiteliales soportada por una lámina basal (Figura 8 y 9). Esta capa de células epiteliales no presenta microvellosidades uniformes, es decir, las microvellosidades se encuentran en forma festoneada (ondas) (Figura 10).

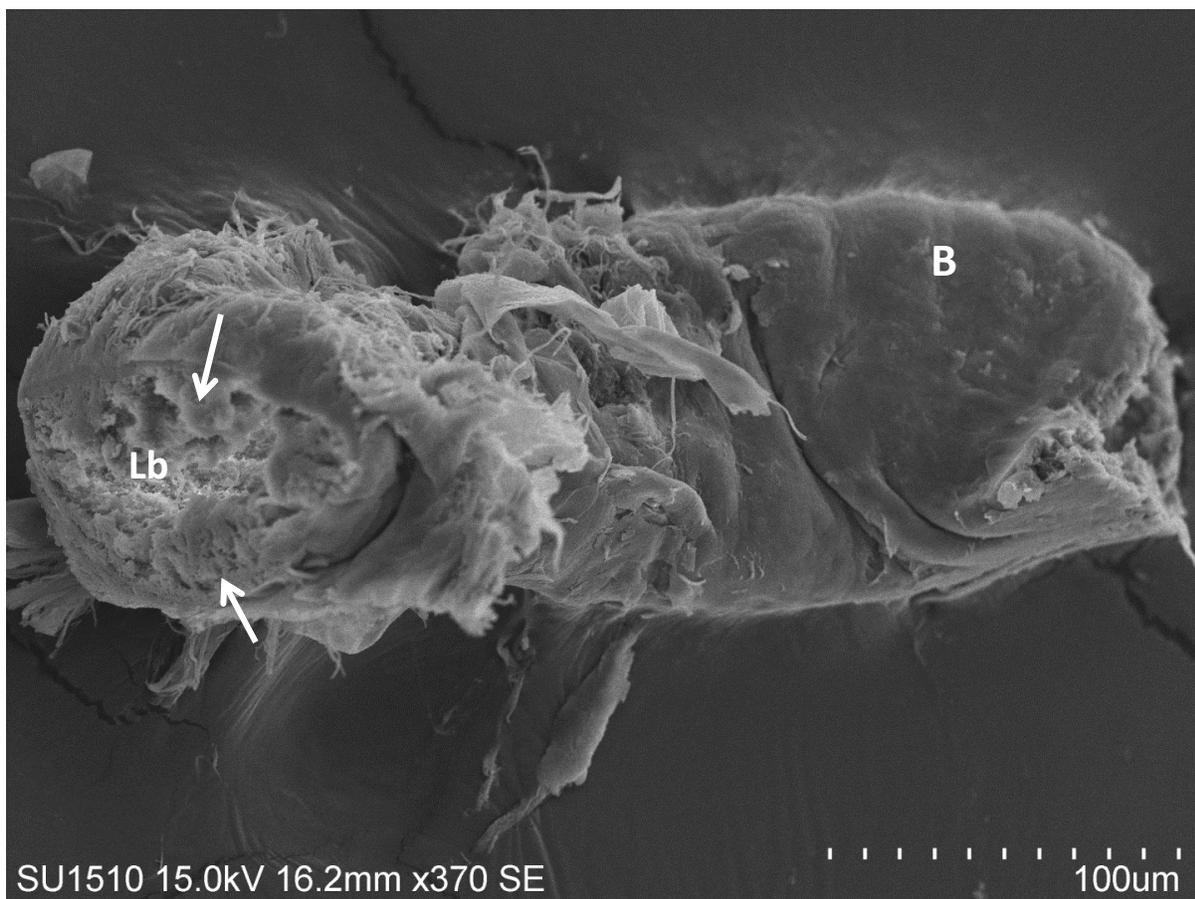


Figura 7. Bacterioma de *Placobdella ringueleti*. Extremo del bacterioma (B) se observa la luz (Lb), las flechas señalan algunas microvellosidades

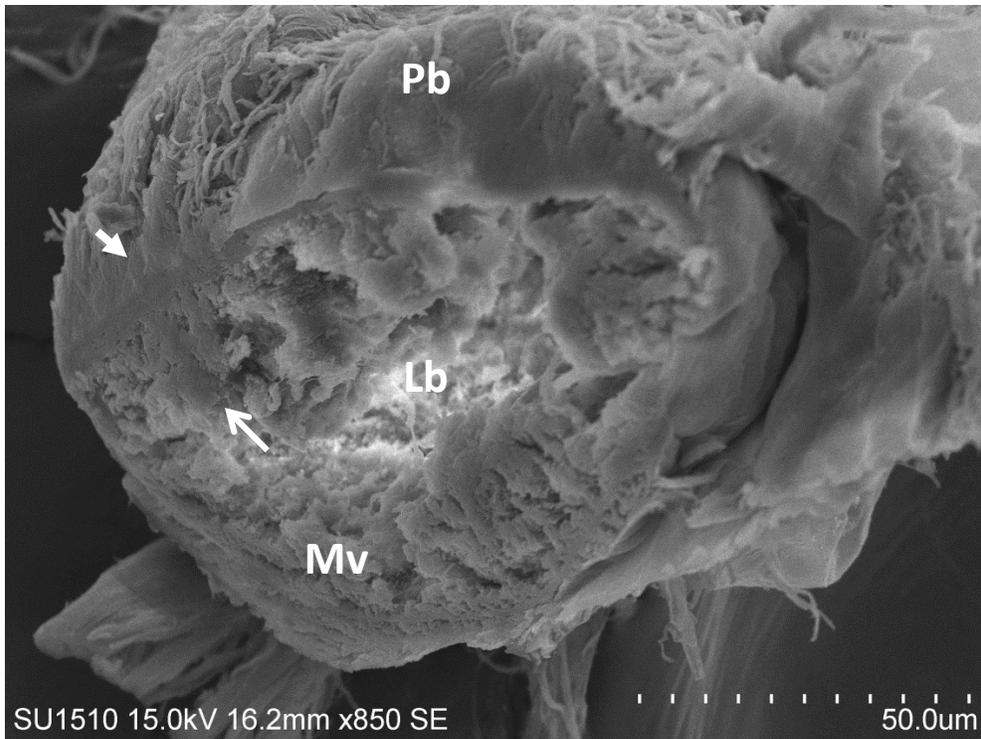


Figura 8. Zona central del bacterioma. Se observa la luz del bacterioma (Lb), algunas microvellosidades irregulares (Mv) y la pared del bacterioma (Pb). La forma del bacterioma es un saco oval con una lámina basal (flecha).

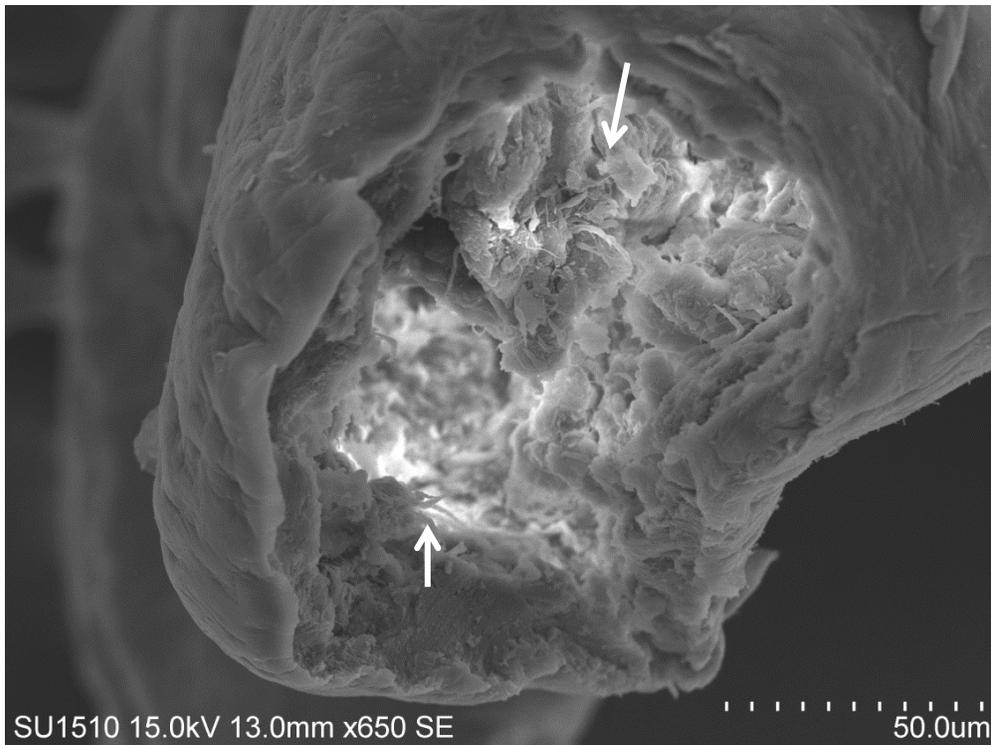


Figura 9. Zona más cercana al esófago de *Placobdella ringueleti*. Se observa la luz del bacterioma, pared del bacterioma (Pb). La flecha señala algunas microvellosidades más alargadas y delgadas que descansan en una capa de células epiteliales.

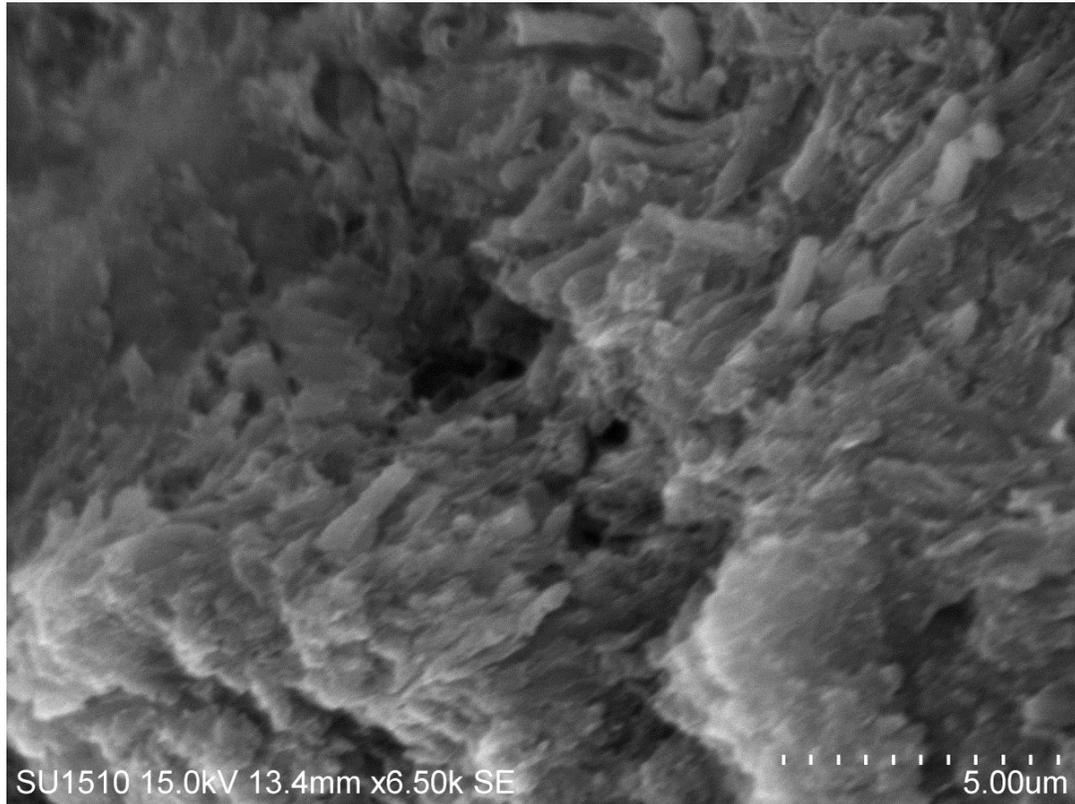


Figura 10. Microvellosidades del bacterioma de *Placobdella ringueleti*. Son de forma festonada, cortas y dispersas.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Las micrografías obtenidas con el microscopio electrónico de transmisión demuestran la presencia de bacterias endosimbionas en el bacterioma de la sanguijuela *Placobdella ringueleti* (Figura 11).

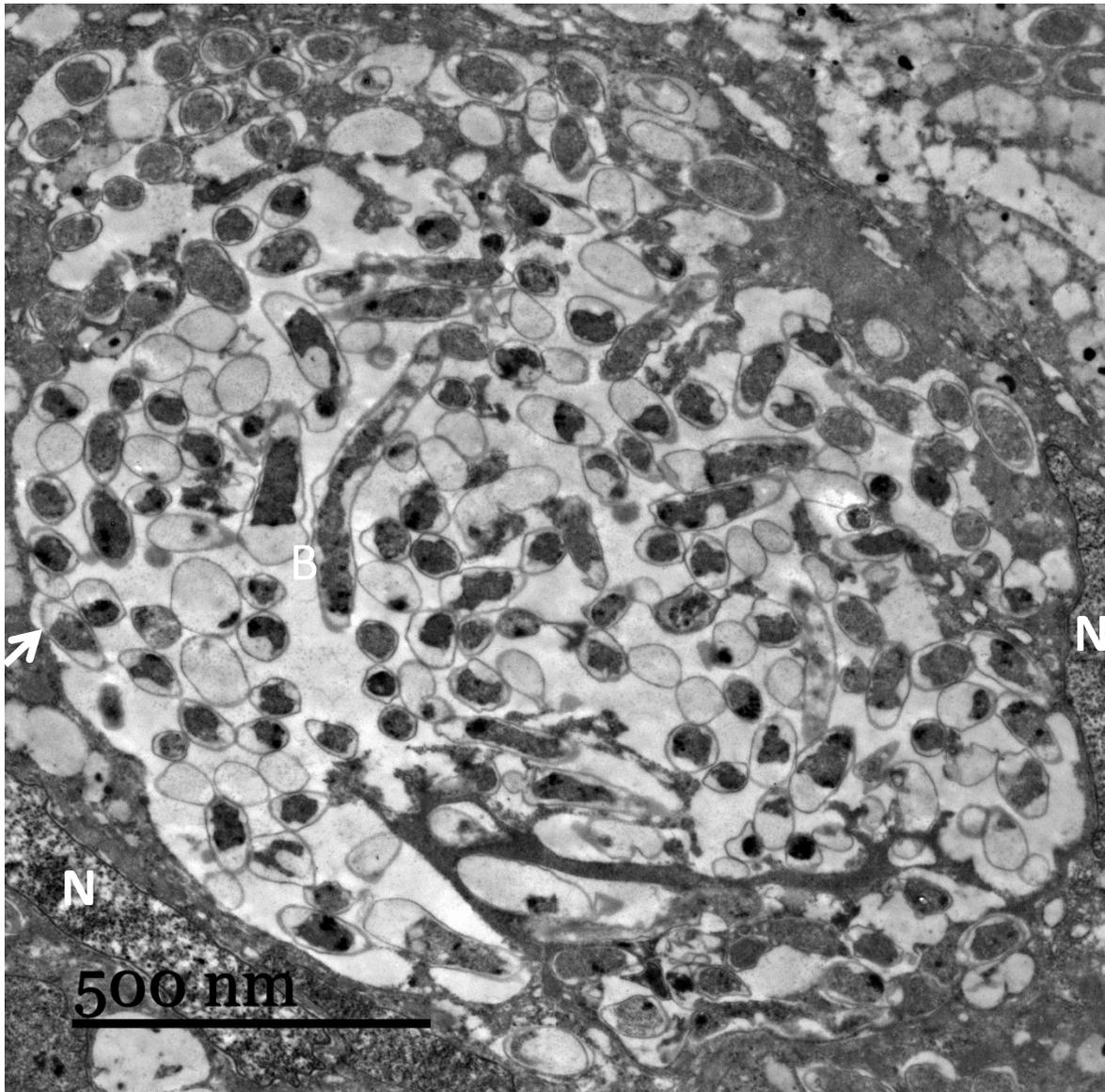


Figura 11. Micrografía electrónica de transmisión del bacterioma de *Placobdella ringueleti*. Se observa una gran cantidad de bacterias encapsuladas en una membrana formando un saco bacteriano. Bacteria (B), Núcleo celular(N), membrana del saco (flecha).

Las bacterias observadas se encuentran agrupadas en sacos dentro del bacterioma de *P. ringueleti* (Figura 12 y 13). El tamaño y forma de las bacterias es variable, ello también depende de la posición en que se realizó el corte. Las bacterias largas fueron cortadas longitudinalmente, las redondas es muy probable que se cortaron transversalmente y las intermedias tangencialmente. Pero en general se distinguen bacilos con bordes redondeados y se distinguen una o dos vacuolas por cada bacteria.

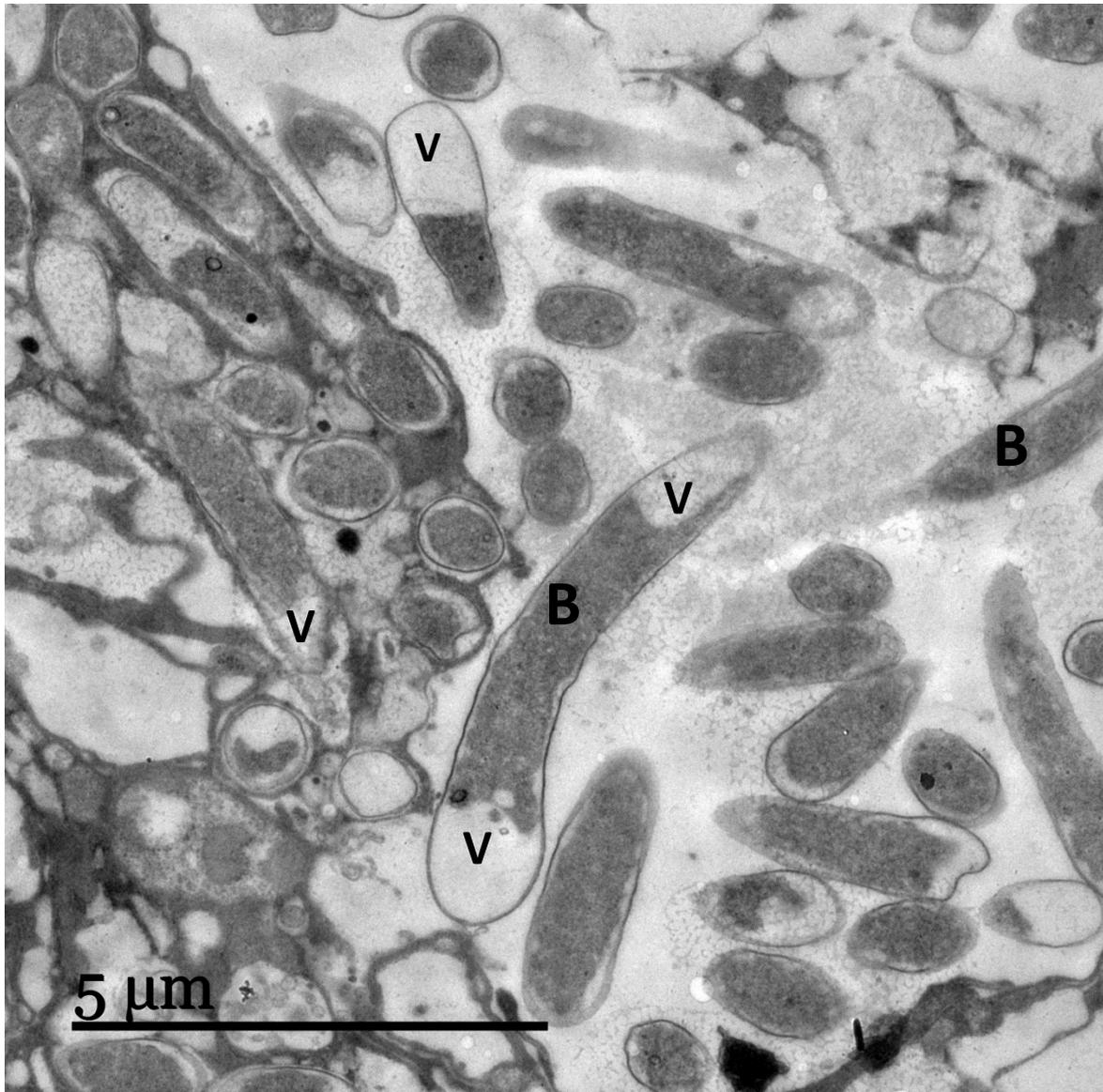


Figura 12. Micrografía electrónica de las bacterias. Se observa gran cantidad de bacterias en el saco, la forma depende en gran medida de la posición del corte pero se aprecian algunas alargadas (B) con vacuolas en los extremos (V) y otras bacterias se observan muy circulares (corte transversal) pero igualmente con al menos una vacuola.

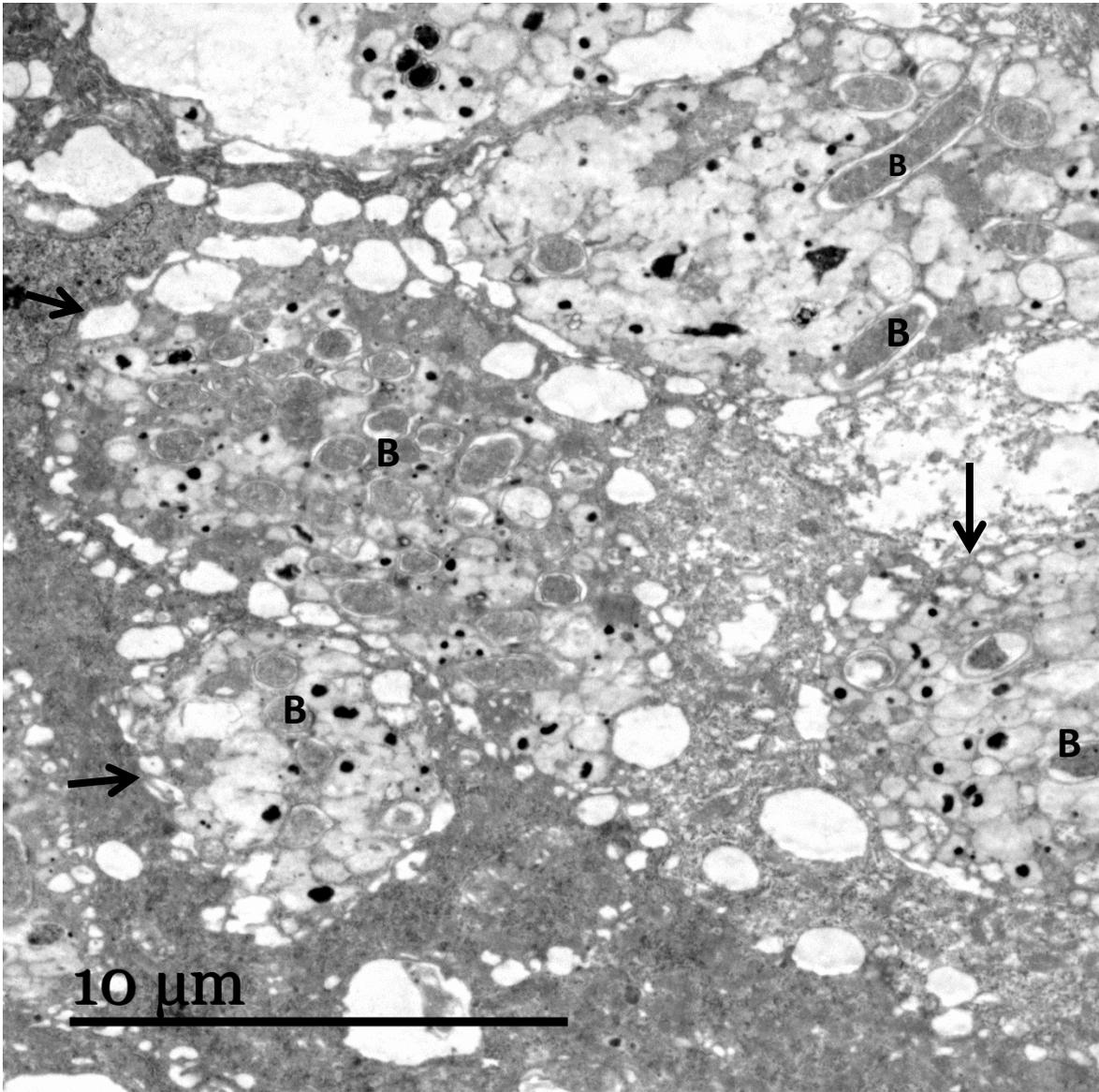


Figura 13. Micrografía electrónica del baceterioma. Se observan algunos sacos que contienen bacterias (B), las flechas señalan los sacos.

Cada bacteria posee una doble capa lipídica. Cada saco está rodeado por células que albergan núcleos celulares grandes, gran cantidad de mitocondrias y retículo endoplásmico rugoso (Figura 14).

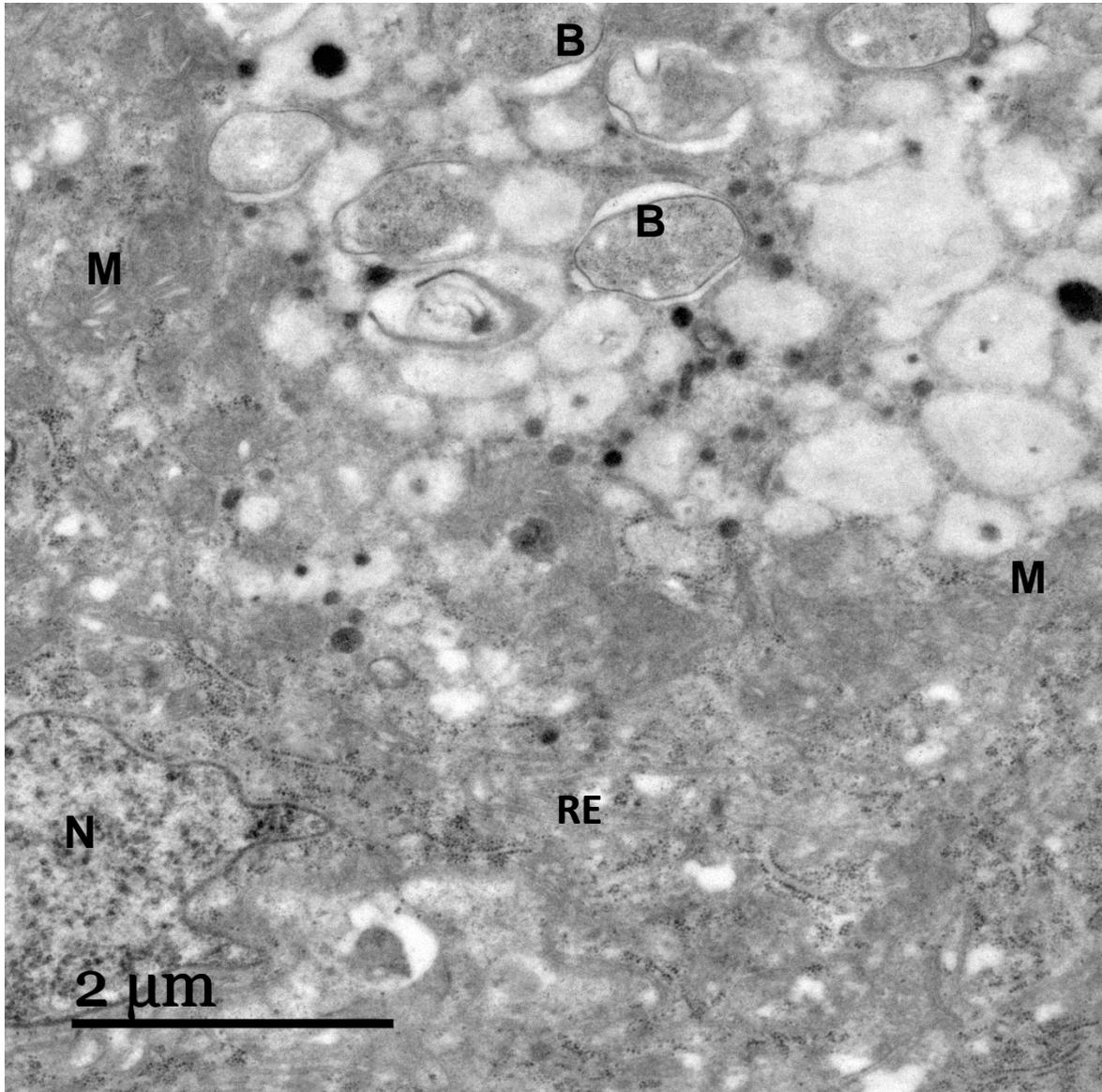


Figura 14. Micrografía electrónica que muestra la doble membrana de las bacterias y el citoplasma de una célula que rodea los sacos. Núcleo (N), mitocondria (M), Retículo endoplásmico (RE), bacteria (B).

Las células de los bacteriomas contienen una gran cantidad de lisosomas, cercanos a la zona apical (Figura 15).

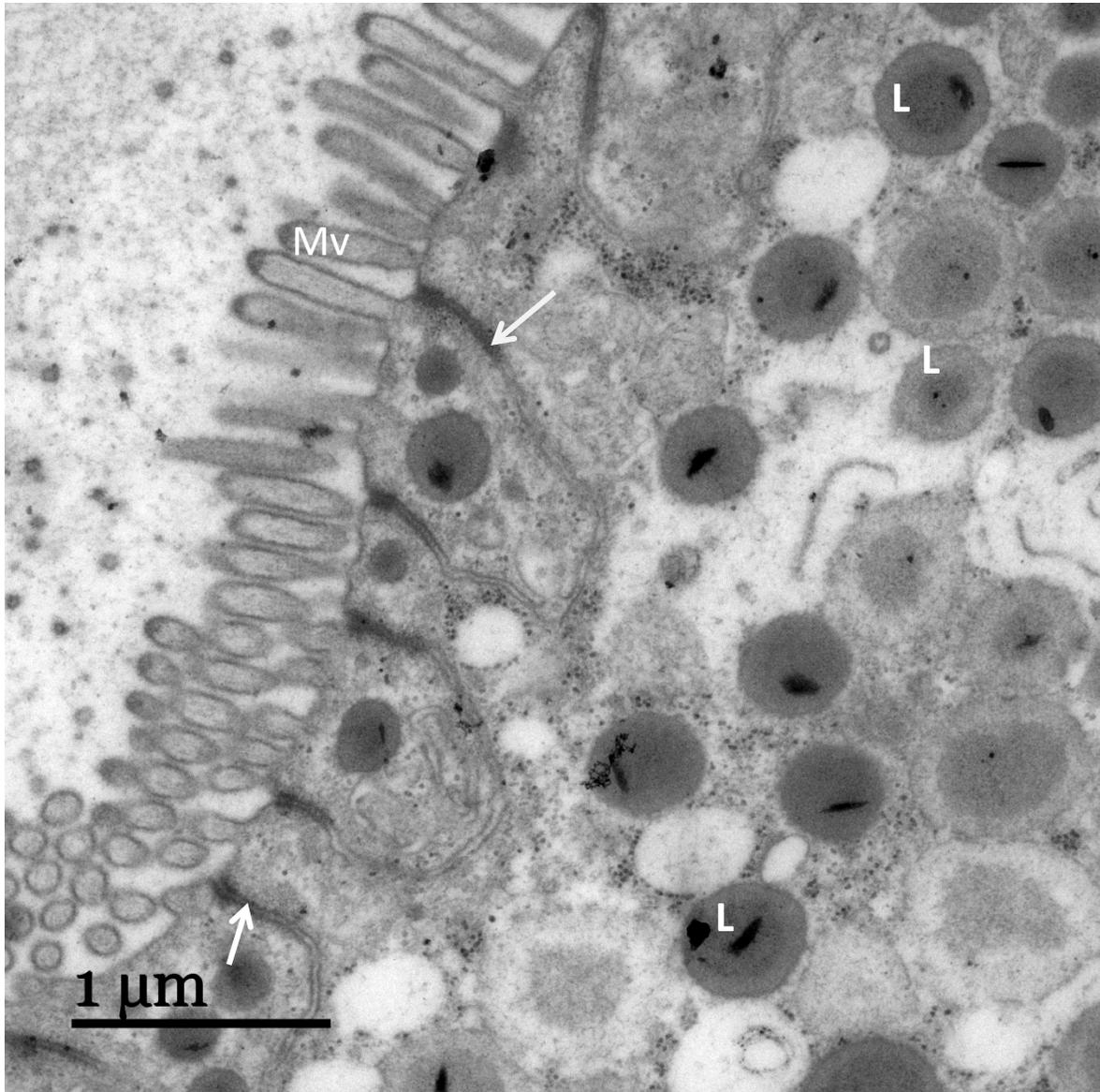


Figura 15. Micrografía del bacterioma. Se observan una gran cantidad de lisosomas con una alta actividad, así como algunas conexiones intercelulares y algunas microvellosidades. Microvellosidades (Mv), lisosomas (L), las flechas señalan algunas conexiones intercelulares.

En la luz del bacterioma se presentan una gran cantidad de microvellosidades cuya función es desconocida, sin embargo, al aumentar la superficie de intercambio de compuestos a través de ella se sugiere que tendría que estar relacionado con una alta actividad metabólica. (Figura 16), incluyendo de degradación por la cantidad de lisosomas y su tamaño.

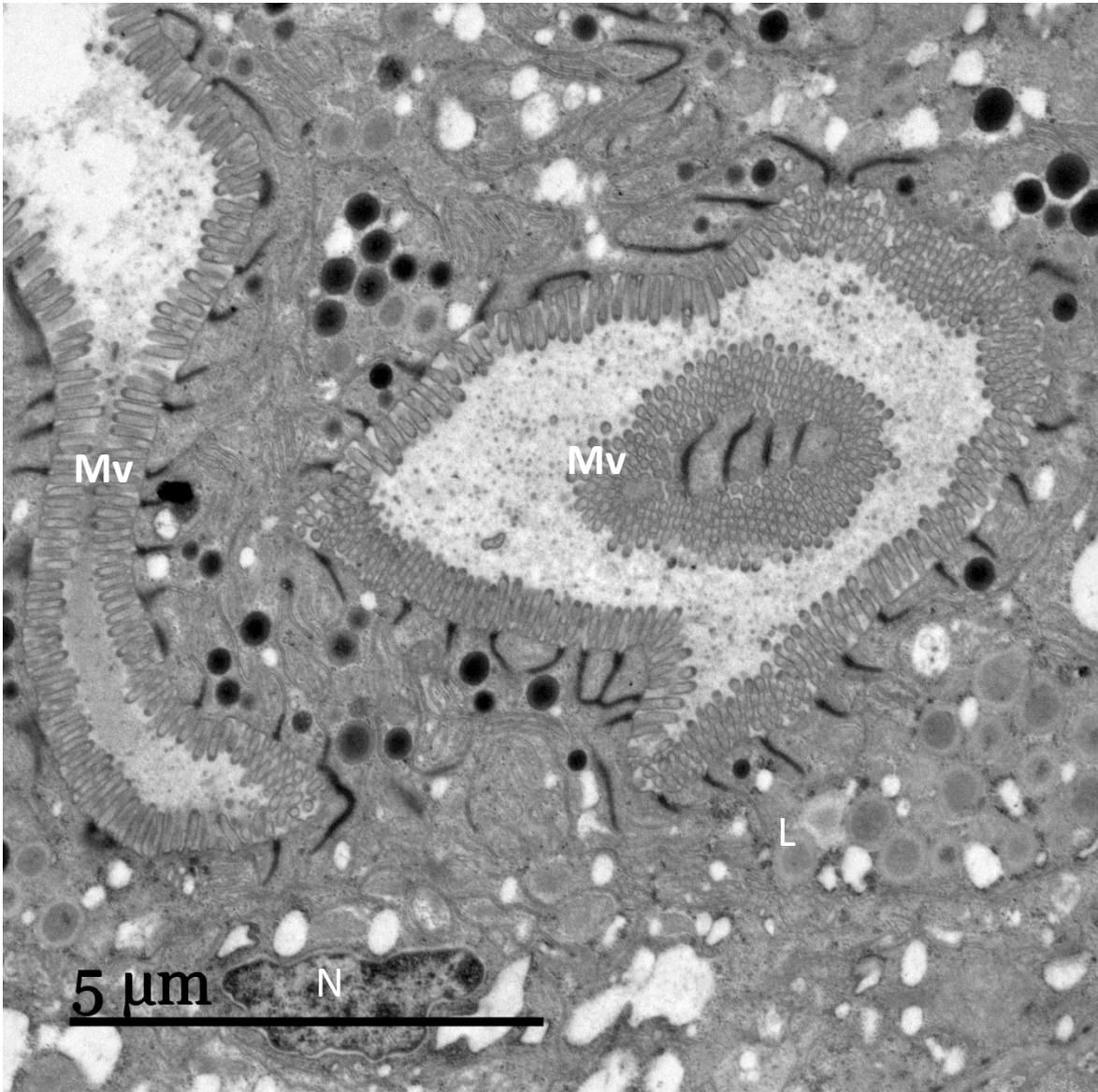


Figura 16. Microvellosidades (Mv), Lisosomas (L), Núcleo (N).

BIOLOGÍA MOLECULAR

En la figura 17 se muestra el árbol de Neighbor Joining resultado del análisis en el programa PAUP* y en la Figura 18 se presenta el árbol de consenso estricto de 4 árboles más parsimoniosos (L=842) con los valores de soporte en los nodos, obtenidos por el método de *bootstrap*. Los dos métodos resultaron en árboles similares en los que las tres muestras obtenidas en el presente trabajo (en rojo), aparecen formando un grupo junto a las otras muestras de endosimbiontes de especies de *Placobdella* (*Reichenowia picta*, *Reichenowia ornata* y *Reichenowia parasítica*). Las relaciones del resto del árbol muestran algunos cambios, sin embargo, existen similitudes en la asignación de las distintas especies de *Reichenowia* dentro de las Alphaproteobacterias. Las distancias genéticas entre las tres muestras obtenidas de *R. ringueleti* es de 0 mientras que la distancias con las otras especies de *Reichenowia* son de 2.5%

NJ

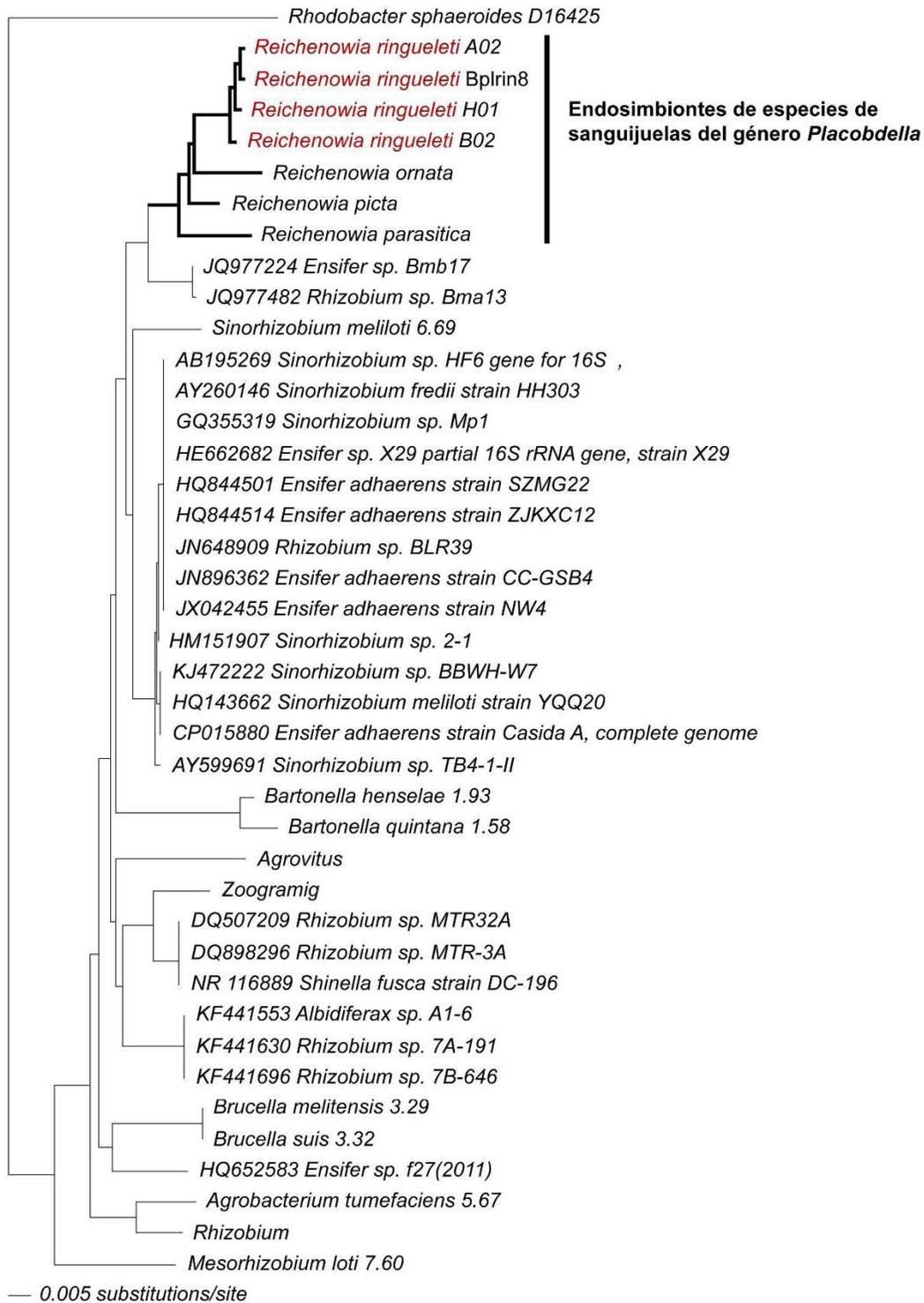


Figura 17. Neighbor joining de Alphaproteobacterias. En rojo se muestran las secuencias realizadas en el presente estudio.

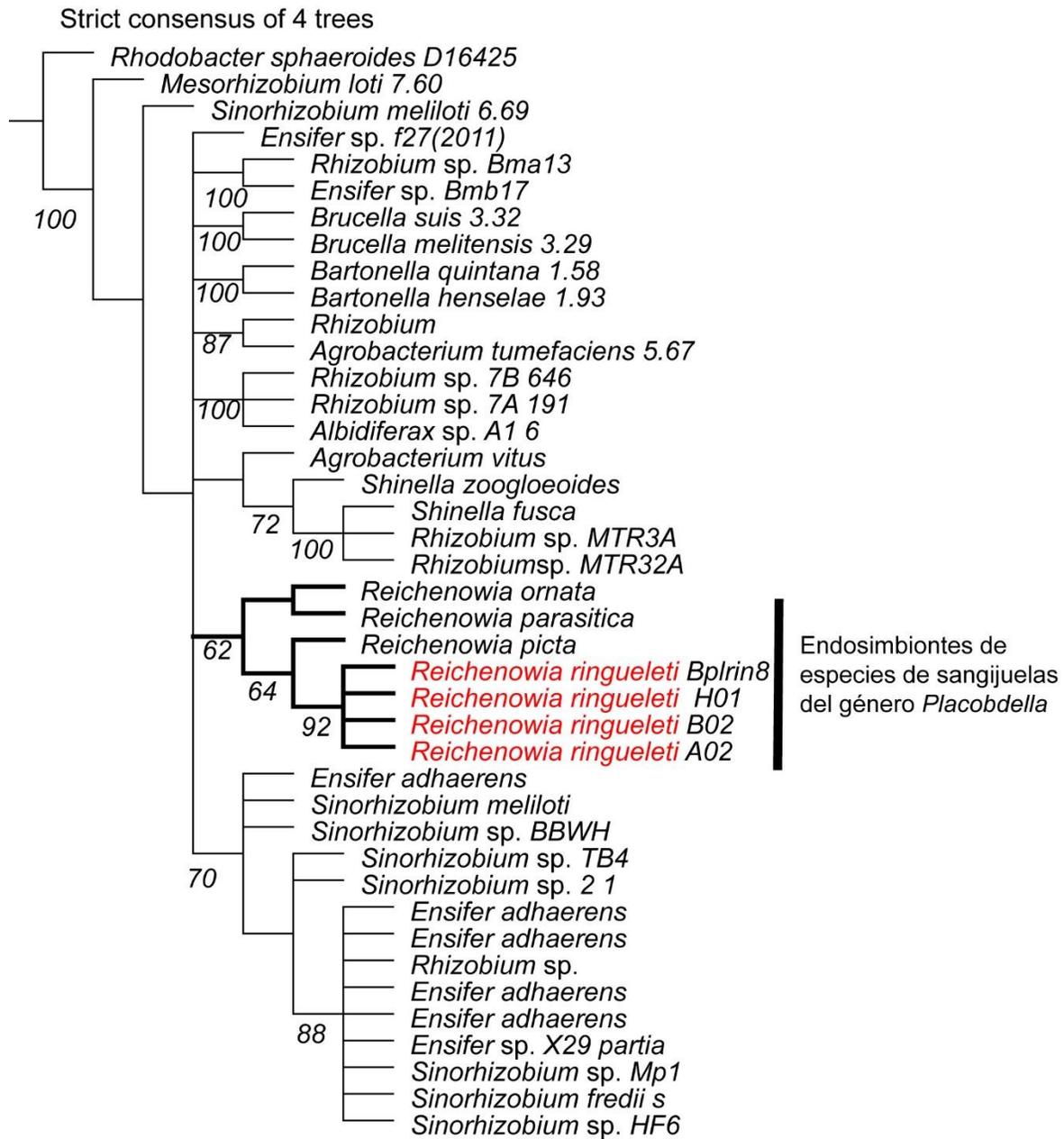


Figura 18. Consenso estricto de cuatro árboles más parsimoniosos para Alphaproteobacterias mediante bootstrap. En rojo se muestran las secuencias realizadas en el presente estudio.

CONCLUSIONES

1. Se corrobora la hipótesis de que *Reichenowia ringueleti* es simbionte intracelular mutualista de la sanguijuela *Placobdella ringueleti*.
2. Las bacterias que alberga el bacterioma son bacilos de extremos redondeados.
3. Las bacterias poseen una doble membrana (típica de estos organismos) y se distinguen de una a dos vacuolas por bacteria.
4. En *Placobdella ringueleti*, las células que rodean los sacos presentan un núcleo celular grande, mitocondrias y retículo endoplásmico abundante cercano a las bacterias, lo que indica que dichas bacterias se encuentran dentro de la célula como se había reportado para *Placobdella parasítica*.
5. El bacterioma de *P. ringueleti* presenta una alta actividad metabólica, lo cual se infiere por la presencia de lisosomas con cristalizaciones y electrodensos.
6. La evidencia disponible indica que las células del bacterioma pueden estar implicadas en la multiplicación, maduración, liberación y, eventualmente, degradación de las bacterias.
7. El mecanismo por el cual las bacterias se transfieren de un individuo a otro y la manera por la cual invaden el bacterioma son desconocidos en la actualidad.
8. El hecho de que las muestras de *Reichenowia* obtenidas de especies distintas de *Placobdella* se agrupen sugiere, contundentemente, que la asociación entre estos dos grupos ocurrió una sola vez, probablemente en el último ancestro común de las especies de *Placobdella* y el patrón que se observa es resultado de la evolución conjunta entre sanguijuelas y bacterias.

Bibliografía

- Aguado-Molina, M., M. Capa, A. Oceguera-Figueroa & G. Rouse. (2014). *Chapter 22. Annelids: Segmented worms*. (V. P. Zargoya., Ed.) Massachusetts, Estados Unidos: Sinauer Associated Inc.
- Apakupakul, K., E. Siddall & M. Bureson. (1999). Higher-level relationships of leeches (Annelida: Clitellata: Euhirudinea) based on morphology and gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 12, 350-359.
- Ayres, C. & J. Comensaña. (2008). Leech presence on Iberian Brown Frog *Rana iberica* (Amphibia: Anura: Ranidae) from north-western Spain. *Acta Herpetológica*, 3, 155-159.
- Barragán-Ramírez, J. L., A. Oceguera-Figueroa, J. D. J. Ascencio-Arrayga, F. Rodríguez-Ramírez & J. L. Navarrete-Heredia. (2013). Kinosternon integrum (Mexican mud turtle) ectoparasites. *Herpetological Review*, 44, 305-306.
- Borda, E. & M. E. Sidall. (2004). Review of the evolution of the life history strategies and phylogeny of the Hirudinida (Annelida: Oligochaeta). *Lauterbonia*, 52, 5-25.
- Brusca, R. C. & J. G. Brusca. (2003). *Invertebrates*. Massachusetts, Estados Unidos: Sinauer Associates Inc.
- Brusca, R. C., W. Moore & S. M. Shuster. (2016). *Invertebrates* (3era ed.). Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.
- Buchner, P. (1965). *Endosymbiosis of animals with plant microorganisms*. New York: John Wiley.
- Cornejo, A., A. Oceguera-Figueroa & J. Bernal-Vega. (2015). Sanguijuelas (Annelida: Clitellata) de agua dulce de Panamá: Comparación con la riqueza de especies de Centro America. *Puente Biológico*, 1, 1-13.
- Davies R. W. & N MacLoughlin. (1996). the effects of feeding regime on the growth and reproduction of the medicinal leech *Hirudo medicinalis*. *Freshwater Biology*, 36, 536-568.
- Davies, R. W., F. J. Wrona, L. Linton & J. Wilkialis. (1981). inter and intraspecific analyses of the food niches of two sympatric species of Erpobdellidae (Hirudinoidea) in Alberta, Canada. *Oikos*, 37, 105-111.
- Edgecombe, G. D., G. Giribet, C. W. Dunn, A. Hejnol, R. M. Kristensen, R. C. Neves, G. W. Rouse, K. Worsaae & M. V. Sorensen. (2011). Higher-level metazoan relationships: recent progress and remaining questions. *Organisms Diversity & Evolution*, 11, 151-172.
- Goloboff, P. A., J. S. Farris & K.C. Nixon. (2008). TNT, a freeprogram for phylogenetic analysis. *Cladistics*, 24, 774-486.
- Greinacher, A. & T. E. Warkentin. (2008). The direct thrombin inhibitor hirudin. *Thrombosis and Haemostasis-Stuttgart*, 819.
- Kutschera, U. & P. Wirtz. (2001). The evolution of parental care in freshwater leeches. *Theory in Biosciences*, 120., 115-137.

- Kvist S., A. Narechania, A. Ocegüera-Figueroa, B. Fuks & M. E. Sidall. (2011). Phylogenomics of *Reichenowia parasitica*, an Alphaproteobacterial Endosymbiont of the Freshwater Leech *Placobdella parasitica*. *PLoS ONE*.
- Lebonah D. E., A. Dileep, K. Chandrasekhar, S. Sreevani, B. Sreedevi & J. Paramoda-Kumari. (2014). DNA Barcoding on Bacteria: A Review. *Advances in Biology*, 9.
- López-Jiménez, S. & A. Ocegüera-Figueroa. (2009). A new species of Rynchobdellid leech (Hirudinea: Glossiphoniidae): a parasite of turtles from Chiapas, México. *Journal of parasitology*, 95, 1356-1359.
- López-Jiménez, S. (1985). Estudio taxonomico de algunos hirudíneos de México. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México: Tesis de Licenciatura.
- Mann, K. H. (1962). Leeches (Hirudinea): their structure physiology, physiology, ecology and embriology. *Elsevier*.
- Manzano-Marín, A., A. Ocegüera-Figueroa, A. Latorre, L. F. Jimenéz-García & A. Moya. (2015). Solving a bloody mess: B-vitamin independent metabolic convergence among gammaproteobacterial obligate endosymbionts from blood-feeding arthropods and the leech *Haementeria officinalis*. *Genome biology and Evolution*, 2871-2884.
- Mason, T. A., Sayers, C. W., Paulson, T. L., Coleman, J. E., & Shain, D. H. . (2005). Cocoon deposition and hatching in the aquatic leech, *Theromyzon tessulatum* (Annelida, Hirudinea, Glossiphoniidae). *The American midland naturalist*, 78-87.
- McCoy J. C., E. L. Failey, S. J. Price & M. E. Dorcas. (2007). An Assessment of leech parasitism on semi-aquatic turtles in the Western Piedmont of North Carolina. *Southeastern Naturalist* , 191-202.
- Ocegüera- Figueroa, A. (2005). Estudio Taxonómico de Euhirudineos mexicanos y su ubicación en el contexto de las hipótesis filogenéticas recientes. *Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencias Biológicas, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México*, 77. México.
- Ocegüera-Figueroa, A. & B. Pacheco-Chávez. (2012). Registro de sanguijuelas de Costa Rica y clave para la identificación de especies con redescipción de *Cylicobdella costaricae*. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 946-957.
- Ocegüera-Figueroa, A. & V. León Règeagnon. (2014). Biodiversidad de Sanguijuelas (Annelida: Euhirudinea) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, S183-S189.
- Ocegüera-Figueroa, A. (2012). Molecular phylogeny og the New World bloodfeeding leech of the genus *Haementeria* and reconsideration of the biannulate genus *Oligobdella*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 508-514.
- Ocegüera-Figueroa, A. V. León-Règeagnon & M. E. Sidall. (2010). DNA barcoding reveals Mexican diversity within the freshwater leech genus *Helobdella* (Annelida: Glossiponiidae). *Mitochondrial DNA*, 24-29.

- Oosthuizen, J. H. & F. L. Fourie. (1985). Mortality amongst waterbirds caused by the African duck leech *Theromyzon cooperi*. *South African Journal of Wildlife Research*, 98-106.
- Perkins, S., R. Budinoff & M. E. Siddall . (2005). New Gammaproteobacteria associated with blood-feeding leeches and a broad phylogenetic analysis of leech endosymbionts. *Appl Environ Microbiol*, 5219–5224.
- Rouse, G. W. & K. Fauchald. (1995). The articulation of annelids. *Zoologica Scripta*, 269-301.
- Salas-Montiel, L. R. (2015). Diferenciación morfológica de especies del complejo *Helobdella stagnalis* (Euhirudinea: Glossiphoniidae) de México. *Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México*. México.
- Salas-Montiel, L., A. Phillips, S. Contreras-Mirón, A., Ocegüera-Figueroa . (2016). Prevalence, abundance and intensity of implanted spermatophores in the blood-feeding leech *Haementeria officinalis* from a wild population in Guanajuato, México. *Journal of Parasitology*, En prensa.
- Salzet, M. (2011). Anticoagulants and inhibitors of platelet aggregation derived from leeches. . *FEBS letters*, 187-192.
- Sawyer, R. T. (1986). *Leech biology and behavior*. (Vols. Feeding Biology, Ecology and Systematics.). Clarendon Press. Oxford.
- Schulz, C. A., M. V. Thomas, S. Fitzgerald & M. Faisal. (2011). Leeches (Annelida: Hirudinida) parasitizing fish of lake St. Clair, Michigan, USA. *Parasitology*, 73-83.
- Siddall, M. E. (2006). Hirudinida. En G. R. Pliejel (Ed.), *Reproductive biology and phylogeny of Annelida*. Enfield, New Hampshire.
- Siddall, M. E., K. Apakupakul, E. M. Burreson, K. A. Coates, C. Erséus, S. R. Gelder, M. Källersjö & H. Trapido-Rosenthal. . (2001). Validating Livanow: Molecular data agree that leeches, branchiobdellidans and *Acanthobdella peledina* form a monophyletic group of oligochaetes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 346-351.
- Siddall, M. E., S. L. Perkins & S. S. Desser. (2004). Leech mycetomes endosymbionts are a new lineage of alphaproteobacteria related to the Rhizobiaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 178-186.
- Sket, B. & P. Trontelj. (2008). Global diversity of leeches (Hirudinea) in freshwater. *Hydrobiologia*, 129-137.
- Struck, T. H. (2007). Annelid phylogeny and the status of Sipuncula and Echiura. *BMC Evolutionary Biology*, 57.
- Swofford, D. L. (202). PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), ver. 4.0b10. *Sunderland, MA: Sinauer Associates*.