



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA INFECCIÓN
DE *Contracaecum multipapillatum* (Drasche, 1882)
(*sensu lato*)(NEMATODA: ANISAKIDAE) EN
COPÉPODOS CALANOIDES

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

PRESENTA

GLORIA ISABEL VALLES VEGA

LA PAZ, B.C.S., DICIEMBRE DEL 2014



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 06 del mes de noviembre del 2014 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

"ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA INFECCIÓN DE *Contracaecum multipapillatum*
(Drasche, 1882) (*sensu lato*) (NEMATODA: ANISAKIDAE) EN COPÉPODOS CALANOIDES"

Presentada por el alumno:

VALLES	VEGA	GLORIA ISABEL
Apellido paterno	materno	nombre(s)
Con registro:		
A	1	3
0	4	8
0		

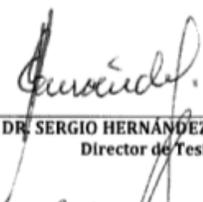
Aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

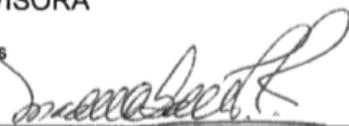
LA COMISION REVISORA

Directores de Tesis


 DR. SERGIO HERNÁNDEZ TRUJILLO
 Director de Tesis


 DR. RENÉ FUNES RODRÍGUEZ


 DR. JAIME GÓMEZ GUTIÉRREZ

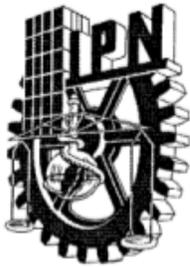

 DRA. MARÍA DEL CARMEN GÓMEZ DEL PRADO ROSAS
 2º. Director de Tesis


 DR. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


 DRA. MARÍA MARGARITA CASAS VALDEZ





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 24 del mes noviembre del año 2014
el (la) que suscribe BM. GLORIA ISABEL VALLES VEGA alumno(a) del
Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS
con número de registro A130480 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS
manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:
DR. SERGIO HERNÁNDEZ TRUJILLO Y DRA. MARÍA DEL CARMEN GÓMEZ DEL PRADO ROSAS
y cede los derechos del trabajo titulado:

"ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA INFECCIÓN DE *Contraeaecum multipapillatum*
(Drasche, 1882) (*sensu lato*) (NEMATODA: ANISAKIDAE) EN COPÉPODOS CALANOIDES"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: iza_wega@hotmail.com - strujil@ipn.mx - mcgomez@uabcs.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

BM. GLORIA ISABEL VALLES VEGA

nombre y firma

Dedicatoria.....

*A mi familia, y de manera especial, a mi madre por su constante apoyo.
A Amaru, mi compañero incondicional, gracias por compartir conmigo esta nueva etapa
de vida.*

Agradecimientos

A CONACyT por la beca otorgada a lo largo de mis estudios de maestría, y el apoyo recibido para realizar una estancia de investigación.

Al Instituto Politécnico Nacional por las gestiones y apoyos recibidos durante el periodo de estudio de la maestría a través del Programa Institucional de Formación de Investigadores y a la Coordinación de Cooperación Académica.

A CICIMAR por contribuir, formar parte de mi formación académica y permitirme usar sus instalaciones, especialmente del Laboratorio de Microbiología, para la amplificación y extracción del ADN

A los proyectos SIP:20130752 “Valoración ecológica de la comunidad planctónica” y 20141443 “Estudio de la biodiversidad planctónica en la Bahía y Ensenada de La Paz como indicador ecológico del sistema”.

A mi director, Dr. Sergio Hernández Trujillo por confiar en este trabajo y en mí. Gracias a su asesoría y consejos se fortaleció este proyecto y ahora me permiten dar un paso más en mi formación académica.

Al Laboratorio de Parasitología de la UABCS y particularmente a la Dra. María del Carmen Gómez del Prado Rosas, que ha sido mi mentora. Gracias por su constancia y dedicación he podido lograr un objetivo más para mi formación profesional.

A la Dra. Barbara González Acosta por la asesoría en los procesos de extracción y amplificación del ADN.

A la Universidad de Granada especialmente al Dr. Javier Adroher por recibirme en el Laboratorio de Parasitología, por sus aportaciones, comentarios y las micrografías en microscopía electrónica de barrido del presente trabajo.

A la Dra. Virginia León Regagnon, coordinadora del Nodo IBUNAM del Laboratorio Nacional de Código de Barras (MEXBOL), por su ayuda en la secuenciación de los nemátodos.

A los miembros del comité revisor: Dr. Jaime Gómez Gutiérrez, Dr. René Funes Rodríguez y al Dr. Sergio Martínez Días por sus observaciones y comentarios, que permitieron

el mejoramiento del presente documento.

Al Dr. Hector Villalobos por brindarme la plantilla de \LaTeX , para la elaboración de este documento.

A Josue Valles, por su colaboración en la preparación y edición de las imagenes de este documento.

A mis compañeras y amigas de la maestría Rosabel e Hisol, por su apoyo y compañía durante la realización de este trabajo.

A mis compañeros del Aula 6, por el tiempo compartido.

Índice general

Lista de figuras	IV
Lista de tablas	V
Glosario	VI
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. ANTECEDENTES	6
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
6. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	11
7. MATERIAL Y MÉTODOS	12
7.1. Obtención de Nemátodos	12
7.2. Infección de Copépodos	17
8. RESULTADOS	20
8.1. Identificación morfológica de los nemátodos	20
8.2. Descripción morfológica de <i>C. multipapillatum</i>	20
8.3. Descripción morfológica de <i>C. bioccai</i>	24
8.4. Análisis estadísticos de las diferencias morfométricas de <i>C. multipapillatum</i> y <i>C. bioccai</i>	26
8.5. Identificación molecular	27
8.6. Desarrollo embrionario de <i>C. multipapillatum</i>	28

8.7.	Descripción morfológica de los diferentes estadios larvarios de <i>C. multipapillatum</i>	31
8.8.	Experimentos de infección en copépodos	36
8.9.	Experimentos de infección de nemátodos en copépodos del Mediterráneo, España	39
9.	DISCUSIÓN	41
9.1.	CONCLUSIONES	48
9.2.	RECOMENDACIONES	49
	Referencias bibliográficas	56
10.	ANEXOS	57
10.1.	Anexo I	57
10.2.	Anexo II	59

Índice de figuras

1. Ciclo de vida conceptual de <i>Contracaecum multipapillatum s.l.</i> (Tomado de Salazar-Bermúdez 2011)	5
2. Localidades de recolecta de pelícanos muertos: la Bahía de la Paz (Costa Baja, Marina de Fidepaz, Marina del segundo batallón, Monumento de los Niños Héroes) y en Punta Lobos, campo pesquero en Todos Santos	12
3. Diseño experimental para la infección de copépodos con <i>C. multipapillatum</i>	18
4. Esquemas de macho de <i>C. multipapillatum s.l.</i> (l) labios, (i.l) interlabios, (a.n) anillo nervioso, (e) esófago, (c.e) ciego esofágico, (c.i) ciego intestinal, (i) intestino, (pa) papilas (v) ventrículo	22
5. Esquema de hembra de <i>C. multipapillatum s.l.</i> (l) labios, (i.l) interlabios, (a.n) anillo nervioso, (e) esófago, (c.e) ciego esofágico, (c.i) ciego intestinal, (i) intestino, (v) vulva	23
6. Esquemas de macho de <i>C. bioccai</i> Tomado de Mattiucci <i>et al.</i> (2008)	25
7. Árbol de similitud (Neighbor Joining) entre las diferentes zonas	27
8. Árbol de similitud (Neighbor Joining) entre las diferentes especies de <i>Contracaecum</i>	28
9. Desarrollo embrionario de <i>C. multipapillatum s.l.</i> a) Huevo embrionado. b) blástula al 2. ^a o 3. ^a día. c) Inicio de la gastrulación al 4. ^a día. d) Gastrulación al 4. ^a o 5. ^a día. e) Larva L1 del 6. ^a o 8. ^a día. f) Larva L2 del 8. ^a o 10. ^a día. . .	29
10. Micrografías en ESEM de huevos de <i>C. multipapillatum s.l.</i> . a) Huevo embrionado. b) 4. ^a a 5. ^a días de desarrollo. c) 6. ^a a 10. ^a días de desarrollo. . .	29

11. Larvas L2 de <i>C. multipapillatum s.l.</i> . a) L2 eclosionando. b) Micrografía en ESEM de la L2 con la vaina cuticular. c) Micrografía en ESEM de la L2 perdiendo la vaina cuticular	30
12. Esquemas de la larva L2 de <i>C. multipapillatum s.l.</i> (d) diente cuticular, (a.n) anillo nervioso, (e) esófago, (c.e) ciego esofágico, (i) intestino, (v) ventrículo, (v.c) vaina cuticular	33
13. Esquemas de la larva L3 de <i>C. multipapillatum s.l.</i> (d) diente cuticular, (a.n) anillo nervioso, (l) labios, (e) esófago, (c.e) ciego esofágico, (c.i) ciego intestinal, (i) intestino, (v) ventrículo, (m) mucrón, (r) recto, (g.r) glándulas rectales	34
14. Esquemas de la larva L4 de <i>C. multipapillatum s.l.</i> (a.n) anillo nervioso, (l) labios, (e) esófago, (c.e) ciego esofágico, (c.i) ciego intestinal, (i) intestino, (v) ventrículo, (es) espícula.	35
15. Copépodos infestados con <i>C. multipapillatum s.l.</i> a) <i>A. lilljeborgi</i> . b) <i>C. furcatus</i> (L2) larva del segundo estadio y (An) Antenula. Aumento 20X y 40X .	36
16. Análisis de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$) de las diferentes concentraciones de huevos de <i>C. multipapillatum</i>	37
17. Larvas L2 de <i>C. multipapillatum</i> adheridas entre ellas	39
18. Larvas L2 de <i>C. multipapillatum</i> teñida con Azul alcian + PAS	40
19. Representación esquemática del posible ciclo de vida pelágico de <i>Contra-caecum multipapillatum s.l.</i> (modificado de Salazar-Bermúdez (2011)) . . .	45

Índice de tablas

1.	Longitudes de los diferentes pelícanos y número de nemátodos encontrados	20
2.	Indicadores parasitológicos de copépodos en tres concentraciones de huevos de <i>C. multipapillatum</i>	37
3.	Concentraciones de huevos de <i>C. multipapillatum</i> significativamente diferentes, de acuerdo a la prueba estadística <i>post hoc</i> Nemenyi	38
4.	Acción de las soluciones para mucopolisacáridos	40
5.	Medidas máximas y mínimas de las diferentes estructuras anatómicas de <i>C. multipapillatum</i> y <i>C. bioccai</i>	59

GLOSARIO

Amplicón: Conjunto de moléculas de ADN idénticas, es el resultado de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Carga parasitaria: Número de individuos de una especie en particular de parásito, colectados en todos los hospederos infectados de una misma especie.

Copépodos: Grupo de crustáceos maxilópodos de tamaño pequeño, en ocasiones microscópicos, muy abundantes tanto en agua dulce como salada. Se conocen más de 15, 000 especies incluyendo aquellas de vida parasitaria.

Cebador: Oligonucleótido de 5-20 nucleótidos de longitud que sirve como punto de partida para la replicación de ADN.

Fasmidios: Órgano sensorial de los nemátodos de la clase Rhabditea, subclase Rhabditia de vida parásita, constituidos por un par de finos cordones cuticulares en posición bilateral en el extremo posterior subterminal anal. Son de dos tipos: glandular con función secretora y sensorial que involucra la función quimiorreceptora.

Hospedero: Organismo vivo, que recibe o proporciona condiciones apropiadas como alimento, estímulo hormonal para maduración sexual, estímulo en el crecimiento o protección; para el alojamiento de un organismo de vida parasitaria.

Hospedero intermediario: Organismo empleado por el parásito para continuar su ciclo de vida, donde puede cambiar morfológicamente y fisiológicamente. El número de hospedero intermediario, puede variar según la especie parásita.

Hospedero definitivo: Organismo en el que el parásito alcanza la madurez sexual o se realiza la fecundación o bien el último hospedero en el ciclo de vida de un parásito y en el que se desarrolla la fase adulta.

Hospedero paraténico: Organismo “potencial” donde el parásito sobrevive en estadio larvario sin completar su desarrollo y es utilizado como refugio temporal o vehículo para alcanzar al hospedero obligatorio.

Infección: Invasión, desarrollo y multiplicación de un agente patógeno en las células o tejidos del hospedador

Infestación: Relación hospedador-parásito en la que el parásito se alberga en la superficie externa del hospedador.

Intensidad media de infestación: Es el promedio del número total de individuos de una especie de parásito en particular en una muestra de hospederos entre el número de individuos infectados de la especie de hospederos de la muestra.

ITS-1 e ITS-2: Espaciadores internos transcritos (por sus siglas en inglés). Regiones espaciadoras internas del ADN ribosomal del núcleo, que tienen como función la maduración del RNA ribosomal. Por lo que el análisis de éstos, permiten la inferencia de relaciones filogenéticas, debido a que presentan secuencias de bases altamente conservadas.

Nemátodos: Metazoarios pseudo-celomados. Reconocidos como gusanos de forma cilíndrica, de simetría bilateral no segmentados. Con amplia distribución que comprende especies de vida libre y parásitas.

Parásito: Organismo que vive a expensas de otro organismo vivo, alimentándose a partir de sus nutrientes y sin ofrecer un beneficio a cambio.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (por sus siglas en inglés), en este proceso se amplifica una región de ADN o ARN a partir de cantidades pequeñas de muestra.

Prevalencia: Porcentaje de individuos hospedadoras infectadas por un parásito específico en una muestra determinada.

1. RESUMEN

El ciclo de vida de los nemátodos de la familia Anisakidae, sugiere que los crustáceos son los primeros hospederos, aunque este proceso parasitario está escasamente documentado en el ambiente marino. Por su diversidad y abundancia, los copépodos han sido considerados como los hospederos intermediarios. Este estudio trata de la inducción experimental para infectar a copépodos Calanoides con *Contracaecum multipapillatum* (*sensu lato*) a partir de huevos embrionados obtenidos de hembras adultas procedentes de seis pelícanos (*Pelecanus occidentalis*). Los nemátodos se identificaron morfológicamente y usando marcadores moleculares (ITS-1 y ITS-2). Los copépodos pelágicos *Centropages furcatus*, *Acartia lilljeborgi* y *A. clausi* se recolectaron en La Ensenada y Bahía de La Paz y especímenes de *Pseudodiaptomus euryhalinus* se obtuvieron de la UPIMA (CICIMAR). *Centropages typicus*, *Calanus helgolandicus* y *Acartia* sp. se obtuvieron en otra serie de muestreos llevados a cabo en la zona de la Herradura en el Mar Mediterráneo Español. La primera larva se desarrolló de 6 a 8 días a 25°C, mudó dentro del huevo y creció al segundo estadio entre el octavo y décimo día, lapso en el que eclosionaron espontáneamente, presentando una etapa de vida libre. Los copépodos *C. furcatus*, *A. lilljeborgi* y *A. clausi* se infestaron con la larva L2, encontrándose diferencias significativas entre las concentraciones de huevos (Kruskal-Wallis $p < 0.05$). Contrariamente, *P. euryhalinus*, *C. typicus*, *C. helgolandica* y *Acartia* sp. no se infestaron. Los resultados confirman que algunos copépodos marinos silvestres podrían actuar como hospederos paraténicos de *C. multipapillatum*, en contraste a lo observado en ecosistemas dulceacuícolas. La identificación morfológica y genética de los nemátodos permitió establecer la presencia de dos especies, *Contracaecum multipapillatum* y *Contracaecum bioccai*; morfológicamente fue posible diferenciarlas principalmente por la longitud total y el patrón de distribución de las papilas caudales. La identificación de *C. bioccai* en la zona es el primer registro de la especie.

Palabras clave: hospederos, ciclo de vida, Anisakidae, copépodos Calanoides

2. ABSTRACT

The life cycle of nematodes anisakidae family, suggest which use crustaceans as primary hosts, although this parasitic process is poorly documented in the marine environment. For its diversity and abundance, the copepods have been considered as intermediate hosts. This study deals with the experimental induction to infect Calanoid copepods with *Contraecaecum multipapillatum* (*sensu lato*) from embryonated eggs obtained from adult hosted in 6 pelicans (*Pelecanus occidentalis*). Nematodes were morphologically and genetically identified by using molecular markers (ITS-1 and ITS-2). Pelagic copepods *Centropages furcatus*, *Acartia clausi* and *A. lilljeborgi* were collected in Ensenada and Bahia de La Paz, and *Pseudodiaptomus euryhalinus* specimens were obtained from the UPIMA (CICIMAR). *Centropages typicus*, *Calanus helgolandicus* and *Acartia* sp were obtained from La Herradura, Spanish Mediterranean Sea. The first larvae was developed for 6-8 days at 25°C, molted into the egg and raised the second stage between the eighth and tenth day period in which they hatched spontaneously, becoming as free-living stage. Copepods *C. furcatus*, *A. clausi* and *A. lilljeborgi* were infested with L2 larvae; there were significant differences between the concentrations of eggs (Kruskal-Wallis $p < 0.05$). Conversely, *P. euryhalinus*, *C. typicus*, *C. helgolandicus* and *Acartia* sp were not infested. Our results confirm that some wild marine copepods could act as paratenic hosts of *C. multipapillatum*, in contrast to that observed in freshwater ecosystems. Morphological and genetic identification of nematodes allowed to establish the presence of two species, *Contraecaecum multipapillatum* and *Contraecaecum bioccai*; was possible to differentiate morphologically mainly by the overall length and the distribution pattern of caudal papillae. The identification of *C. bioccai* in the area is the first record of the species.

Keywords: hosts, life cycle, Anisakidae, Calanoid copepods

3. INTRODUCCIÓN

El parasitismo, es una relación simbiótica donde existe una asociación cercana entre dos organismos, en la que uno (parásito) depende de otro (hospedero), obteniendo algún beneficio de él, sin que el daño sea una condición necesaria (Rohde, 1993).

La vida parasitaria ha tenido amplio éxito evolutivo, logrando prosperar en casi todos los phyla de plantas y animales. En el reino animal el parasitismo se encuentra, desde los protozoos hasta cordados (Schmidt & Roberts, 1983).

Lo anterior demuestra la existencia de una gran variedad de estrategias de los parásitos, convirtiendo a estos organismos en un grupo de gran interés, ya que desempeñan funciones clave en los ecosistemas, como la regulación de la abundancia o de la densidad de las poblaciones hospederas y la estabilización de la red trófica (Dobson *et al.*, 2008). Además, los parásitos pueden ser un indicador útil en el entendimiento de la evolución de los animales de vida libre (Palm & Klimpel, 2008) y de la salud de los ecosistemas (Marcogliese, 2005).

Particularmente los helmintos, considerados como un grupo parafilético (Pérez-Ponce de León *et al.*, 2010), han sido ampliamente estudiados y se ha logrado determinar el ciclo de vida de especies que parasitan organismos terrestres o dulceacuícolas. Sin embargo, los ciclos de vida de la mayoría de los helmintos que parasitan hospederos marinos se desconocen.

En los ciclos de vida de los helmintos marinos, se ha implicado como hospedero intermediario al zooplancton, principalmente los crustáceos, debido a su alta densidad y abundancia (Théodoridès 1989; Tolonen & Karlsbakk 2003). Los copépodos usualmente dominan las asociaciones del zooplancton, de esta forma, pueden desempeñar un papel importante como hospederos intermediarios y como vectores de enfermedades, debido a que los parásitos pueden tener una transmisión trófica hacia varias especies de peces que actúan como hospederos secundarios. Este mismo mecanismo de transmisión

trófica, puede ocasionar que el ser humano, se convierta en hospedero accidental por el consumo de peces que no hayan sido sometidos a procesos sanitarios adecuados de remoción o destrucción de los parásitos (Meyers 1990; Olivero-Verbel & Baldiris-Avila 2008).

Entre los helmintos de interés para la salud pública, se encuentran los nemátodos de la familia Anisakidae (géneros *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Hysterothylacium* y *Contracaecum*) que se caracterizan por causar enfermedades digestivas que en ocasiones pueden ser graves (Cabrera & Trillo-Altamirano, 2004).

El ciclo de vida de los Anisákidos es conceptualmente sencillo y se ha generalizado para todas las especies (Anderson, 2000). En general, consta de cuatro estadios larvales y un estadio adulto, siendo el tercer estado larvario el típicamente infectivo a peces y al hombre.

Los hospederos difinitivos son mamíferos marinos (ballenas, delfines y lobos marinos) y algunas aves piscívoras (pelícanos y cormoranes) que al defecar liberan en el mar los huevos embrionados con el primer estadio larvario (L1). Éste se desarrolla al segundo estadio (L2), para posteriormente eclosionar en el agua y ser ingerido por un invertebrado (primer hospedero intermediario), probablemente un crustáceo planctónico. Los peces zooplanctófagos y cefalópodos usualmente son los segundos hospederos intermediarios, donde se desarrolla el tercer estadio (L3). El nemátodo completa su ciclo, cuando los hospederos definitivos ingieren los peces o cefalópos infectados por la larva L3, desarrollándose ahí la larva del cuarto estadio (L4) y completándose el resto del desarrollo hasta la aparición de los vermes adultos (Anderson, 2000) (Fig.1).

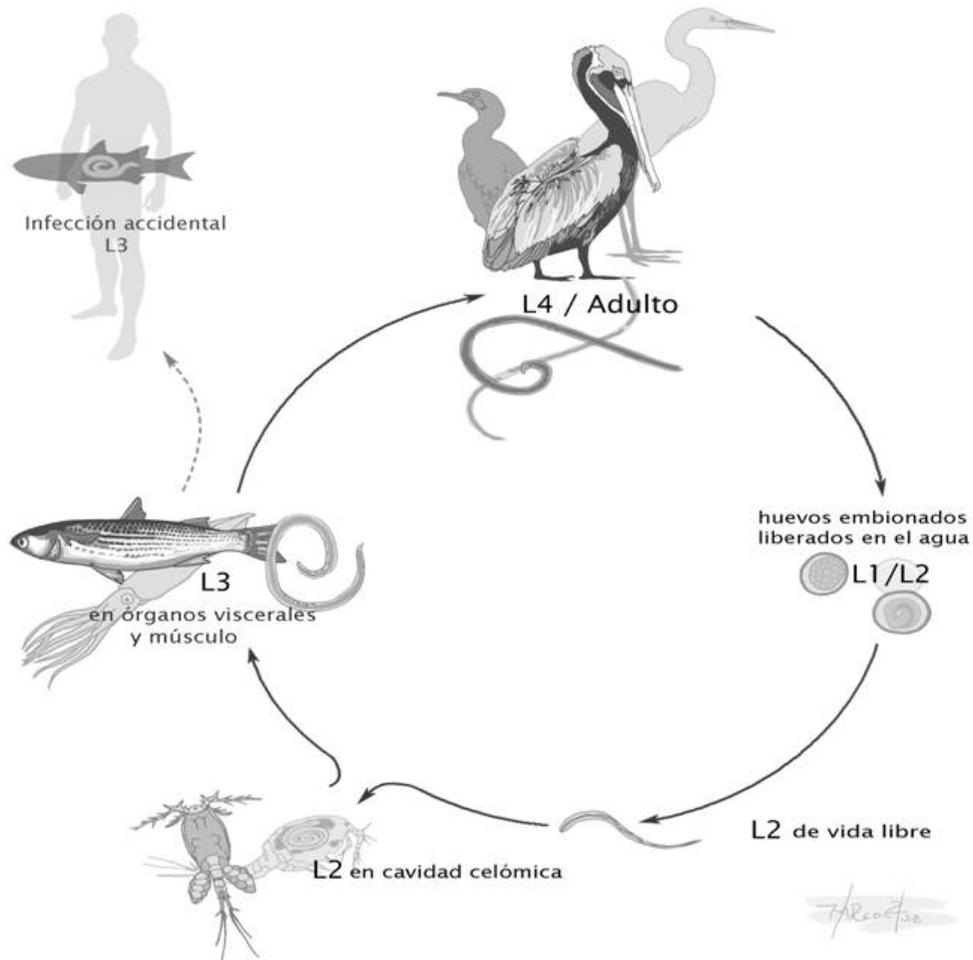


Figura 1: Ciclo de vida conceptual de *Contracaecum multipapillatum* s.l. (Tomado de Salazar-Bermúdez 2011)

Contracaecum multipapillatum en ambientes dulceacuícolas, parece apegarse a este esquema generalizado (Huizinga, 1967). Sin embargo, en el ambiente marino no se ha obtenido evidencia de que esto ocurra. Por lo que, en este trabajo, se realizó la infección experimental bajo condiciones controladas, a copépodos pelágicos marinos, por ser un grupo potencial como hospedero intermediario en el ciclo de vida de *C. multipapillatum*.

4. ANTECEDENTES

Actualmente cada vez son más los estudios en el ciclo de vida de los nemátodos implicando a un mayor número de hospederos vertebrados e invertebrados en todas las etapas de su ciclo de vida (Vidal-Martínez *et al.*, 1994).

De & Maity (1999) realizaron experimentos de infección con larvas eclosionadas del nemátodo *Onchocamallanus bagarii* (Karve et Naik, 1951) en los copépodos *Mesocyclops leuckarti* (Claus, 1857) y *M. crassus* (Fischer, 1853) obteniendo el desarrollo del tercer estadio (L3) en su hemocele después de 3 días de exposición.

En Tabasco, México, el nemátodo *Gnathostoma* tiene como primer hospedero intermediario a los copépodos dulceacuícolas de las especies *Mesocyclops leuckarti* (Claus, 1857), *Eucyclops serrulatus* (Fischer, 1851); *Cyclops strennus* (Fisher, 1851) y *C. viscinus* (Uljanin, 1875) (Hernández-Gómez *et al.*, 2008).

Desde la descripción del ciclo biológico de *Anisakis* (Van Thiel, 1976), se han producido avances significativos en el conocimiento del ciclo vital de algunas especies de Anisákidos, principalmente en *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809) (Anderson, 2000).

El género *Contraecum* se ha encontrado en una gran variedad de invertebrados incluyendo celenterados, ctenóforos, gasterópodos, cefalópodos, poliquetos, copépodos, misidáceos, anfípodos, eufáusidos, decápodos, equinodermos y quetognatos (Anderson, 2000).

Norris y Overstreet (1976) mencionaron que la transmisión de *Contraecum* sp. de invertebrados a peces hospederos intermediarios no es clara. Los copépodos son probablemente los hospederos más frecuentes en la transmisión del segundo estadio (L2) a peces donde se desarrolla el tercer estadio (Anderson, 2000).

Koie & Fagerholm (1993) sugirieron que la muda al segundo estadio (L2) de *C. osculatum* en la foca gris sucede aún en el estadio de huevo embrionado. Además encontraron

el cuarto estadio (L4) y adultos *Contracaecum* en el tracto digestivo de focas, algunos delfines y aves piscívoras, por lo que el tercer estadio (L3) ocurre en peces, usualmente encapsulado en las vísceras, y aunque el hospedero definitivo de *Contracaecum* son aves, el ciclo de vida en mamíferos aún no es claro.

Koie & Fagerholm (1995) infectaron experimentalmente a organismos del zooplancton con *C. osculatum* y concluyeron que los copépodos Calanoides podrían ser el primer hospedero intermediario, mientras que nauplios y la larva cypris de cirripedios podrían ser frecuentes hospederos paraténicos en el mar Báltico

Por otro lado, Huizinga (1966) En: **Anderson (2000)** infectó experimentalmente a *Cyclops vernalis* y *Tigriopus californicus* (Baker, 1912) con el segundo estadio (L2) del nemátodo *Contracaecum spiculigerum* (Rudolphi, 1809) los hospederos murieron de uno a seis días y aunque durante este tiempo se observó incremento en la talla de los nemátodos, éstos no mudaron.

Dziedońska-Rynko & Rokicki (2007) infectaron organismos de zooplancton con *Contracaecum rudolphii* en el noroeste de Polonia, encontrando que sólo los copépodos ciclopoideos podían ser hospederos intermediarios. En relación a *Contracaecum multipapillatum* **Huizinga (1967)** infectó a *Cyclops vernalis* y *Tigriopus californicus*, encontrando de 6 a 10 nemátodos en cada especie de copépodos.

El gran interés que se le ha dado al estudio del ciclo de vida de estos nemátodos anisákidos, se ha debido a que el hombre puede ser un hospedero accidental. El primer caso de infección en humanos fue registrado por Straub en 1955 en Holanda y descrito por Van Thiel 1960 como un caso de anisakidosis intestinal debido al consumo de arenques crudos o ligeramente salados. Esta enfermedad también se denominó “enfermedad del gusano del arenque”. Desde la detección del primer caso de anisakidosis se registraron otros 149 casos de anisakidosis en Holanda entre 1955 y 1967 (**Osanz-Mur, 2001**). El primer caso descrito en Norteamérica fue en 1972, donde se identificó al nemátodo causante como perteneciente al género *Phocanema* (actualmente *Pseudoterranova*) y

fue recuperado quirúrgicamente de un aneurisma de la arteria iliaca (Cheng, 1982).

Un problema adicional que existe en los anisákidos, es la identificación a nivel especie basado sólo en las características morfológicas de fases larvarias y adultos; algunos caracteres morfológicos carecen de valor taxonómico interespecífico y, por consiguiente, algunos géneros de la familia Anisakidae forman complejos multiespecíficos que requieren ser diferenciados genéticamente, aunque en ocasiones es posible diferenciarlas mediante hospederos o distribución geográfica (Labriola & Suriano 1996; Nadler *et al.* 2005; Mattiucci & Nascetti 2008; Shamsi *et al.* 2008; Shamsi *et al.* 2009).

El género *Contraecaecum* (Railliet y Henry 1912) incluye aproximadamente 100 especies con distribución cosmopolita posiblemente favorecida por la migración de aves y mamíferos marinos y su típica baja especificidad parasítica para infectar hospederos intermedios y definitivos (Deardorff & Overstreet 1980; Mhaisen *et al.* 1988; Anderson 2000).

Los complejos multiespecíficos de *Contraecaecum* han sido caracterizados genéticamente, utilizando aloenzimas y secuencias como las del primer espaciador transcrito interno (ITS-1) y segundo espaciador transcrito interno (ITS-2) del ADN ribosomal y las subunidades 18s y 28s del ADN ribosomal; así como el Citocromo B (Cyt-B) y Citocromo C Oxidasa subunidad I y II (COI, COx2) del ADN mitocondrial (Mattiucci & Paoletti 2010; Shamsi *et al.* 2009).

Mattiucci & Paoletti (2010) propusieron dos especies nuevas en el complejo multiespecífico de *C. multipapillatum* mediante el ADN mitocondrial de la subunidad II del citocromo c oxidasa (COx2): *C. gibsony* y *C. overstreeti* (antes denominadas *C. multipapillatum* sp “A” y *C. multipapillatum* “B”). Ambas especies se encontraron infectando al hospedero *Pelecanus crispus* de Grecia. Además, el complejo incluye a *C. multipapillatum* sp. “C” en *P. occidentalis* y *C. multipapillatum* sp. “D” en *P. conspicillatus* caracterizadas con el ITS-1 e ITS-2 (Mattiucci & Paoletti 2010; Shamsi *et al.* 2008).

Valles-Vega (2011) estudiando a *C. multipapillatum* en *Mugil curema* obtuvo secuen-

cias de 186 pares de bases (pb) del ITS-1 y 231 (pb) del ITS-2, con homologías de 90 % (167-186 pb) y 96 % (220-231 pb) respectivamente, por lo que concluyó que las larvas L3 pertenecen al complejo multiespecífico de *C. multipapillatum* y aparentemente, es una especie distinta de las cuatro previamente descritas, por lo que en este trabajo también serán referidas como *Contracaecum multipapillatum (sensu lato)*.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Considerando que en México existe desconocimiento sobre taxonomía, biología y ecología de estos nemátodos parásitos, es fundamental, primero, identificar las especies de copépodos que pueden ser los primeros hospederos intermediarios de *C. multipapillatum* (s.l.). Esta especie infecta en alta prevalencia e intensidad a la lisa *Mugil curema* y *M. cephalus*, peces de frecuente consumo humano debido a su bajo costo en La Paz, B.C.S. (Plomozo-Lugo, 2010). En segundo lugar, es necesario conocer el mecanismo de infección de estos helmintos, así como el tiempo que transcurre para el desarrollo de las fases larvales, ya que en nuestro país no existen registros médicos de Anisakidosis, lo cual puede deberse a su difícil diagnóstico por la comunidad médica, porque puede asociarse fácilmente con otras enfermedades del tracto gastrointestinal.

6. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Los copépodos Calanoides pueden ser hospederos intermediarios del segundo estadio larvario (L2) de *Contracaecum multipapillatum* (s.l.).

Objetivo General

Determinar experimentalmente si los copépodos Calanoides son el primer hospedero intermediario en el ciclo de vida de *C. multipapillatum* (s.l.).

Objetivos Específicos

1. Corroborar la identidad taxonómica de *C. multipapillatum* en estado adulto usando caracteres morfológicos, morfométricos y marcadores moleculares.
2. Describir las características morfo-anatómicas de los diferentes estadios de *C. multipapillatum*.
3. Seleccionar las especies de copépodos para inducir las infecciones experimentales, considerando sus abundancias y frecuencia de aparición en la Bahía y Ensenada de La Paz, B.C.S.
4. Desarrollar el diseño experimental que permita la infección de los copépodos Calanoides con huevos de *C. multipapillatum* en condiciones controladas.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. Obtención de Nemátodos

Con el apoyo de la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA) del municipio de La Paz BCS, se recolectaron seis ejemplares de pelícanos encontrados muertos, de la especie *Pelecanus occidentalis*, en la Bahía de la Paz (Costa Baja, Marina de Fidepaz, Marina del segundo batallón, Monumento de los Niños Héroe) y en Punta Lobos, campo pesquero en Todos Santos (Fig. 2)



Figura 2: Localidades de recolección de pelícanos muertos: la Bahía de la Paz (Costa Baja, Marina de Fidepaz, Marina del segundo batallón, Monumento de los Niños Héroe) y en Punta Lobos, campo pesquero en Todos Santos

Cada ejemplar se midió, antes de ser trasladados al laboratorio para disecarlos. Se

buscaron en las vísceras a los nemátodos y una vez obtenidos, se dividieron en tres grupos. El primero se utilizó para la identificación morfológica, el segundo para análisis molecular y el tercero para la obtención de huevos.

Identificación Morfológica

Los nemátodos se fijaron en alcohol etílico anhidro al 70 %. Posteriormente se deshidrataron en una serie gradual de alcohol etílico anhidro (70 a 100 %) y se transparentaron con glicerina para su identificación con base en las características mencionadas por Yamaguti (1961) y Anderson *et al.* (1974).

La descripción morfológica se basó en el procedimiento propuesto en este tipo de estudios (Yamaguti, 1961), para lo cual se obtuvieron al azar 10 machos y 10 hembras por pelícano. Se midieron en un microscopio compuesto Carl Zeiss con un ocular micrométrico a 10X calibrado y se anotaron las medidas correspondientes en milímetros proporcionándose las tallas mínimas, máximas y promedio en paréntesis. Se elaboraron esquemas de la morfología de los nemátodos con la ayuda de un microscopio compuesto Carl Zeiss con cámara clara. Se tomaron micrografías con un microscopio electrónico de barrido ambiental (ESEM) FEI Quanta 400 en la Universidad de Granada, España.

Para determinar diferencias estadísticas en las medidas de los nemátodos de cada pelícano, se hizo un análisis estadístico exploratorio de datos siguiendo las recomendaciones de Zuur *et al.* (2010) para determinar si en los datos considerados existen valores atípicos extremos (3º rango intercuartil) los cuales no serían utilizados para el análisis.

A través de las pruebas de Levene y Kolmogorov-Smirnov (Zar, 1984), se calculó la homocedasticidad y normalidad respectivamente, resultando violaciones de ambos supuestos. Por esta razón se utilizó la prueba de comparaciones pareadas de U Mann-Whitney (Zar, 1984). Todas las pruebas estadísticas se realizaron a un nivel de confianza del 95 %. Los análisis estadísticos de este trabajo son en tres etapas, porque es una

prueba de comparaciones pareadas. La primera etapa buscó diferencias entre las medias de las especies, la segunda entre sexos de una misma especie y la tercera entre los sexos de diferentes especies (machos-machos y hembras-hembras).

Identificación Molecular

Para el análisis molecular de los nemátodos se utilizó el primer espaciador transcritto interno (ITS-1) y el segundo espaciador transcritto interno (ITS-2) del ADN ribosomal (rADN) (Zhu *et al.*, 2000).

Extracción de ADN

En el laboratorio de Microbiología del Departamento de Desarrollo de Tecnologías del CICIMAR, se llevó a cabo la extracción de ADN de acuerdo al protocolo modificado de buffer de bromuro de cetil-trimetilaminio (CTAB) (Ausubel *et al.*, 2002).

Se cortaron porciones de aproximadamente 0.5 cm³ de tejido de los nemátodos fijados en alcohol etílico anhidro al 96%, y se colocaron en tubos eppendorf de 2 mL, se agregaron 250 μ L de TE (Tris-EDTA) y se mantuvieron a temperatura ambiente, después de una hora, se hicieron tres lavados con el mismo buffer.

Las muestras se maceraron con la ayuda de un pistilo, se les agregaron 3 μ L de proteinasa K y se incubaron a 35°C por una hora. Después se les agregó 200 μ L del buffer CTAB (2% (w/v) CTAB, 2% PVP, 0.5% β -mercaptoetanol, 1.4 M NaCl, 20mM EDTA, 100mM Tris-Hcl, pH 8).

Se incubaron a 65°C durante 5 minutos; al término de ese lapso se homogeneizaron en el vórtex a velocidad máxima por un minuto. Se agregaron 600 μ L del buffer CTAB y se incubaron a 65°C por una hora. Al término del periodo de incubación se les agregó 700 μ L de cloroformo: alcohol isoamilico. Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm

durante 10 minutos a temperatura ambiente, recuperándose la fase acuosa en un tubo nuevo. Para precipitar el ADN se utilizaron 300 μL de isopropanol frío y 50 μL de acetato de amonio 7.5M y se dejaron las muestras a -20°C durante toda la noche.

El ADN se recuperó mediante centrifugación a 14,000 rpm a 4°C durante 20 minutos, se descartó el sobrenadante y el concentrado o botón se lavó con 50 μL de etanol al 70 %, las muestras se centrifugaron nuevamente a 14,000 rpm a 4°C durante 10 min y se descartó el sobrenadante. El botón de ADN se dejó secar y se resuspendió en 50 μL de TE.

Amplificación y Secuenciación

La amplificación de las muestras se realizó con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), donde la reacción se ajustó a 50 μL . Con los ITS-1 e ITS-2 se utilizó el cebador de inicio NC5 (5'-GTA GGT GAA CCT GCG GAA GGA TCAT-3') y el cebador inverso NC2 (5'TTA GTT TCT TCC TCC GCT-3') utilizado en el estudio de *Zhu et al. (2000)*, obteniéndose un amplicón de ~ 1000 pares de bases. Las condiciones de PCR fueron: 10 minutos a 95°C (desnaturalización de inicio), 30 ciclos de 30 segundos a 95°C (desnaturalización), 40 segundos a 52°C (alineación), 75 segundos a 72°C (extensión), y 7 minutos a 72°C de elongación final.

Finalmente los productos se visualizaron en un gel de agarosa al 1 %, teñidos con SYBR Gold y las bandas de ADN fueron visualizados en un fotodocumentador. El producto de PCR se mandó purificar y secuenciar a la empresa MacroGen (Korea). Las muestras se purificaron usando la precipitación con etanol y la secuenciación se llevó a cabo utilizando un Kit BigDye terminator v3.1 Cycle, y se corrieron en un secuenciador automático 3730XL.

Análisis de las secuencias

Las secuencias fueron recibidas en formato *ABI y se visualizaron con ayuda del programa Chromas. Después se exportaron en formato FASTA como “forward” y como complemento “reverse”, para poder alinearlas y obtener una secuencia coincidente o consenso.

Las secuencias fueron alineadas con el programa ClustalX (versión 2.0). Con el programa PHYLIP (versión 3.72) se construyeron los árboles de similitud utilizando el método estadístico de Neighbor Joining, y el método de re-muestro (Bootstrap) con 100 repeticiones.

Para la elaboración de los árboles de similitud se utilizaron los siguientes códigos de especies del género de *Contraecum*, tomadas de la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information):

AM940057.1, AM940059.1, AM940056.1, KC437338.1, KC437337.1, EU678869.1, AJ634782.1, AJ634783.1, FM177540.1, FM210251.1, JF424598.1, FM210417.1, FM177524.1, EU839572.1, FM177561.1, AJ634784.1, JF424597.1.

Como grupo externo en los árboles de similitud se utilizó al nemátodo *Ascaris summ.*

Disección de hembras

La tercera fracción de nemátodos se colocó en una solución de vinagre al 1 %, y posteriormente se disecaron los úteros de las hembras para obtener los huevos. Se lavaron y se pusieron en una mezcla de antibiótico y antimicótico durante 30 minutos y después se colocaron en agua de mar filtrada, para su incubación.

7.2. Infección de Copépodos

Recolecta y Selección de Copépodos

Para obtener copépodos epipelágicos, se realizaron muestreos de zooplancton en La Ensenada y Bahía de La Paz, mediante arrastres circulares subsuperficiales (0-1.5 m profundidad). Se utilizó una red cónica simple de 1.5 m de longitud y 60 cm de diámetro de la boca equipada con malla filtrante de 333 μm y con un flujómetro digital General Oceanic para estimar el volumen de agua filtrado. Las especies seleccionadas fueron *Centropages furcatus*, *Acartia lilljeborgi*, *A. clausi* y *Pseudodiaptomus euryhalinus*; ésta última se obtuvo de cultivo de la UPIMA del CICIMAR. Todas las especies se identificaron de acuerdo con [Palomares-García et al. \(1998\)](#).

Otra serie de muestreos de zooplancton se llevó a cabo en la zona de la Herradura en el Mar Mediterráneo español, mediante arrastres circulares subsuperficiales con dos redes cónicas simples de 1.5 m de longitud y 60 cm de diámetro de la boca, y con una malla filtrante de 30 y 50 μm . En ambos casos, el zooplancton vivo se colocó en un contenedor térmico con agua de mar del sitio de muestreo y se transportó al laboratorio para extraer ejemplares de las especies de copépodos predominantes. Las especies del Mediterráneo fueron *Calanus helgolandicus*, *Centropages typicus* y *Acartia* sp. identificadas de acuerdo con [Huys & Boxshall \(1991\)](#).

Diseño experimental

El estudio de infección se hizo mediante un experimento unifactorial. El único factor considerado fue la concentración de huevos de nemátodos, que tuvo tres diferentes concentraciones: 50, 100 y 150 huevos. Durante 15 días se mantuvo en luz ambiente, a temperatura de 25°C, aireación de 1500 cc/min, 3.5 PSI, 3.5 Wh y una concentración de 20000 cel/ml de la diatomea *Tetraselmis suecica* como alimento. Cada uno de los trata-

mientos o niveles fue colocado en cajas petri transparentes de 3ml, con tres replicas (Fig. 3) y en cada tratamiento se colocaron 15 copépodos de la misma especie. Diariamente se hizo una revisión para ver si existían copépodos muertos. Al término del periodo de experimentación, con un microscopio estereoscópico Carl Zeiss con objetivo digital, se revisaron los copépodos para la búsqueda de larvas en su hemocele, registrando en video y fotografías digitales con un microscopio compuesto de contraste de fase marca Carl Zeiss Scope.A1 con cámara Axiocam 1CC5.

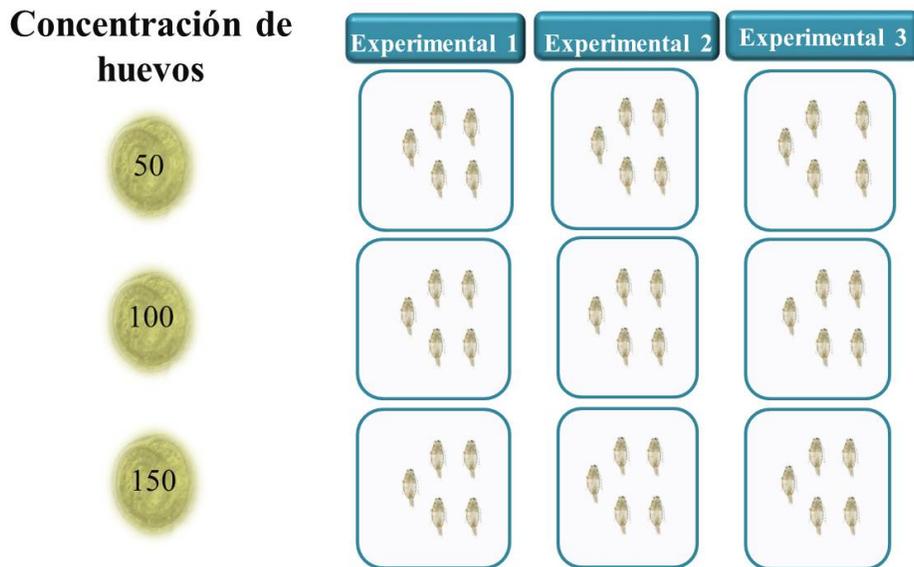


Figura 3: Diseño experimental para la infección de copépodos con *C. multipapillatum*

Indicadores ecológicos de parasitismo

En los pelícanos y en los copépodos se estimó la prevalencia (P) y la intensidad media (I) usando los criterios de *Bush et al. (1997)*:

$$P = (\text{Número de hospederos parasitados} / \text{Número de hospederos revisados}) * 100 \quad (1)$$

$$I = (\text{Número de pársitos de una especie} / \text{Número de hospederos parasitados}) \quad (2)$$

Para conocer diferencias estadísticamente significativas entre los niveles, se realizó un análisis de Kruskal-Wallis. Posteriormente se realizó la prueba no paramétrica de Nemenyi (*Zar, 1984*), para identificar en cual o cuales de las concentraciones de huevos existe una diferencia significativa.

Tinciones histoquímicas

Algunas larvas L2 fueron teñidas, usando tinciones histoquímicas con Azul alcian y PAS (Técnica del ácido periódico-Schiff), con la finalidad de tener una caracterización preliminar de las sustancias constituyentes de los productos de secreción, que son usadas para fijarse a los hospederos.

Las soluciones para preparar las tinciones histoquímicas se elaboraron de acuerdo con *Martoja et al. (1970)* y el procedimiento se encuentra en el Anexo I (10.1).

8. RESULTADOS

Se revisaron 6 pelícanos *Pelecanus occidentalis* (Tabla 1), encontrando en el esófago (ventrículo) un total de 1,263 nemátodos; 368 del estadio cuatro y 895 adultos. Se observó una prevalencia del 83 % y una intensidad media de 253 nemátodos por pelícano. Además se encontró al céstodo *Tetrabotrium* sp. con una prevalencia del 17 % y una intensidad media de 20 céstodos por pelícano.

Tabla 1: Longitudes de los diferentes pelícanos y número de nemátodos encontrados

Pelícano	Zona de recolecta	Longitud total (cm)	Longitud de envergadura (cm)	No. de nemátodos
1	Costa Baja	95	157	40
2	Marina de Fidepaz	133	170	225
3	Segundo Batallón de la Marina	100	121	350
4	Monumento Niños Heroes	88	141	603
5	Punta Lobos Todos Santos	134	176	45
6	Punta Lobos Todos Santos	124	146	0

8.1. Identificación morfológica de los nemátodos

Los helmintos obtenidos se identificaron como *C. multipapillatum* y *C. bioccai* considerando las siguientes características taxonómicas: el número de papilas paraclocales, el patrón de distribución de las papilas y longitud de las espículas.

8.2. Descripción morfológica de *C. multipapillatum*

Basada en 60 ejemplares: 30 machos y 30 hembras. Cuerpo robusto. Cutícula con estriaciones transversales muy marcadas en el extremo anterior del cuerpo, después de los labios y conforman el collar que delimita el cuello del cuerpo. Presencia de 3 labios, uno dorsal con una doble papila y dos ventro-laterales con ligera depresión en el margen superior, cada uno con una papila doble, crestas dentígeras ausentes. Los tres

interlabios, bien desarrollados, con punta redondeada y no bifurcada. Poro excretor en la base de los labios. Esófago muscular y un ventrículo glandular de forma globular. Ciegos esofágico e intestinal presentes. Con tres glándulas rectales.

Macho. Con una longitud total de 24.76-41.18 (31.95) y 0.69-1.06 (0.87) de ancho. El anillo nervioso apenas visible se encuentra a una distancia de 0.55-0.67 (0.61) del extremo anterior del cuerpo. Esófago 2.21-3.97 (2.98) en longitud, 0.16-0.34 (0.20) de ancho. Ciego esofágico 1.21-1.69 (1.45) de longitud. Ciego intestinal 2.15-3.24 (2.78) de longitud. Las papilas caudales de la siguiente manera: 60-65 (62). Papilas precloacales sencillas, formando 2 líneas subventrales 7-8 (8), cuatro papilas proximales en las 25 primeras estrías transversales anteriores a la cloaca. Seis pares de papilas posteriores a la cloaca. Par de paracloacal dobles; cuatro pares de papilas distales. Un solo par de pequeños fásmidos situados lateral a las papilas d4. (Fig.4 y Tabla 5). **Hembra.** La longitud total es de 31.35-40.88 (36.71) y 0.75-0.99 (0.88) de ancho. Esófago 2.36-4.12 (3.27) en longitud, 0.15-0.36 (0.25) de ancho. Ciego esofágico 1.21-1.69 (1.45) de longitud. Ciego intestinal 2.15-3.24 (2.78) de longitud. Vulva ligeramente a un tercio posterior de la unión esófago-intestino. Huevos esféricos 60 x 50 μm (Fig.5 y Tabla 5).

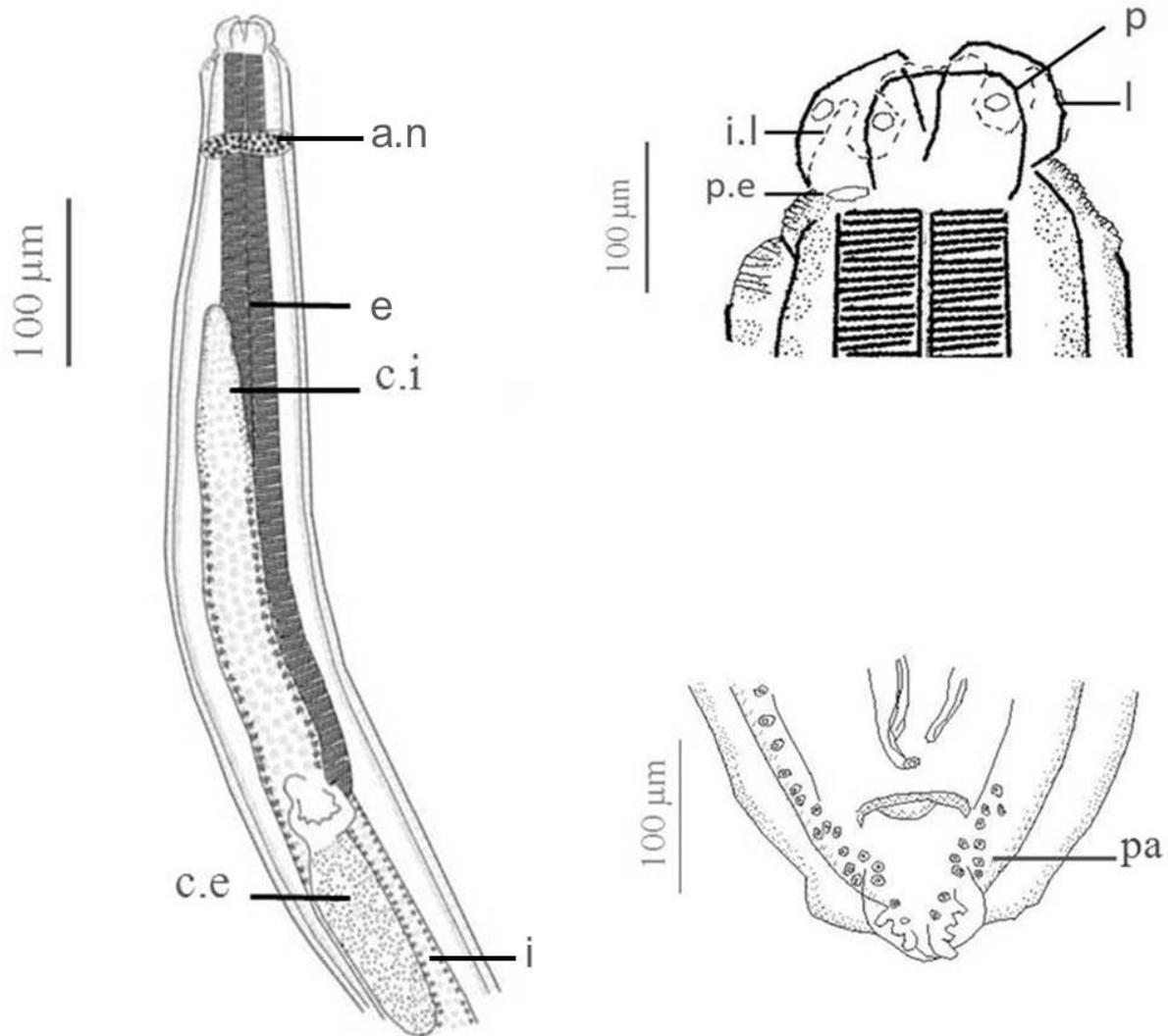


Figura 4: Esquemas de macho de *C. multipapillatum s.l.* (l) labios, (i.l) interlabios, (a.n) anillo nervioso, (e) esófago, (c.e) ciego esofágico, (c.i) ciego intestinal, (i) intestino, (pa) papilas (v) ventrículo

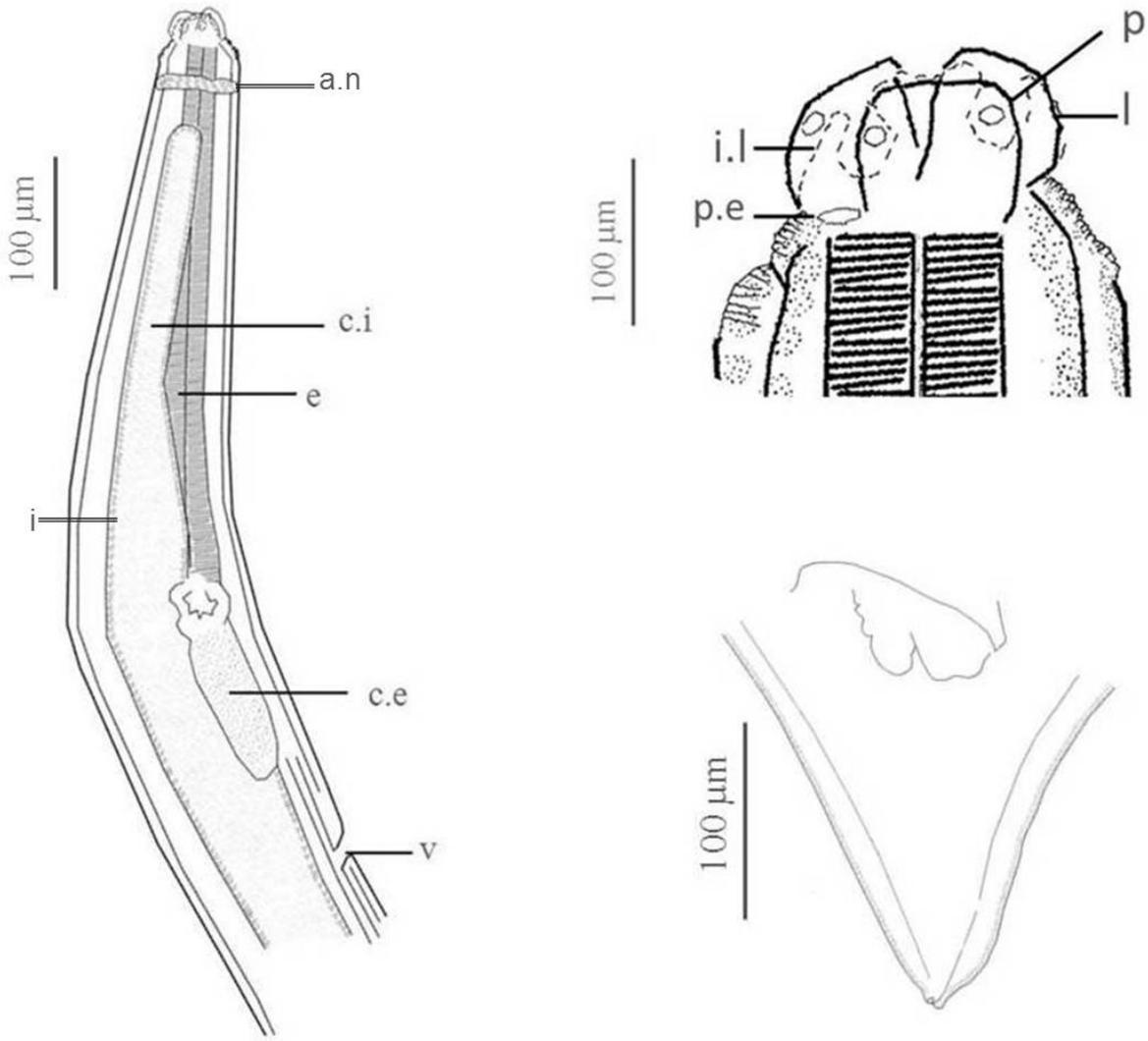


Figura 5: Esquema de hembra de *C. multipapillatum s.l.* (l) labios, (i.l) interlabios, (a.n) anillo nervioso, (e) esófago, (c.e) ciego esofágico, (c.i) ciego intestinal, (i) intestino, (v) vulva

8.3. Descripción morfológica de *C.bioccai*

Cuerpo robusto. Cutícula con estriaciones transversales marcadas en el extremo anterior del cuerpo, después de los labios y conforman el collar que delimita el cuello del cuerpo. Con 3 labios, uno dorsal con dos papilas y dos ventro-laterales con ligera depresión en el margen superior, cada uno con una papila doble, crestas dentígeras ausentes. Interlabios presentes, bien desarrollados, con punta bifurcada.

Macho. Basada en 20 ejemplares. Con una longitud total de 25.74-39.33 (32.28) y 0.69-0.96 (0.84) de ancho. El anillo nervioso apenas visible se encuentra a una distancia de 0.55-0.67 (0.61) del extremo anterior del cuerpo. Esófago 2.22-3.59 (2.74) en longitud, 0.15-0.29 (0.20) de ancho. Ciego esofágico 1.13-1.68 (1.33) de longitud. Ciego intestinal 1.92-3.16 (2.43) de longitud. Con papilas caudales de la siguiente manera: 60-62 Papilas precloacales sencillas, formando solo una línea. 2-3 papilas proximales. Dos pares de paraclacales y cuatro pares de papilas distales. Un solo par de pequeños fásmidos situados lateral a las papilas d4 (Fig.6 y Tabla 5). **Hembra.** Basada en 20 ejemplares. La longitud total es de 31.34-50.18 (41.51) y 0.83-1.07 (0.93) de ancho. Esófago 2.39-4.51 (3.24) en longitud, 0.18-0.34 (0.25) de ancho. Ciego esofágico 1.21-2.00 (1.53) de longitud. Ciego intestinal 2.16-3.33 (2.78) de longitud. Vulva ligeramente a un tercio posterior a la unión esófago-intestino. Huevos esféricos (Tabla 5).

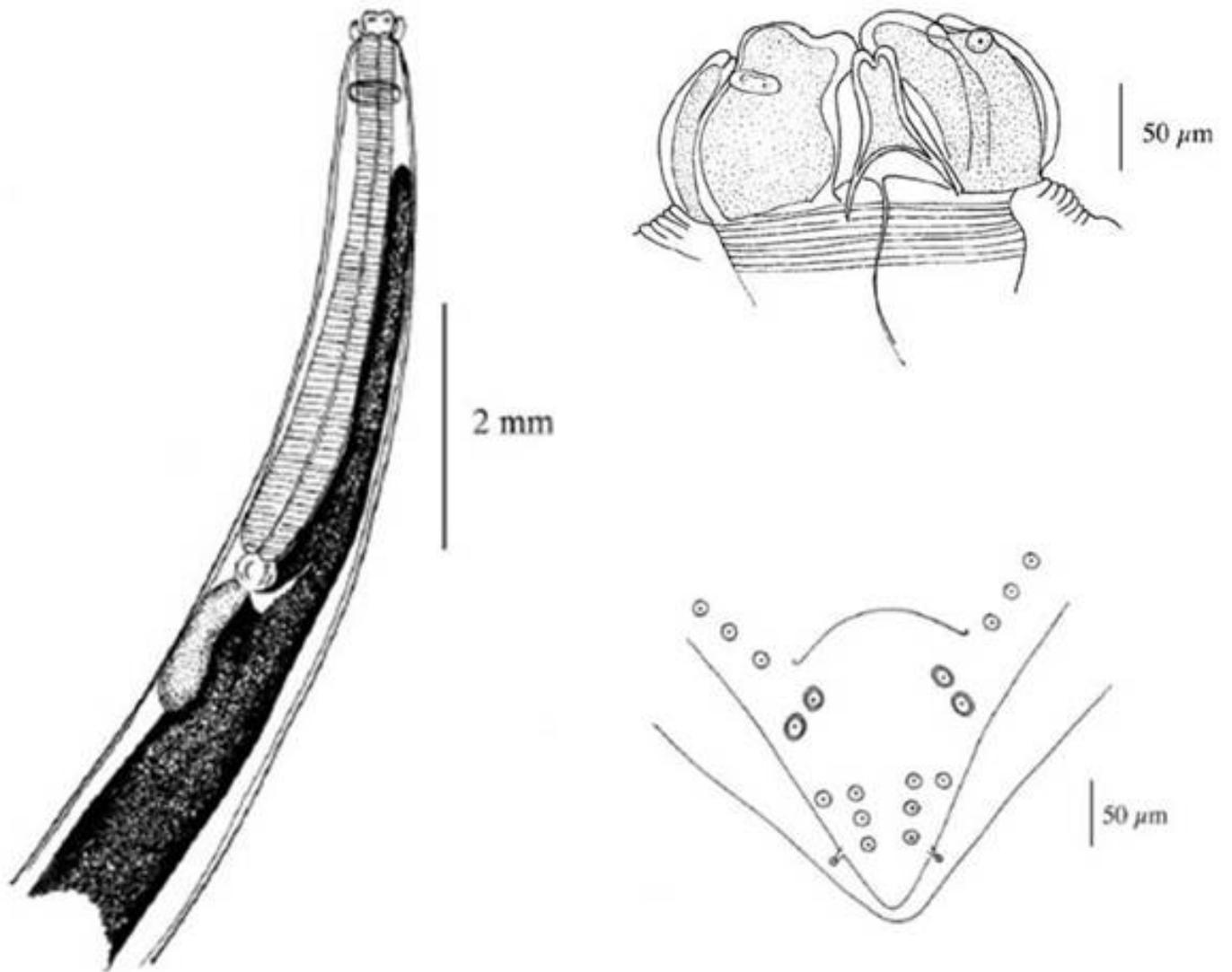


Figura 6: Esquemas de macho de *C. bioccai* Tomado de [Mattiucci et al. \(2008\)](#)

8.4. Análisis estadísticos de las diferencias morfométricas de *C. multipapillatum* y *C. bioccai*

En la prueba de comparaciones pareadas de U Mann-Whitney, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la Longitud del esófago ($W=32$; $p < 0.05$), Ancho del esófago ($W= 809$; $p < 0.05$), Ancho del ciego esofágico ($W= 906.5$ $p < 0.05$), Longitud del ciego intestinal ($W= 1539$ $p < 0.05$) y Ancho del ciego intestinal ($W= 656$ $p < 0.05$) de ambas especies (Tabla 5).

En contraste, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre sexos de *C. multipapillatum*, lo que si se observó entre machos y hembras de *C. bioccai* en las mediciones de Longitud total ($W=32$; $p < 0.05$), Ancho total ($W=72$; $p < 0.05$), Longitud del esófago ($W=108$; $p < 0.05$), Ancho del esófago ($W=86.5$; $p < 0.05$), Longitud del ventrículo ($W=126.5$; $p < 0.05$), Ancho del ventrículo ($W=155.5$; $p < 0.05$), Longitud del ciego esofágico ($W= 80$ $p < 0.05$), Longitud del ciego intestinal ($W= 106$ $p < 0.05$, Ancho del ciego intestinal ($W= 102$ $p < 0.05$), Distancia de la cloaca (ano) del extremo posterior ($W= 71$ $p < 0.05$) y Distancia del Anillo nervioso del extremo anterior ($W= 105$ $p < 0.05$) (Tabla 5).

Entre los machos de las especies se encontró diferencias en las medidas de Longitud total ($W=503$; $p < 0.05$), Longitud del esófago ($W=468.5$; $p < 0.05$), Longitud del ciego esofágico ($W= 411$ $p < 0.05$), Longitud del ciego intestinal ($W= 451.5$ $p < 0.05$, Ancho del ciego intestinal ($W= 135$ $p < 0.05$), Distancia de la cloaca del extremo posterior ($W=441$ $p < 0.05$) (Tabla 5).

En las hembras hubo diferencias en las medidas de Longitud total ($W=134$; $p < 0.05$), Ancho total ($W= 182.5$; $p < 0.05$), Ancho del esófago ($W=116.5$; $p < 0.05$), Longitud del ciego esofágico ($W= 195.5$ $p < 0.05$), Ancho del ciego intestinal ($W= 163.5$ $p < 0.05$) (Tabla 5).

8.5. Identificación molecular

Con el análisis de las secuencias del ITS-1 e ITS-2, se encontró que las especies recolectadas en las zonas de la Marina de Fidepaz y el Segundo Batallón de la Marina conforman un grupo con un porcentaje de 100 de re-muestreo (bootstrap). Estos nemátodos tienen un 13% de diferencia con los nemátodos de las zonas de Costa Baja y Punta Lobos, los que forman otro grupo con un porcentaje del 100 de re-muestreo (bootstrap). (Fig.7).

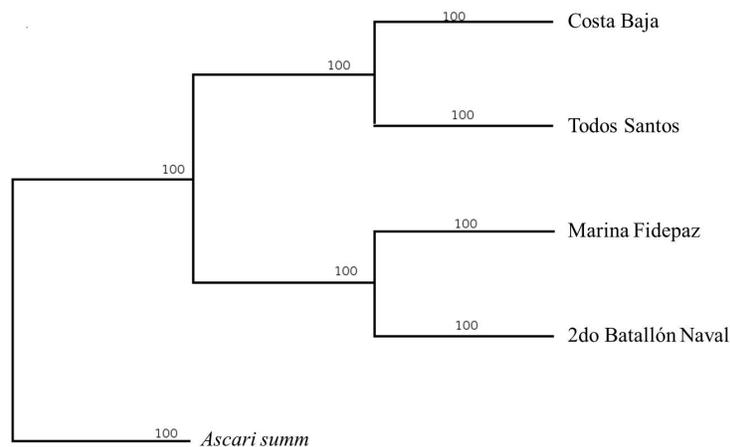


Figura 7: Árbol de similitud (Neighbor Joining) entre las diferentes zonas

El resultado de la búsqueda de secuencias en el GenBank de otros *Contracaecum*, fue que al compararlos con los nemátodos de las zonas de la segunda Zona Naval y de la Marina de Fidepaz, se agruparon con el complejo multiespecífico de *C. multipapillatum*, teniendo un porcentaje de re-muestreo (bootstrap) del 100%. En cambio, los nemátodos de las zonas de Costa Baja y Todos Santos se agrupan con una especie recientemente descrita en el Golfo de México *C. bioccai* (Mattiucci *et al.*, 2008), lo que representa un nuevo registro en la zona (Fig.8).

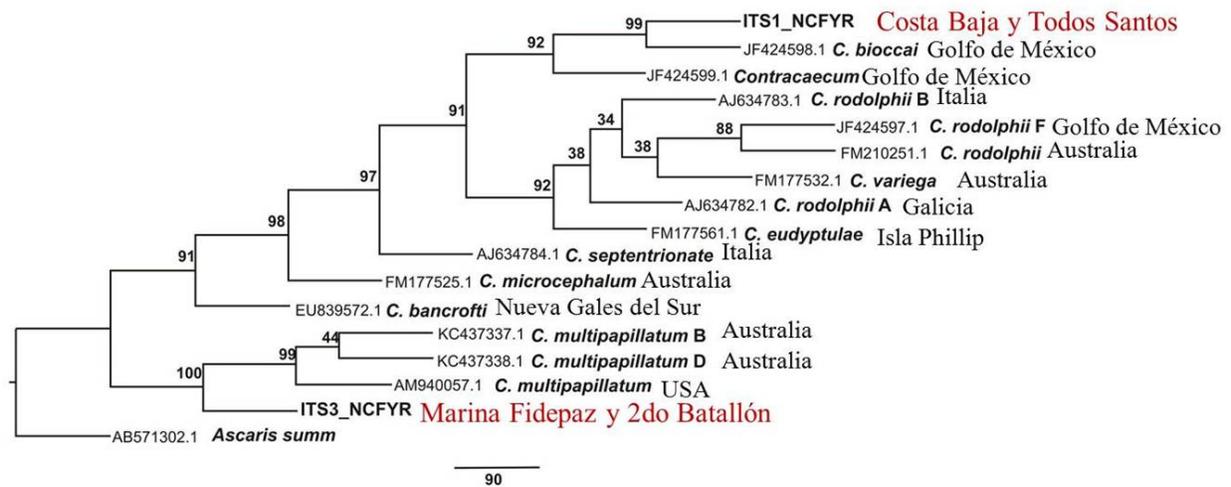


Figura 8: Árbol de similitud (Neighbor Joining) entre las diferentes especies de *Contra-caecum*

8.6. Desarrollo embrionario de *C. multipapillatum*

Los huevos fecundados de *C. multipapillatum* son redondeados u ovoideos aproximadamente miden de 65 por 58 μm . En el microscopio compuesto se pueden observar tres capas; una externa transparente, ligeramente con ondulaciones; una segunda capa gruesa quitinosa y una tercera interna que corresponde a la capa vitelina delgada (Fig. 9 a).

En el microscopio electrónico, la capa externa de los huevos, se observa lisa y conforme se van desarrollando los huevos, no se observa formación de ondulaciones (Fig. 10)

De acuerdo al diseño experimental los huevos se incubaron a 25°C en agua de mar filtrada, entre 10 y 12 días; en el segundo y tercer día se presentaron las primeras divisiones celulares y la formación de la blástula (Figs. 9 a y b). Al cuarto día inició la gastrulación (Figs. 9 c y d) y del sexto al octavo día se observó el primer estadio larvario, dentro del huevo (Fig. 9 e). Del octavo al décimo día de su incubación, las larvas

del segundo estadio eclosionaron espontáneamente presentando una etapa de vida libre (natatoria). En esta etapa la vaina cuticular del primer estadio es retenida y se asemeja a una “aleta” que ayuda a las larvas en la natación (Fig. 11). Éstas murieron entre los 5 o 7 días después de la eclosión.

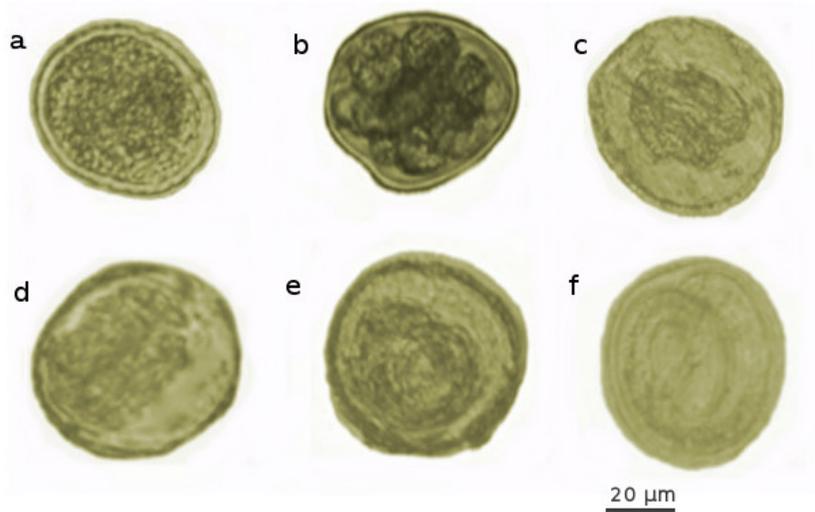


Figura 9: Desarrollo embrionario de *C. multipapillatum s.l.* a) Huevo embrionado. b) blástula al 2.^a o 3.^a día. c) Inicio de la gastrulación al 4.^a día. d) Gastrulación al 4.^a o 5.^a día. e) Larva L1 del 6.^a o 8.^a día. f) Larva L2 del 8.^a o 10.^a día.

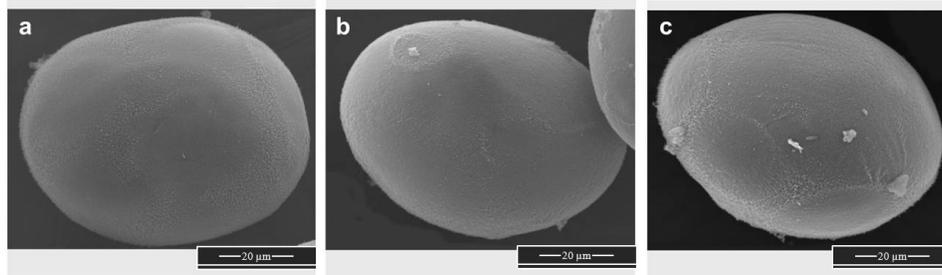


Figura 10: Micrografías en ESEM de huevos de *C. multipapillatum s.l.* a) Huevo embrionado. b) 4.^a a 5.^a días de desarrollo. c) 6.^a a 10.^a días de desarrollo.



Figura 11: Larvas L2 de *C. multipapillatum s.l.*. a) L2 ecllosionando. b) Micrografía en ESEM de la L2 con la vaina cuticular. c) Micrografía en ESEM de la L2 perdiendo la vaina cuticular

8.7. Descripción morfológica de los diferentes estadios larvarios de *C. multipapillatum*

Descripción de la larva del segundo estadio (L2)

Basada en 10 ejemplares. Las larvas son delgadas, alargadas y miden 0.28 – 0.32 (0.29) con un grosor de 0.021- 0.038 (0.032). Ya está desarrollado el diente cuticular ventral los labios. El anillo nervioso apenas visible, a una distancia de 0.025 – 0.057 (0.041) del extremo anterior del cuerpo. El esófago con una longitud 0.036 – 0.067 (0.044) y un ventrículo glandular pequeño. El intestino lleno con un material granulado, con una longitud 0.12- 0.14 (0.13). El ciego intestinal no desarrollado y el ciego esofágico presente muy delgado y se extiende paralelo al intestino con una longitud 0.027 – 0.037 (0.033). Muda del primer estadio larvario presente (Fig.12).

Descripción de la larva del tercer estadio (L3)

Basada en 10 ejemplares. Cuerpo de forma cilíndrica con extremo anterior más romo que el posterior, el cual es cónico terminando en una punta denominada mucrón. La longitud total es de 18.92 – 24.37 (21.66) con un grosor de 0.080 – 0.098 (0.84). La cutícula es gruesa con finas estriaciones transversales en el extremo anterior del cuerpo, después de los labios que conforman el collar que delimita el cuello del cuerpo. Presencia de 3 labios de forma redondeada, un dorsal con dos papilas y dos subventrales cada uno con una papila, entre la base de estos últimos se encuentra situado un diente cuticular cónico. El poro excretor abre posterior al diente. El anillo nervioso se encuentra a una distancia de 0.22 – 0.47 (0.35) del extremo anterior del cuerpo. El tubo digestivo está conformado por un esófago muscular en su mayor extensión y un ventrículo glandular pequeño y esférico con una longitud total de 2.81 – 4.01 (3.32) y de ancho 0.10 – 0.19 (0.13). Del ventrículo parte el ciego esofágico con una longitud de 0.80 – 1.8 (1.13). El

intestino expone un ciego anterior con una longitud de 2.2 – 3.2 (2.6) más grande que el ciego esofágico. El intestino termina en el recto y ano, donde se observan 3 glándulas rectales. El ano está situada a una distancia de 1.2 – 2.5 (1.8) del extremo posterior (Fig.13).

Descripción de la larva del cuarto estadio (L4)

Basada en 10 ejemplares. Cuerpo robusto. Cutícula con estriaciones transversales en el extremo anterior del cuerpo, después de los labios que conforman el collar que delimita el cuello del cuerpo. Presencia de 3 labios, uno dorsal con una doble papila y dos ventrolaterales con ligera depresión en el margen superior, cada uno con una papila doble, crestas dentígeras ausentes. Poro excretor en la base del labio dorsal. La longitud total es de 30.50-38.44 (36.42) y de ancho 0.96-1.18 (1.07). El anillo nervioso apenas visible se encuentra a una distancia de 0.59-0.70 (0.64) del extremo anterior del cuerpo. Esófago 3.20-3.82 (3.50) en longitud, 0.17-0.22 (0.20) de ancho. Ciego esofágico 1.60-2.00 (1.91) de longitud. Ciego intestinal 2.15-2.68 (2.30) de longitud. Intestino 22.06-25.74 (23.57). Los machos con espículas 1.90-2.40 (2.25), pero sin papilas caudales (Fig.14)

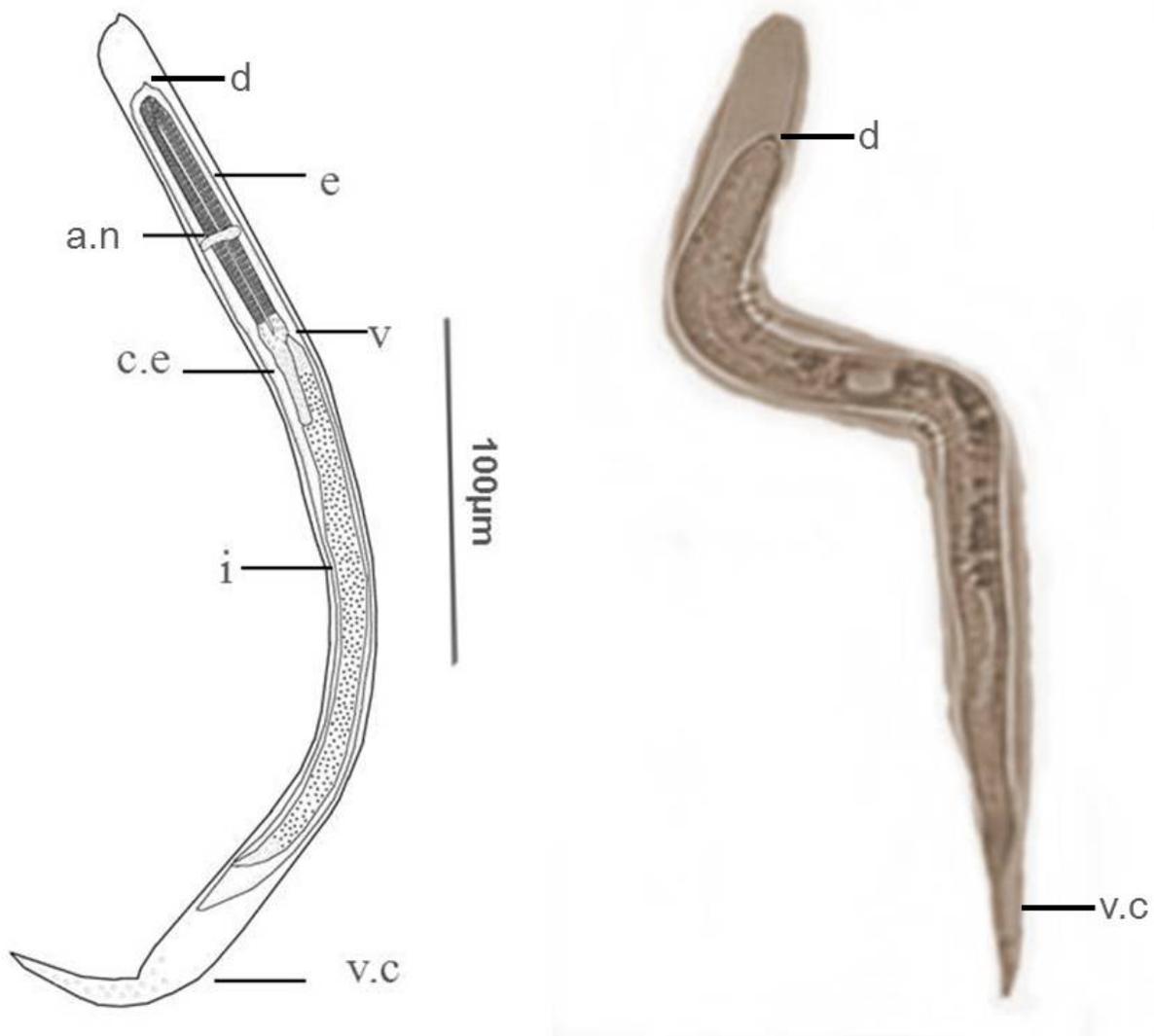


Figura 12: Esquemas de la larva L2 de *C. multipapillatum s.l.* (d) diente cuticular, (a.n) anillo nervioso, (e) esófago, (c.e) ciego esofágico, (i) intestino, (v) ventrículo, (v.c) vaina cuticular

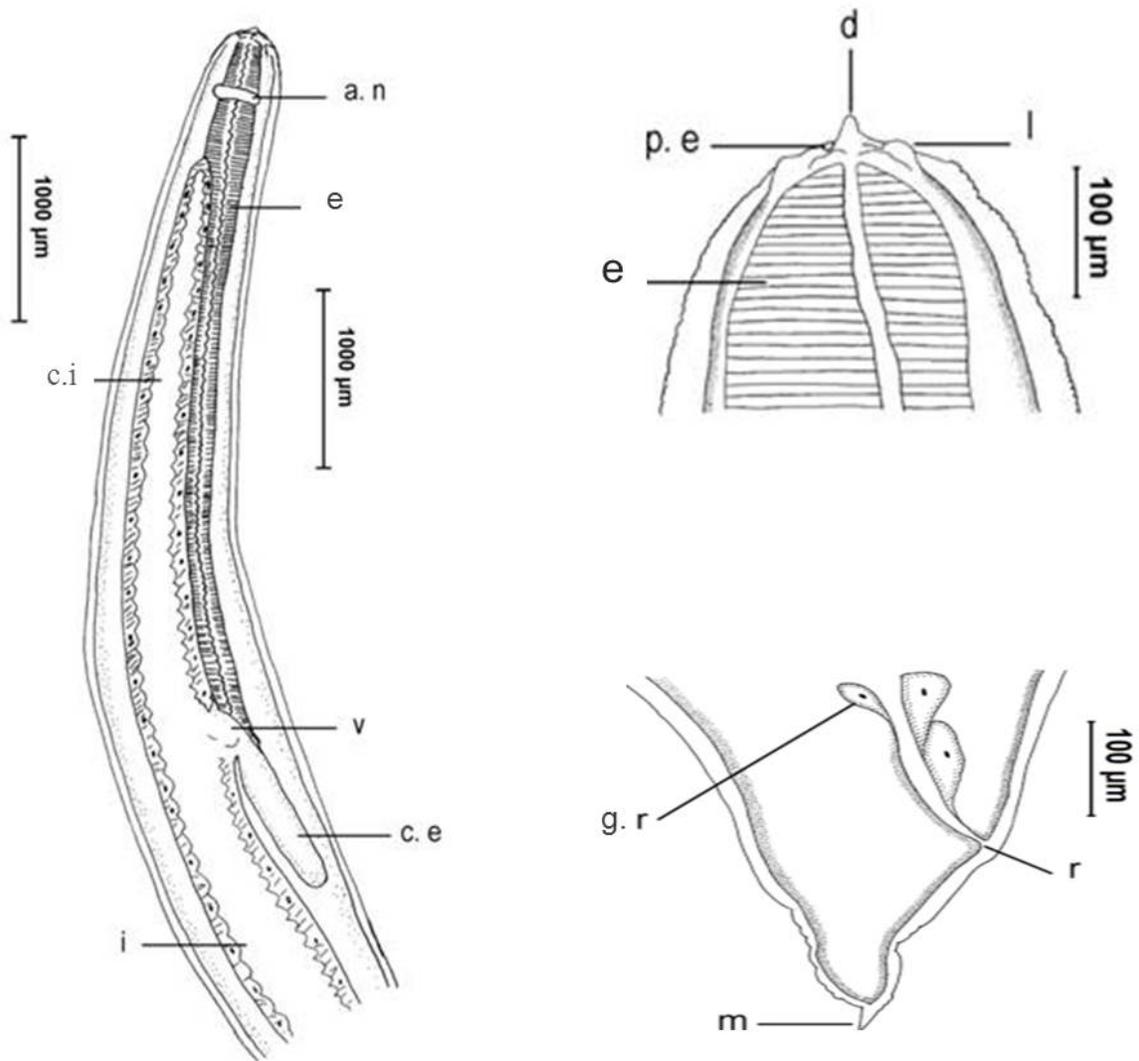


Figura 13: Esquemas de la larva L3 de *C. multipapillatum s.l.* (d) diente cuticular, (a.n) anillo nervioso, (l) labios, (e) esófago, (c.e) ciego esofágico, (c.i) ciego intestinal, (i) intestino, (v) ventrículo, (m) mucrón, (r) recto, (g.r) glándulas rectales

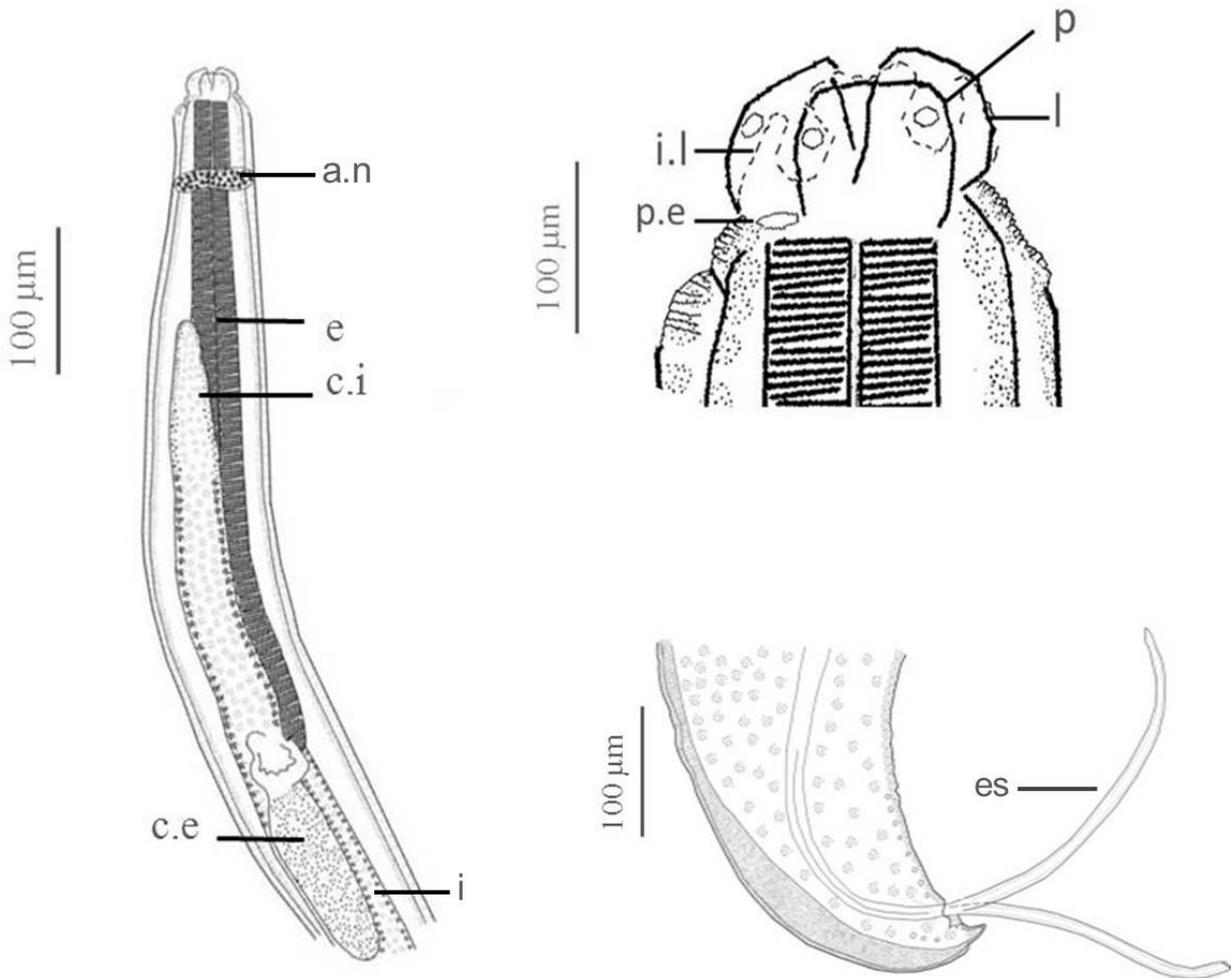


Figura 14: Esquemas de la larva L4 de *C. multipapillatum s.l.* (a.n) anillo nervioso, (l) labios, (e) esófago, (c.e) ciego esofágico, (c.i) ciego intestinal, (i) intestino, (v) ventrículo, (es) espícula.

8.8. Experimentos de infección en copéodos

Se observó que la larva L2 se adhieren con la ayuda del extremo posterior de la vaina cuticular en las antenulas de tres especies de copéodos de la Bahía de La Paz expuestas al experimento: *Acartia clausi*, *A. lilljeborgi* y *Centropages furcatus*, debido que la invasión de la L2 fue en la superficie de los copéodos, se usa el término de infestación (Fig.15). Por el contrario, en *Pseudodiaptomus euryhalinus* no se registró infestación o infección.



Figura 15: Copéodos infestados con *C. multipapillatum s.l.* a) *A. lilljeborgi*. b) *C. furcatus* (L2) larva del segundo estadio y (An) Antenula. Aumento 20X y 40X

La mayor prevalencia de parasitismo e intensidad media de infestación se registró en *C. furcatus* y se observó que conforme aumenta la concentración de huevos, la prevalencia es mayor y la intensidad media de infestación incrementa. En cambio en *A. clausi* y *A. lilljeborgi*, aunque la prevalencia aumenta según la concentración de huevos, la intensidad media de infección se mantiene en una larva por copéodo (Tabla 2).

Tabla 2: Indicadores parasitológicos de copépodos en tres concentraciones de huevos de *C. multipapillatum*

Especies	P%			I		
	50	100	150	50	100	150
<i>Acartia clausi</i>	47	67	93	1	1	1
<i>Acartia lilljeborgi</i>	33	40	93	1	2	1
<i>Centropages furcatus</i>	80	100	100	3	4	5

P: Prevalencia, I: Intensidad media de infestación.

El análisis de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$) (Fig. 16) mostró que la cantidad de larvas adheridas por copépodo es diferente y fue dependiente de la concentración de huevos. Los tratamientos que son diferentes en *A. clausi*, *A. lilljeborgi* y *C. furcatus* son la concentración de 50 y 150 huevos. El análisis de la prueba estadística de Nemenyi mostró que en *C. furcatus* tuvo diferencias específicas en las concentraciones de 50 y 100 huevos (Tabla 3).

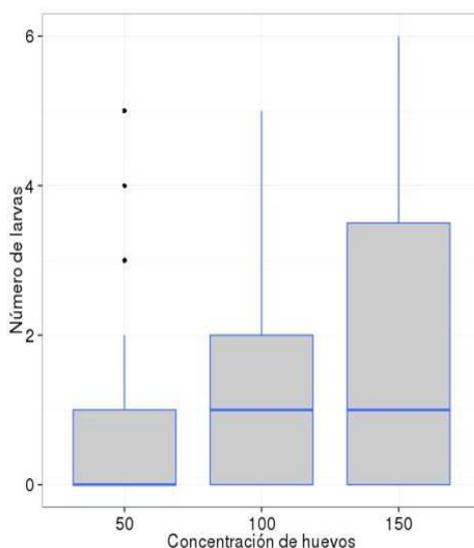


Figura 16: Análisis de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$) de las diferentes concentraciones de huevos de *C. multipapillatum*

Tabla 3: Concentraciones de huevos de *C. multipapillatum* significativamente diferentes, de acuerdo a la prueba estadística *post hoc* Nemenyi

Especies	Concentración de huevos		
	50	100	150
<i>Acartia clausi</i>		*	
<i>Acartia lilljeborgi</i>		*	
<i>Centropages furcatus</i>	*	*	

* Concentraciones de huevos que son diferentes.

Esto coincide con los indicadores parasitológicos, ya que conforme aumenta la concentración de huevos, es mayor la prevalencia en los copépodos.

8.9. Experimentos de infección de nemátodos en copéodos del Mediterráneo, España

En el caso de los experimentos con los copéodos del Mediterráneo *Calanus helgolandicus*, *Centropages typicus* y *Acartia* sp., no se encontraron infestaciones o infecciones, pero si se observó que las larvas L2 se agruparon entre ellas, uniéndose del extremo posterior de la vaina cuticular (Fig. 17).

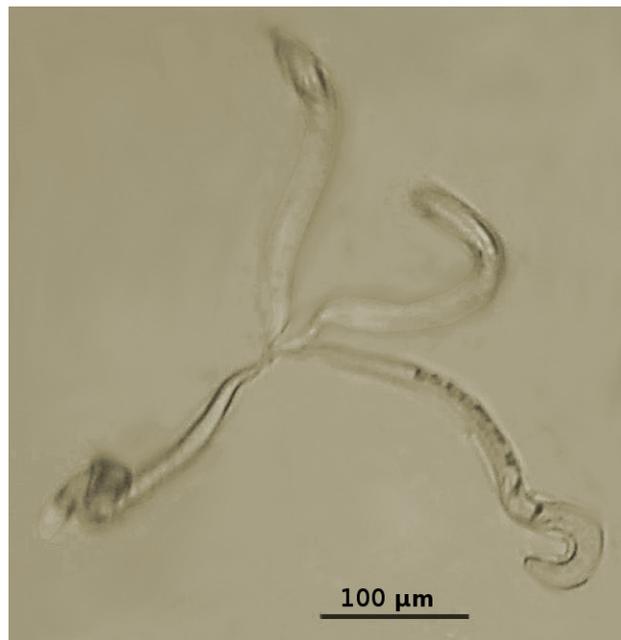


Figura 17: Larvas L2 de *C. multipapillatum* adheridas entre ellas

Con el propósito de identificar el tipo de compuesto que actúa como cementante entre las larvas y las antenas de los copéodos, se hicieron pruebas histoquímicas entre las cuales la tinción histoquímica con el colorante Azul alcian + PAS, dio positivo en la identificación de mucopolisacáridos neutros (Tabla 4 y Fig. 18); esta sustancia podría ser una de las que constituyen los productos de secreción, para que la larva L2 se adhieran en las antenas de los copéodos o entre ellas.

Tabla 4: Acción de las soluciones para mucopolisacáridos

Mucopolisacáridos	Tipo	Reactivo	Color positivo
Ácidos	Sulfomucinas	Azul alcian (pH 0.3-0.5)	Azul
Ácidos	Sialomucinas	Azul alcian (pH 2.5) + PAS	Rojo púrpura a azul
Neutros		Azul alcian (pH 2.5) + PAS	Rojo a rojo púrpura



Figura 18: Larvas L2 de *C. multipapillatum* teñida con Azul alcian + PAS

9. DISCUSIÓN

La literatura establece un buen número de intentos para determinar cómo es el ciclo de vida de los Anisákidos (Huizinga 1967; Koie & Fagerholm 1995; Moravec 2009), pero aún no se logrado describir en ambientes marinos el ciclo de vida de *C. multipapillatum*, el cual parasita peces y aves, entre otros organismos, por lo que en este trabajo se ha abordado una porción del ciclo de vida de esta especie, mediante la infección experimental de copépodos. Y a continuación se discutirá ampliamente.

En este trabajo el desarrollo embrionario de *C. multipapillatum s.l.* en *Pelecanus occidentalis*, fue observado con las primeras divisiones celulares, la formación de la gástrula, del primer estadio larvario dentro del huevo, del segundo estadio larvario cubierto por una vaina cuticular y la eclosión de éste espontáneamente, teniendo una fase de vida libre. Lo anterior coincide con las etapas y los tiempos encontrados por Huizinga (1967) en el ciclo de vida de *C. multipapillatum* en el pato de agua (*Anhinga anhinga leucogaste*), donde los huevos se incubaron a 21°C en comparación a los 25°C de nuestros experimentos; otras observaciones de Huizinga (1967) fueron que del primer al tercer día inician las primeras divisiones y la formación de la gástrula, en agua de grifo a partir del cuarto al quinto día observó el primer estadio larvario y del quinto al séptimo día al segundo estadio larvario y eclosiona; en contraste, en agua de mar, nuestros resultados registraron que del séptimo al décimo día, la larva L2 eclosiona teniendo una fase de vida libre. Como puede observarse, la duración del desarrollo embrionario de *C. multipapillatum s.l.* en el mar dura aproximadamente diez días en condiciones térmicas más cálidas, lo que coincide con la tendencia general en los metazoarios de prolongar los estadios de desarrollo cuando la temperatura ambiental o del mar se incrementa.

En *C. aduncum* y *C. osculatum* el desarrollo embrionario es similar en los tiempos de la formación de las diferentes etapas que los de este trabajo; con una excepción, Markowski (1937) menciona que el segundo estadio larvario envainado de *C. aduncum*,

eclosiona hasta que es ingerido por copépodos que son infectados experimentalmente, mientras que las larvas de *C. multipapillatum s.l.* eclosionan espontáneamente y tienen una fase de vida libre. En *C. osculatum*, Koie & Fagerholm (1993) proponen que las larvas que están totalmente desarrolladas en los huevos, están rodeadas por dos cutículas, lo que revela dos ecdisis previas y, por lo tanto, las larvas que eclosionan son del tercer estadio. En este trabajo no se observaron las dos cutículas, sólo el segundo estadio larvario cubierto con la vaina cuticular del primer estadio (Fig.12), posiblemente éste muda al tercer estadio hasta llegar a los primeros hospederos intermediarios.

Las larvas del segundo estadio larvario de *C. multipapillatum s.l.*, como se mencionó anteriormente tienen una fase de vida libre; posiblemente la vaina cuticular es una adaptación que le ayuda a flotar y permite que siga un ciclo de vida pelágico. Esto también lo han encontrado otros autores como Koie & Fagerholm (1993) donde las larvas eclosionadas de *C. osculatum* son capaces de nadar con la ayuda de la vaina cuticular, la cual tiene extensiones laterales, por lo que proponen que es una adaptación a condiciones pelágicas. En consecuencia, los primeros hospederos intermediarios de *C. multipapillatum*, en el mar probablemente son organismos pelágicos.

En infecciones experimentales con *Contracaecum*, se han utilizado organismos del zooplancton dulceacuícolas y marinos, y los que han tenido mayor éxito en su infección son los copépodos. Koie & Fagerholm (1995) infectaron experimentalmente a copépodos Calanoides y el segundo estadio larvario de *C. osculatum* se encontró en el hemocele de los copépodos, otro caso es el trabajo de Dziekońska-Rynko & Rokicki (2007) que infectaron a copépodos Ciclopoides con *C. rudolphii*, donde el segundo estadio se observó en antenas y el hemocele. Esto difiere con los resultados de este trabajo, ya que las especies de copépodos utilizadas en los experimentos son Calanoides *A. clausi*, *A. lilljeborgi* y *C. furcatus* fueron infestadas con larvas de *C. multipapillatum* y se encontraron sujetadas en las antenas, aunque en estas etapas larvarias de los anisákidos aún no existe una especificidad hospedatoria (Anderson, 2000), es posible que haya un reconocimiento específico, ya que los otros copépodos utilizados en los experimentos, no presentaron

infección o infestación.

Se observó que conforme se aumentó la concentración de huevos de *C. multipapillatum*, la prevalencia aumentó en *A. clausi*, *A. lilljeborgi* y *C. furcatus*. Y la intensidad media de infestación en *C. furcatus* fue de 3 a 5 larvas por copépodo (Tabla 2), lo que puede deberse a que el experimento se diseñó para aumentar la probabilidad de contacto con las larvas y se favoreciera la infección. Sin embargo, en infecciones naturales por helmintos, generalmente se encuentran una sola larva en sus hospederos copéodos y de acuerdo con Scholz (1999) esto parece ser la regla general en las infecciones naturales, no así en las experimentales (Morais-Falavigna *et al.*, 2003).

Además, las pruebas histoquímicas, revelaron la presencia de mucopolisacaridos neutros en las larvas de *C. multipapillatum*, componente que podría constituir los productos de secreción de las larvas L2, para la fijación y reconocimiento a los hospederos intermediarios o paraténicos, como es el caso de las especies de copéodos de este trabajo, lo que coincide con las larvas L3 de los Estrongílidos, que han desarrollado un comportamiento de fototaxismo, geotaxismo, magnetotaxismo, respuestas a sombras, entre otros para orientarse hacia ambientes específicos donde es mayor la posibilidad de encontrar al hospedero (Orihuela & Vázquez-Prats, 2008).

Esta preferencia de las larvas de *C. multipapillatum* sujetarse en *A. clausi*, *A. lilljeborgi* y *C. furcatus* con la ayuda del extremo posterior de la vaina cuticular, puede ser un indicio de una adaptación que, además de ayudarlas a nadar, les permita adherirse a un sustrato, como estrategia para ser ingeridos por peces mediante la disminución de la velocidad de natación de los copéodos y así poder ser ingeridos para completar su ciclo de vida. Este tipo de comportamiento se ajusta a la explicación de Lafferty (1999) en términos de que podrían causar un incremento en la transmisión trófica del parásito (PITT) a través de la modificación de la conducta del hospedero, aprovechando caracteres sexuales secundarios o la liberación de alguna extremidad, que en este caso podría causar alteraciones en el comportamiento del desplazamiento de los copéodos o también la

afectación de algunas de sus capacidades sensoriales, que los haga vulnerables a la depredación. Lafferty (1999) cita el trabajo de Urdal *et al.*, 1995 donde se ha notado un cambio en la conducta de los copépodos infectados con céstodos, y aunque no se encontraron diferencias estadísticas en el consumo de copépodos infectados y no infectados, Lafferty (1999) indica que esto se puede deber a una subestimación de la modificación conductual o a errores del diseño experimental.

El encontrar en este trabajo que las larvas de *C. multipapillatum* infestan a los copépodos, sugiere que el primer hospedero sea otra especie, o bien que la larva, al tener una fase de vida libre y adherirse a un sustrato, sea la causa para aumentar la transmisión trófica del parásito en el sentido que postula Lafferty (1999) y, por lo tanto, las especies de copépodos (*A. clausi*, *A. lilljeborgi* y *C. furcatus*) sean hospederos de transporte dentro del ciclo de vida de *C. multipapillatum* y que éste tenga diferentes vías para llegar a los hospederos secundarios y terciarios.

Tomando en consideración la evidencia publicada y los resultados de este trabajo de experimentación, es posible que el ciclo de vida tenga las etapas siguientes: **a)** El hospedero definitivo es *Pelecanus occidentalis*, que al defecar sobre el mar libera huevos embrionados con el primer estadio larvario (L1). **b)** Los huevos se desarrollan al segundo estadio (L2), esta larva eclosiona y tiene una fase de vida libre, cubierta por una vaina cuticular. **c)** En esta parte del ciclo puede haber 3 posibles vías: **1)** La larva L2 es comida por el primer hospedero intermediario obligatorio. **2)** La larva L2 se fija a *A. clausi*, *A. lilljeborgi* y *C. furcatus*, para ser transportada al primer hospedero intermediario **3)** La fase de vida libre del segundo estadio (L2) es ingerida directamente por peces. **d)** *Mugil curema* y *Mugil cephalus* son el segundo hospedero intermediario y estos peces son comidos por el hospedero definitivo (Fig. 19).

Este ciclo podría explicar la amplia gama de hospederos diferentes que se han registrado en *C. multipapillatum*, y puede ser visto como la razón para el éxito de este parásito para llegar a su hospedero definitivo en un ambiente marino.

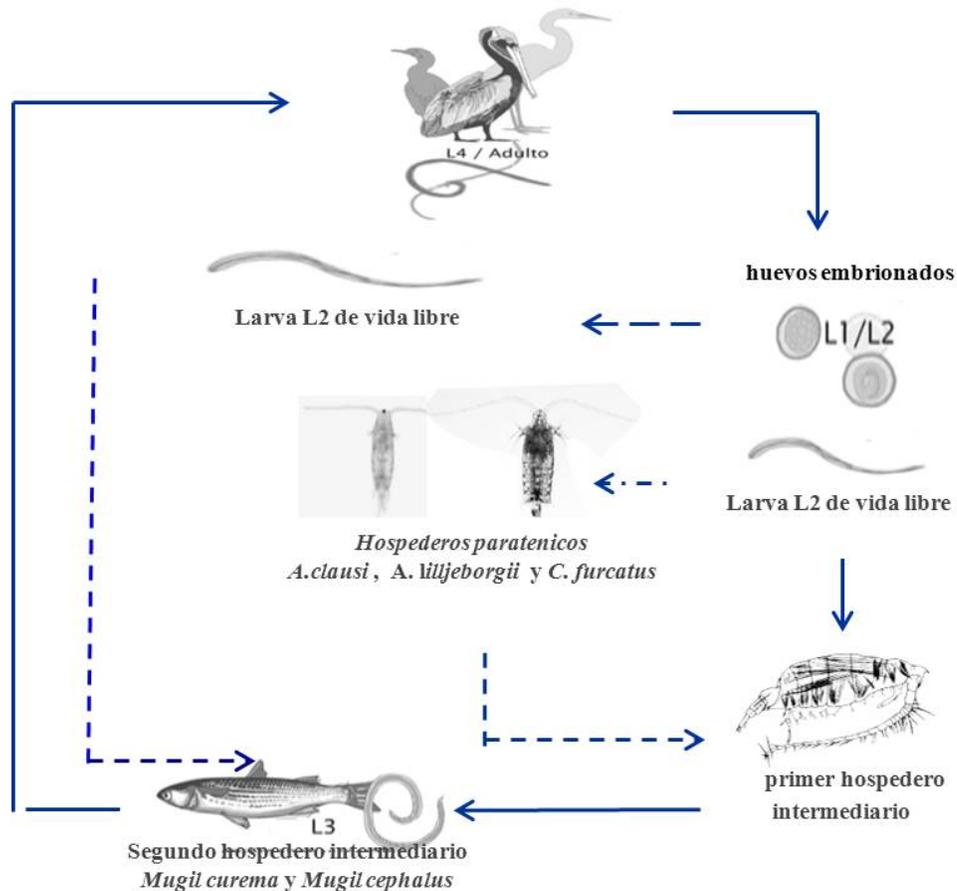


Figura 19: Representación esquemática del posible ciclo de vida pelágico de *Contracaecum multipapillatum* s.l. (modificado de Salazar-Bermúdez (2011))

Identificación morfológica y molecular

Algunas de las características diagnósticas utilizadas en la identificación morfológica de las especies de Anisákidos, carecen de valor interespecífico, por lo que el uso de herramientas moleculares ha cobrado gran importancia para la identificación de los parásitos, permitiendo la descripción de nuevas especies en las últimas dos décadas (Mattiucci & Paoletti 2010; Shamsi *et al.* 2009).

En este trabajo se utilizó la descripción morfológica basada en mediciones morfomé-

tricas y ha sido complementada con análisis molecular, debido a que *C. multipapillatum* ha sido considerado un complejo multiespecífico, dentro del cual la tarea de la determinación de las diferentes especies es compleja (Labriola & Suriano, 1996).

Las secuencias de ADN ribosomal del primer (ITS-1) y segundo (ITS-2) espaciador transcrito interno obtenido de los nemátodos de cada pelícano indican la presencia de dos especies: *C. multipapillatum* y *C. biocai*. Esta última especie ha sido recientemente descrita por Mattiucci *et al.* (2008) en el Golfo de México. Estos autores mencionan que pertenece a un taxón claramente diferenciado de las especies hermanas reconocidos previamente dentro del complejo *C. multipapillatum*. El hallazgo de esta especie en las zonas de estudio en este trabajo (Punta Lobos y Costa Baja), representaría un nuevo registro de localidad. Sin embargo, es necesario corroborar esta hipótesis utilizando otros marcadores como el COX2 y el COI.

Mattiucci *et al.* (2008) diferencian a los especímenes de *C. multipapillatum* de *C. biocai* basados en el número de papilas paraocales, el patrón de distribución de las papilas y longitud de las espículas de los machos. Tales caracteres se han expuesto en estudios anteriores como criterios útiles para la identificación de nemátodos Anisákidos (Fagerholm, 1991). En este trabajo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las medidas morfométricas entre especies, (Tabla 5), por lo que podría considerarse como caracteres útiles para la discriminación de las dos especies.

Sin embargo, algunos rangos de las mediciones morfométricas se traslapan (Tabla 5) y se convierten en características ambiguas. Esto puede ser porque estos helmintos se ven afectados por factores de selección muy similares, causando la conservación de las características morfológicas y muchas de éstas parecen ser altamente homoplásicas o representan estados morfológicos ancestrales (Mattiucci & Nascetti, 2008) por lo que se sugiere que se base a las características propuestas por Mattiucci *et al.* (2008) para su identificación.

Cuando los análisis estadísticos de las mediciones morfométricas se hicieron, se asu-

mió que el hospedero tenía solo una especie de *Contracaecum*, pero los resultados indicaron la presencia de dos especies en el mismo hospedero definitivo, *P. occidentalis*, lo que significa que ambas especies pudieran tener un ciclo de vida similar, donde involucran principalmente a los primeros hospederos intermediarios.

9.1. CONCLUSIONES

- Por medio de las infecciones experimentales de los copépodos Calanoides, se observó el desarrollo embrionario de *C. multipapillatum* y la formación de sus primeras etapas larvianas, la cual tiene un tiempo de eclosión de 10 días incubados a 25°C.
- *A. Clausi*, *A. lilljeborgi* y *C. furcatus* pueden actuar como hospederos paraténicos de *C. multipapillatum* debido a la adhesión de la larva L2 en sus antenas.
- Es probable que *C. multipapillatum* posee un reconocimiento químico para encontrar y adherirse a su primer hospedero intermediario o paraténico.
- El ciclo de vida de *C. multipapillatum*, puede tener varias vías de transmisión a sus primeros hospederos intermediarios para llegar al hospedero definitivo (*P. occidentalis*).
- El análisis molecular permitió identificar a: *C. multipapillatum* y *C. bioccai*, donde ésta última es un nuevo registro en la zona de estudio.

9.2. RECOMENDACIONES

- Continuar con las infecciones experimentales con otras especies del zooplancton, que puedan actuar como primer hospedero intermediario de *C. multipapillatum*.
- Probar experimentalmente, si a través de las infestaciones de los copépodos: *A. Clausi*, *A. lilljeborgi* y *C. furcatus*, se pueda transmitir la larva L2 de *C. multipapillatum* a peces juveniles y adultos.
- Realizar un estudio, para la búsqueda de infecciones naturales de *C. multipapillatum* a organismos del zooplancton.
- Determinar que otros componentes conforman los productos de secreción de la larva L2 de *C. multipapillatum* , que le ayudan a la adhesión y al reconocimiento de *A. clausi*, *A. lilljeborgi* y *C. furcatus*.

Bibliografía

- Anderson, R. C. 2000. *Nematode Parasites of Vertebrates. Their Development and Transmission*. CABI Publishing, London, 2 a.ed., 650 p.
- Anderson, R. C., A. G. Chabaud & S. Willmott. 1974. *CIH Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates*. CAB International, Wallingford, UK, 463 p.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith & K. Struhl. 2002. *Short protocols in molecular biology: A compendium of methods from current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc, EUA. ISBN 047150338X.
- Bush, A. O., K. D. Lafferty, J. M. Lotz & A. W. Shostak. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *The Journal of Parasitology*, 83(4):575–583.
- Cabrera, R. & M. D. P. Trillo-Altamirano. 2004. Contribución especial: Anisakidosis : ¿Una zoonosis parasitaria marina desconocida o emergente en el Perú? *Revista de Gastroenterología del Perú*, 24:335–342.
- Cheng, T. C. 1982. Hanbook series in zoonoses: parasitic zoonoses. p. 37–52. En: *Anisakiasis*, tomo 2. CRC Press, Florida.
- De, N. C. & R. N. Maity. 1999. Larval development of *Onchocamallanus bagarii* (Nematoda: Camallanidae) in copepods. *Folia Parasitologica*, 46:53–58.

- Deardorff, T. L. & R. M. Overstreet. 1980. *Contracaecum multipapillatum* (= *C. robustum*) from fishes and birds in the northern Gulf of Mexico. *The Journal of Parasitology*, 66(5):853–856.
- Dobson, A., K. D. Lafferty, A. M. Kuris, R. F. Hechinger & W. Jetz. 2008. Homage to Linnaeus: How many parasites? How many hosts? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(1):11482–11489.
- Dziekońska-Rynko, J. & J. Rokicki. 2007. Life cycle of the nematode *Contracaecum rudolphii* Hartwig, 1964 (*sensu lato*) from northern Poland under laboratory conditions. *Helminthologia*, 44(3):95–102. ISSN 0440-6605. doi:10.2478/s11687-007-0013-9.
- Fagerholm, H. P. 1991. Systematic implications of male caudal morphology in ascaridoid nematode parasites. *Systematic Parasitology*, 19:215–228.
- Hernández-Gómez, R. E., L. J. Rangel-Ruiz & S. López-Jiménez. 2008. Registro de la larva del tercer estadio avanzado de *Gnathostoma* sp (Nematoda: Gnathostomatidae) en la cuenca del río Usumacinta, Tabasco, México. *Universidad y Ciencia*, 24(1):61–65.
- Huizinga, H. W. 1967. The life cycle of *Contracaecum multipapillatum* (VON DRASCHE, 1882) Lucker, 1941 (Nematoda: Heterochelidae). *The Journal of Parasitology*, 53(2):368–375.
- Huys, R. & G. A. Boxshall. 1991. *Copepod Evolution*. The Ray Society, Londres, 468 p.
- Koie, M. & H. P. Fagerholm. 1993. Third-stage larvae emerge from eggs of *Contracaecum osculatum* (Nematoda, Anisakidae). *The Journal of Parasitology*, 79(5):777–780.
- Koie, M. & H. P. Fagerholm. 1995. The life cycle of *Contracaecum osculatum* (Rudolphi, 1802) *sensu stricto* (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae) in view of experimental infections. *Parasitology Research*, 81:481–489. ISSN 0932-0113.
- Labriola, J. & D. M. Suriano. 1996. Parasitic nematodes of birds from De Monte Pond, Buenos Aires, Argentina. *Boletín Chileno de Parasitología*, 51:59–67.

- Lafferty, K. D. 1999. The evolution of trophic transmission. *Parasitology Today*, 15(3):111–115.
- Marcogliese, D. J. 2005. Parasites of the superorganism: are they indicators of ecosystem health? *International Journal for Parasitology*, 35:705–16. ISSN 0020-7519. doi:10.1016/j.ijpara.2005.01.015.
- Markowski, S. 1937. Über die Entwicklungsgeschichte und Biologie des Nematoden *Contraecum aduncum* (Rudolphi, 1802). *Bulletin International de l'Academie des Sciences de Polonia. Classe des Sciences Mathematiques et Naturelles*, 2:227–247.
- Martoja, R., M. Martoja-Pierson & P. P. GraGra. 1970. *Técnicas de Histología Animal*. Toray-Masson, Barcelona, España, 350 p.
- Mattiucci, S. & G. Nascetti. 2008. Advances and trends in the molecular systematics of Anisakid nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host-parasite co-evolutionary processes. *Advances in Parasitology*, 66:47–148. ISSN 0065-308X. doi:10.1016/S0065-308X(08)00202-9.
- Mattiucci, S. & M. Paoletti. 2010. *Contraecum gibsoni* n. sp. and *C. overstreeti* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) from the Dalmatian pelican *Pelecanus crispus* (L.) in Greek waters: genetic and morphological evidence. *Systematic Parasitology*, 75:207–224. doi:10.1007/s11230-009-9220-8.
- Mattiucci, S., M. Paoletti, J. Olivero-Verbel, R. Baldiris, B. Arroyo-Salgado, L. Garbin, G. Navone & G. Nascetti. 2008. *Contraecum bioccai* n. sp. from the brown pelican *Pelecanus occidentalis* (L.) in Colombia (Nematoda: Anisakidae): morphology, molecular evidence and its genetic relationship with congeners from fish-eating birds. *Systematic Parasitology*, 69:101–121. doi:10.1007/s11230-007-9116-4.
- Meyers, T. R. 1990. Diseases of Crustacea. Diseases caused by Protistans and Metazoans. p. 368–371. En: Kinne, O. (Ed.) *Diseases of marine animals. Volume III. Intro-*

duction, Cephalopoda, Annelida, Crustacea, Chaetognatha, Echinodermata, Urochordata. Biologische Anstalt Helgoland.

Mhaisen, F. T., N. K. Al-Salim & N. R. Khamees. 1988. Occurrence of parasites of the freshwater mugilid fish *Liza abu* (Heckel) from Basrah , southern Iraq. *Journal of Fish Biology*, 32:525–532.

Morais-Falavigna, D. L., L. F. Machado-Velho & G. C. Pavanelli. 2003. Proteocephalidean larvae (Cestoda) in naturally infected Cyclopoid copepods of the Upper Paraná River Floodplain, Brazil Mato Grosso do Sul. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98:1–4.

Moravec, F. 2009. Experimental studies on the development of *Contraecaecum rudolphii* (Nematoda: Anisakidae) in copepod and fish paratenic hosts. *Folia Parasitologica*, 56(3):185–193. ISSN 0015-5683.

Nadler, S. A., S. D'Amelio, M. D. Dailey, L. Paggi, S. Siu & J. A. Sakanari. 2005. Molecular phylogenetics and diagnosis of *Anisakis*, *Pseudoterranova*, and *Contraecaecum* from northern Pacific marine mammals. *The Journal of Parasitology*, 91(6):1413–1429.

Olivero-Verbel, J. & R. Baldiris-Avila. 2008. Parásitos en peces colombianos: Están enfermando nuestros ecosistemas? *Universidad de Cartagena*.

Orihuela, A. & V. M. Vázquez-Prats. 2008. Estrategias conductuales en la relación parásito-hospedero. Revisión. *Técnica Pecuaria en México*, 46(3):259–285.

Osanz-Mur, A. C. 2001. Presencia de larvas de Anisákidos (Nematoda: Ascaridoidea) en pescado de consumo capturado en la zona pesquera de Tarragona. Tesis de doctorado, Universidad Autónoma de Barcelona, España, 142 p.

Palm, H. & S. Klimpel. 2008. Metazoan fish parasites of *Macrourus berglax* Lacepède, 1801 and other macrourids of the North Atlantic: Invasion of the deep sea from the continental shelf. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 55:236–242. ISSN 09670645. doi:10.1016/j.dsr2.2007.09.010.

- Palomares-García, R., E. Suárez-Morales & S. Hernández-Trujillo. 1998. *Catálogo de los Copépodos (Crustacea) Pelágicos del Pacífico Mexicano*. Regina de los Angeles S.A., México, 351 p.
- Plomozo-Lugo, T. 2010. Propuesta para la regionalización de la pesca ribereña en el Golfo de California. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California Sur, 80 p.
- Pérez-Ponce de León, G., L. García-Prieto & B. Mendoza-Garfias. 2010. Helmintos parásitos de vertebrados silvestres. p. 263–283. En: Molina-Freaner, F. E. & T. R. Van-Devender (Eds.) *Diversidad biológica de Sonora*.
- Rohde, K. 1993. *Ecology of Marine Parasites an Introduction to Marine Parasitology*. CAB International, Wallingford, Oxon, U K, 2 a.ed., 298 p.
- Salazar-Bermúdez, M. A. 2011. Estudio de la estructura antigénica de la larva L3 de *Contraecum multipapillatum (sensu lato)*. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, Baja California Sur, México, 67 p.
- Schmidt, G. D. & L. S. Roberts. 1983. *Fundamentos de Parasitología*. Continental, S.A., México, 655 p.
- Scholz, T. 1999. Life cycles of species of *Proteocephalus*, parasites of fishes in the Palearctic Region: a review. *Journal of Fish Biology*, 73:1–19.
- Shamsi, S., R. Gasser & I. Beveridge. 2008. *Contraecum pyripapillatum* n . sp . (Nematoda: Anisakidae) and a description of *C . multipapillatum* (von Drasche , 1882) from the Australian pelican, *Pelecanus conspicillatus*. *Parasitology Research*, 103:1031–1039. doi:10.1007/s00436-008-1088-z.
- Shamsi, S., R. Norman & R. Gasser. 2009. Redescription and genetic characterization of selected *Contraecum* spp. (Nematoda: Anisakidae) from various hosts in Australia. *Parasitology Research*, 104:1507–1525. doi:10.1007/s00436-009-1357-5.

- Théodoridès, J. 1989. Parasitology of marine zooplankton. p. 117–177. En: Blaxter, J. H. S. & A. J. Southward (Eds.) *Advances of Marine Biology*. Academic Press, New York.
- Tolonen, A. & E. Karlsbakk. 2003. Parasites of herring (*Clupea harengus* L.) larvae from a local Norwegian fjord stock. *Sarsia: North Atlantic Marine Science*, 88:154–157. ISSN 0036-4827. doi:10.1080/00364820310001327.
- Valles-Vega, G. I. 2011. Supervivencia de larvas III de *Contraecum multipapillatum sensu lato* (Nematoda: Anisakidae) de lisas (Pisces: Mugilidae) en diferentes medios culinarios y aspectos sobre su ciclo de vida en La Paz, B.C.S. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, Baja California Sur, México, 80 p.
- Vidal-Martínez, V. M., D. Osorio-Sarabia & R. M. Overstreet. 1994. Experimental infection of *Contraecum multipapillatum* (Nematoda: Anisakinae) from Mexico in the domestic cat. *The Journal of Parasitology*, 80(4):576–579.
- Yamaguti, S. 1961. *Systema Helminthum vol. III The Nematodes of Vertebrates*. Interscience Publishers Inc, Inglaterra, 1261 p.
- Zar, J. H. 1984. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, New Jersey, 2 a.ed., 620 p.
- Zhu, X., S. D'Amelio, L. Paggi & R. B. Gasser. 2000. Assessing sequence variation in the internal transcribed spacers of ribosomal DNA within and among members of the *Contraecum osculatum* complex (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae). *Parasitology research*, 86(8):677–683. ISSN 0932-0113.
- Zuur, A. F., E. N. Ieno & C. S. Elphick. 2010. A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Methods in Ecology and Evolution*, 1:3–14. ISSN 2041210X. doi:10.1111/j.2041-210X.2009.00001.x.

10. ANEXOS

10.1. Anexo I

Preparación de colorantes y reactivos (Tomado de *Martoja et al. (1970)*)

Ácido peryódico: se prepara una disolución de ácido peryódico al 1 % (p/v).

Azul alcian (pH 0.3-0.5): se prepara una solución de ácido clorhídrico 0.5 N, partiendo de una 37%, donde se disuelve azul alcian en polvo al 0.5 % (p/v) y se filtra con una membrana de 0.22 μm .

Azul alcian (pH 2.5): se prepara una solución de ácido acético al 3 % (v/v), donde se disuelve azul alcian en polvo al 1 % (p/v) y se pasa por un papel de filtro.

Reactivo de Schiff: preparado comercial.

Técnica del azul alcian a pH 0.3-0.5

- 0.35 minutos en azul alcian
- Aproximadamente 10 segundos en HCl (mismo pH)
- Primer lavado en agua destilada durante 9 segundos
- Segundo lavado en agua destilada durante 18 segundos

Técnica de ácido peryódico de Schiff(PAS) + azul alcian (pH 2.5)

- 6 segundos en HIO_4
- 6 segundos en agua del grifo y después se enjuaga con agua destilada
- 6 segundos en el reactivo de Schiff (tapado)
- Enjuagar con agua destilada y después lavar con agua del grifo
- 18 segundos en azul alcian (pH 2.5) y lavar con agua del grifo

10.2. Anexo II

Tabla 5: Medidas máximas y mínimas de las diferentes estructuras anatómicas de *C. multipapillatum* y *C. bioccai*

Medidas (mm)	<i>C. multipapillatum</i>		<i>C. bioccai</i>		U Mann-Whitney		
	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Sp	In	Sx
Longitud Total:	41.18	40.88	39.33	50.18		**	o
Max.	31.95	36.71	32.28	41.51			+
Min.	24.76	31.35	25.74	31.34			
Desv. Est.	3.23	2.74	3.45	5.47			
Ancho Total:	1.06	0.99	0.96	1.07		**	+
Max.	0.87	0.88	0.84	0.93			
Min.	0.69	0.75	0.69	0.83			
Desv. Est.	0.07	0.06	0.08	0.06			
Longitud del esófago:	3.97	4.12	3.59	4.51	*	**	o
Max.	2.98	3.27	2.74	3.24			
Min.	2.21	2.36	2.22	2.39			
Desv. Est.	0.44	0.40	0.45	0.61			
Ancho del esófago:	0.34	0.36	0.29	0.34	*	**	+
Max.	0.20	0.20	0.20	0.25			
Min.	0.16	0.15	0.15	0.18			
Desv. Est.	0.04	0.05	0.04	0.25			
Longitud del ventrículo:	0.20	0.22	0.20	0.22		**	
Max.	0.17	0.18	0.17	0.18			
Min.	0.15	0.15	0.15	0.15			
Desv. Est.	0.01	0.02	0.01	0.02			
Ancho del ventrículo:	0.15	0.18	0.17	0.25			
Max.	0.12	0.12	0.11	0.12			

Tabla 5: (Continuación)

Medidas (mm)	<i>C. multipapillatum</i>		<i>C. bioccai</i>		U Mann-Whitney		
	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Sp	In	Sx
Min.	0.10	0.09	0.09	0.10			
Desv. Est.	0.01	0.02	0.02	0.03			
Long. del ciego esofágico:	1.69	1.68	1.68	2.00		**	o
Max.	1.45	1.40	1.33	1.53			+
Min.	1.21	1.21	1.13	1.26			
Desv. Est.	0.12	0.10	0.14	0.19			
Ancho del ciego esofágico:	0.21	0.21	0.19	0.27	*		
Max.	0.17	0.17	0.17	0.19			
Min.	0.14	0.14	0.14	0.15			
Desv. Est.	0.02	0.02	0.02	0.04			
Long. del ciego intestinal	3.24	2.99	3.16	3.33	*	**	o
Max.	2.78	2.75	2.43	2.78			
Min.	2.15	1.82	1.92	2.16			
Desv. Est.	0.25	0.27	0.39	0.35			
Ancho del ciego intestinal	0.26	0.24	0.28	0.29	*	**	o
Max.	0.19	0.18	0.18	0.21			+
Min.	0.15	0.15	0.17	0.17			
Desv. Est.	0.03	0.02	0.03	0.04			
Dist. cloaca ext. post.	0.33	0.35	0.28	0.39		**	o
Max.	0.22	0.27	0.23	0.29			
Min.	0.15	0.18	0.17	0.22			
Desv. Est.	0.04	0.04	0.03	0.05			
Dist. anillo nervioso ext. ant.	0.67	0.69	0.67	0.75		**	
Max.	0.61	0.63	0.61	0.64			

Tabla 5: (Continuación)

Medidas (mm)	<i>C. multipapillatum</i>		<i>C. bioccai</i>		U Mann-Whitney		
	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Sp	In	Sx
Min.	0.55	0.59	0.55	0.60			
Desv. Est.	0.03	0.03	0.03	0.04			
Espículas	1.77		2.35				
Max.	1.21		1.28				
Min.	1.46		1.57				
Desv. Est.	0.12		0.25				

Sp: diferencias entre *C. multipapillatum* y *C. bioccai* sin separar sexos.

In: diferencias entre sexos de la misma especie; Sx: diferencias entre mismo sexo de las dos especies.

* diferencias estadísticamente significativas; °diferencias estadísticamente significativas entre machos.

** diferencias estadísticamente significativas entre machos y hembras de *C. bioccai*.

+ diferencias estadísticamente significativas entre hembras.