

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**Tercer proceso de muda de *Gnathostoma binucleatum*
Almeyda-Artigas, 1991 (Nematoda: Spirurida) en mamíferos
como hospederos definitivos inadecuados (*Mus musculus*) y
adecuados (*Felis catus*) experimentales**

Que para obtener el grado académico de

Maestro en Biología

PRESENTA

JORGE GASPAR NAVARRO

Matrícula 208382725

Director

Dr. Roberto Javier Almeyda Artigas

Asesores

Dra. Yazmín Alcalá Canto y Dr. Carlos Álvarez Silva

*...a veces la ciencia puede acumular
suficientes evidencias para respaldar sus
afirmaciones...*

*...ninguna afirmación científica debe ser
necesariamente considerada como
verdadera...*

J. Dupré

JURADO

PRESIDENTE

Dr. Carlos Álvarez Silva
Integrante del Comité Tutorial,
Departamento de Hidrobiología,
Ecosistemas Costeros,
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

SECRETARIA

Dra. Yvonee Michelle Heuze de Icaza
Coordinadora de la UPEAL-Bioterio,
Departamento de Producción Agrícola y Animal,
Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.

VOCAL

Dra. Yazmín Alcalá Canto
Integrante del Comité Tutorial,
Departamento de Parasitología,
Facultad de Veterinaria y Zootecnia,
Universidad Nacional Autónoma de México.

VOCAL

Dr. Guillermo Salgado Maldonado
Laboratorio de Helmintología,
Departamento de Zoología,
Instituto de Biología,
Universidad Nacional Autónoma de México.

DEDICATORIAS

A mis padres, hermanos y sobrinos,

A Sensei Andrés Briseño E. †,

A mis amigos.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su infinito apoyo.

A los doctores Yazmín Alcalá-Canto, Carlos Álvarez-Silva, Yvonne Michelle Heuze de Icaza y Guillermo Salgado-Maldonado, por sus correcciones, observaciones y sugerencias dirigidas no sólo al escrito, sino a mi formación.

Al Dr. Roberto Javier Almeyda-Artigas.

A todas las personas que formaron parte en todo momento de este trabajo.

El desarrollo de esta tesis formó parte del programa de la Maestría en Biología registrada en la modalidad de Alto Nivel en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad del CONACYT, institución que otorgó la beca No. 224673.

ÍNDICE	Pág.
Dedicatorias	i
Agradecimientos	ii
Índice	iii
Resumen	vi
Abstract	vi
I.- INTRODUCCIÓN	1
II.- REVISIÓN DE LA LITERATURA	3
Ciclo de vida general de <i>Gnathostoma</i> spp.	5
Huevo	5
Larvas de primer y segundo estadio	5
Larva de tercer estadio temprano	6
Larva de tercer estadio avanzado	6
Fase adulta	8
Procesos de muda	8
Corticosteroides	11
Prednisona	12
III.- JUSTIFICACIÓN	13
IV.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	13
V.- HIPÓTESIS	13
VI.- OBJETIVOS	13
VII.- ZONAS DE RECOLECTA	14
Tlacotalpan	14
Temascal	15
VIII.- DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	16
Protocolo I	16
Determinación de variables	16
Hospedero definitivo más apropiado	16
Dosis letal de AdvL₃ totalmente desarrolladas	17
Etapa I. Desarrollo de L₂ a EaL₃	17

Obtención de formas adultas	17
Desarrollo embrionario y obtención de L₂	18
Infección de copéodos y obtención de EaL₃	18
Etapa II. Desarrollo de EaL₃ a AdvL₃	19
Etapa III. Obtención de L₄ y/o de L₅ (formas adultas)	20
Protocolo II	22
Infección de roedores	22
Infección de gatos	22
Primer grupo	22
Segundo grupo	23
Morfometría	24
Identificación de los hospederos	24
Estadísticos	24
IX.- RESULTADOS	25
Protocolo I	25
Determinación de variables	25
Hospedero definitivo más apropiado	25
Dosis letal de AdvL₃ totalmente desarrolladas	25
Etapa I. Desarrollo de L₂ a EaL₃	26
Obtención de formas adultas	26
Desarrollo embrionario y obtención de L₂	27
Infección de copéodos y obtención de EaL₃	28
Etapa II. Desarrollo de EaL₃ a AdvL₃	29
Etapa III. Obtención de L₄ y/o de L₅ (formas adultas)	30
Protocolo II	31
Infección de roedores	32
Infección de gatos	33
Descripciones	34
Larva de tercer estadio avanzado	34
Premudados	36
En proceso de muda	37
Postmudados	38

X.- DISCUSIÓN	41
Protocolo I	41
Determinación de variables	41
Etapa I. Desarrollo de L₂ a EaL₃	41
Obtención de formas adultas	41
Desarrollo embrionario y obtención de L₂	41
Infección de copépodos y obtención de EaL₃	42
Etapa II. Desarrollo de EaL₃ a AdvL₃	43
Etapa III. Obtención de L₄ y/o de L₅ (formas adultas)	44
Protocolo II	48
Infección de roedores	48
Infección de gatos	49
Descripciones	50
Larvas de tercer estadio avanzado/Premudados	50
En proceso de muda	50
Postmudados	51
Tiempo, Longitud y Desarrollo	51
Larva de cuarto estadio	53
XI.- CONCLUSIONES	56
XII.- BIBLIOGRAFÍA	57
APÉNDICES	63

RESUMEN

El ciclo de vida de los nemátodos está conformado por cuatro estadios larvarios (L_1 , L_2 , L_3 y L_4) y un quinto estadio, el adulto (L_5). Durante este desarrollo se llevan a cabo cuatro procesos de muda. Sin embargo, al parecer esta característica no es compartida por todos los nemátodos. En el caso particular de *Gnathostoma binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991, a la fecha se conocen tres de sus estadios larvarios y su fase adulta, por lo que la existencia de un cuarto estadio es incierta. El objetivo de esta investigación fue esclarecer por vez primera los procesos de muda y los estadios que conforman el ciclo de vida de este parásito, causante de gnathostomiasis humana en México. Para tal fin, su ciclo vital fue recreado experimentalmente, a partir de huevos fecundados expulsados por hembras aisladas de tumores gástricos de perros *Canis lupus familiaris* de Temascal, Oaxaca. La primera muda fue observada entre la larva de primer estadio y la larva de segundo estadio (L_1 — L_2), dentro del huevo; la segunda muda ocurrió entre la L_2 y la larva de tercer estadio temprano (Ea L_3) en el celoma del primer hospedero intermediario (Copepoda: Cyclopoida). A su vez, se descartó un tercer proceso de muda entre la Ea L_3 y su fase avanzada (Adv L_3) en hígados de segundos hospederos intermediarios empleados (Mammalia: Rodentia). Por lo anterior, las mudas restantes (tercera y cuarta) fueron investigadas en hospederos definitivos tanto inadecuados (ratones inmunosuprimidos con un corticosteroide) como adecuados (gatos). Fue en éstos últimos en donde se observó una muda, al haberse obtenido gusanos de tres tipos: premudados (Adv L_3), en proceso de muda y postmudados (L_5). Con base en la comparación morfológica de dichos gusanos, se concluye que estos nemátodos sólo mudan una vez en el hospedero definitivo (Adv L_3 — L_5); es decir, esta especie de *Gnathostoma* carece de larva de cuarto estadio. Así, el ciclo de vida de *G. binucleatum* queda conformado por tres estadios larvarios (L_1 , L_2 y L_3) y por formas adultas (L_5).

ABSTRACT

Nematodes life-cycle consists of four larval stages (L_1 , L_2 , L_3 , and L_4) and a fifth, adult stage (L_5). During this development four molt processes occur. Nevertheless, it seems that this feature is not shared by all nematodes. To date, three larval stages and the adult stage are known for the particular case of *Gnathostoma binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991; thus, the existence of its fourth stage is uncertain. The aim of this investigation was to clarify for the first time the molt processes and the stages that take part in its life cycle, etiological agent of human gnathostomiasis in Mexico. For such purpose, its life cycle was experimentally recreated beginning with fertilized eggs laid by females isolated from gastric tumors of dogs *Canis lupus familiaris* trapped in Temascal, Oaxaca. The first molt was observed between the first-stage larva and the second-stage larva (L_1 - L_2), inside the egg; the second molt occurred between the L_2 and the early-third stage larva (Ea L_3) in the hemocoel of its first intermediate host (Copepoda: Cyclopoida). In turn, the third molt process was discarded between the Ea L_3 and the advanced third stage (Adv L_3), in livers of second intermediate hosts (Mammalia: Rodentia). Therefore, the remaining molts (third and fourth) were investigated in definitive inadequate (immunosuppressed mice with the aid of a corticosteroid) and suitable (cats) hosts. A single molt was observed in the latter, due to the presence of three types of worms: premolt, molting, and postmolt (L_5). Based on the morphological comparison of the above mentioned worms, it is concluded that these nematodes molt only once in its definitive host (Adv L_3 - L_5); in other words, this *Gnathostoma* species lacks a fourth-stage larva. Thus, nowadays the life cycle of *G. binucleatum* comprises three larval stages (L_1 , L_2 , and L_3) and adult forms (L_5).

I.- INTRODUCCIÓN

El estudio del desarrollo y la transmisión de nemátodos parásitos inició a mediados del siglo XIX con investigaciones sobre la transmisión de *Trichinella spiralis* (Owen, 1835) realizados por Herbst, Virchow, Leuckart, Zenker y otros. Más tarde, entre 1865 y 1866, estos trabajos tuvieron continuidad con los de Metchnikoff y Leuckart sobre la alternancia de generaciones de *Rhabdias bufonis* (Schrank, 1788) en anfibios. Al mismo tiempo, Leuckart y Marchi descubrieron que *Mastophorus muris* (Gmelin, 1790) del estómago de ratones se desarrollaba en escarabajos de la harina (tenebrios) y Metchnikoff y Leuckart demostraron que *Camallanus lacustris* (Zoega, 1776) de peces de agua dulce se desarrollaba en copépodos (Anderson, 2000).

Una de las investigaciones más importantes sobre el desarrollo de nemátodos de vida libre fue la conducida por Maupas a finales del siglo XIX (1899-1900), quien notó que las hembras de nemátodos rhabdítidos, habitantes comunes del suelo, depositaban huevos en los que se desarrollaban pequeñas larvas de primer estadio que eclosionaban e inmediatamente se alimentaban de bacterias. Pocas horas después, entraban en un letargo —con una duración de entre 1 y 2 horas—, periodo en el que permanecían inmóviles. Durante este lapso mudaban y posteriormente retomaban su alimentación. Este proceso de alimentación, letargo y muda ocurría cuatro veces, siendo en la cuarta y última muda cuando aparecían las características de los adultos (L₅), debido a que el desarrollo de los órganos reproductivos de los caracteres sexuales secundarios, que habían iniciado durante el desarrollo de la larva de tercer estadio avanzado, culminaba en el cuarto estadio avanzado. Así, Maupas supuso que todos los nemátodos pasaban por cinco estadios separados por cuatro mudas y más de un siglo de investigaciones al respecto han apoyado su predicción (Anderson, 2000).

Lee (2002) establece que la historia de vida de todos los nemátodos consiste de un huevo, cuatro estadios larvarios (L₁, L₂, L₃ y L₄) y un quinto estadio, el adulto (L₅), siendo en éste en donde las estructuras reproductivas llegan a un desarrollo total y funcional. Durante su desarrollo, se llevan a cabo cuatro procesos de muda (Fig. 1).

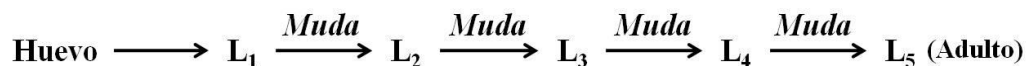


Figura 1.- Ciclo de vida básico de los nemátodos (modificado de Lee, 2002).

Los nemátodos muestran una variedad de ciclos de vida, algunos simples y directos (monoxenos) y algunos complejos e indirectos (heteroxenos) con uno o más hospederos intermediarios (Anderson, 1988), con o sin migración tisular (Read y Skorping, 1995; Morand, 1996). A pesar de la diversidad

y la complejidad de los ciclos de vida de los nemátodos, pueden estar relacionados en dos fases. La primera se lleva a cabo en el interior del hospedero definitivo, donde la maduración y la reproducción suele ocurrir, y la segunda —la fase pre-parasitaria— en función de una larva de vida libre ya sea en el exterior o en el interior de un hospedero intermediario.

La regla del tercer estadio infectivo de nemátodos parásitos surgió a partir de que Chabaud analizó información sobre la transmisión y el desarrollo de nemátodos parásitos de vertebrados, a mediados del siglo XX (1954-1955). Para el caso particular de los Secernentea, la fase infectiva casi siempre es la larva de tercer estadio temprano (EaL₃) —inmediatamente después de la segunda muda— (Chabaud, 1955). Lo anterior implica que las dos mudas restantes (la tercera y la cuarta) deben presentarse en el hospedero definitivo (HD).

A pesar de que el género *Gnathostoma* fue descrito desde 1836, a la fecha quedan incógnitas en cuanto a su ciclo de vida; por ejemplo, se desconocen algunas fases y hospederos. Para el caso particular de *G. binucleatum* la larva de primer estadio (L₁) se desarrolla dentro del huevo y sufre una primera muda generándose la larva de segundo estadio (L₂); una vez ingerida por el primer hospedero intermediario pasa por un segundo proceso de muda, dando lugar a la EaL₃. Al entrar en un segundo hospedero intermediario la larva crece sin sufrir cambios aparentes —denominándose entonces larva de tercer estadio avanzado (AdvL₃). Sin embargo, el desarrollo de la AdvL₃ a la fase siguiente es incierta, por lo que en esta investigación llevó a cabo experimentalmente el ciclo de vida de *Gnathostoma binucleatum* para monitorear su desarrollo larvario para esclarecer por vez primera los procesos de muda restantes (tercero y cuarto), ya sea en un hospedero intermediario o en un definitivo permitiendo la formación, si fuese el caso, de la larva de cuarto estadio (L₄) y posteriormente la fase adulta (L₅).

II.- REVISIÓN DE LA LITERATURA

El género *Gnathostoma*, erigido por Owen, tiene como especie-tipo a *G. spinigerum* Owen, 1836 (Tabla 1). Este nemátodo espirúrido fue descubierto en el estómago de un tigre de Bengala asiático muerto en el zoológico de Londres. A la descripción de *G. spinigerum* han seguido otras de más de 20 especies, de las cuales Almeyda-Artigas (1998) y Almeyda-Artigas *et al.* (2000) consideran como válidas únicamente a 15. Además de *G. spinigerum*, parásito gástrico de cánidos y félidos, las otras cinco especies del Viejo Mundo (principalmente de Asia) son: *G. hispidum* Fedchenko, 1872 y *G. doloresi* Tubangui, 1925, de jabalíes y cerdos; *G. nipponicum* Yamaguti, 1941, de comadreas (esófago); *G. malaysiae* Miyazaki y Dunn, 1965, de roedores y *G. vietnamicum* Le-Van-Hoa, 1965, de nutrias (riñones). En el Continente Americano se han registrado nueve especies del género, a saber: *G. sociale* Leidy, 1858, de mustélidos; *G. miyazakii* Anderson, 1964, de nutrias (riñones); *G. americanum* Travassos, 1925, de gatos silvestres; *G. turgidum* Stossich, 1902, de tlacuaches; *G. procyonis* Chandler, 1942, de mapaches; *G. binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991, de félidos domésticos y silvestres y perros; *G. lamothei* Bertoni-Ruiz *et al.*, 2005 [= *Gnathostoma* sp. I *sensu* Almeyda-Artigas *et al.* (2000)], de mapaches; *Gnathostoma* sp. II *sensu* Almeyda-Artigas *et al.* (2000), de cuatro ojillos, y *Gnathostoma* sp. III *sensu* Almeyda-Artigas *et al.* (2000), de tlacuaches. De éstas, las seis últimas han sido registradas por Almeyda-Artigas y colaboradores para México, infectando a diversos mamíferos, principalmente de la parte baja de la Cuenca del Río Papaloapan y sus afluentes, aunque también de varios estados de su región Neotropical (vertientes del Golfo de México y del Océano Pacífico).

Debido a su morfología y ciclo de vida, el género *Gnathostoma* es único y de igual forma se vuelve significativo para la salud humana y animal.

Tabla 1.- Clasificación taxonómica del género *Gnathostoma*.

Superreino	Eucariota
Reino	Animal
Subreino	Metazoa
Phylum	Nematoda
Clase	Sercernentea
Orden	Spirurida
Superfamilia	Gnathostomatoidea
Familia	Gnathostomatidae
Subfamilia	Gnathostomatinae
Género	<i>Gnathostoma</i> Owen, 1836
Especie	15 especies válidas (Almeyda-Artigas, 1998)

Gnathostoma spinigerum ha sido citada como parásito de mamíferos (tlacuaches, mapaches, ocelotes y visones); sin embargo, debido a que las diagnósticos de los gusanos son tan pocas o a que algunos especímenes se encuentran en tan mal estado, la presencia de esta especie en América ha sido puesta seriamente en duda (Kirkpatrick *et al.*, 1987). Así, por ejemplo, la comparación de especímenes aislados por Babero & Shepperson (1959) de *Procyon lotor* de Georgia, EE UU con ejemplares de *G. spinigerum* de Japón, reveló características idénticas a las de *G. procyonis* (Ash, 1962b), mientras que los gnatostomos extraídos de tlacuaches de Georgia y Louisiana por Flores-Barroeta *et al.* (1961) corresponden a *G. turgidum*, ya que los caracteres que invocan para sinonimizarlos con la especie asiática de ninguna manera apoyan dicha conclusión. En vista de tales consideraciones, no existe evidencia aceptable que muestre su existencia en América.

A pesar de lo anterior, Ollague *et al.* (1988a, b) concluyeron que la especie responsable de infecciones naturales de peces dulceacuícolas nativos de Ecuador con AdvL₃ era *G. spinigerum*, mediante la infección experimental de un gato doméstico con 12 de éstas y la confirmación específica de adultos obtenidos de un tumor estomacal. Sin embargo, Almeyda-Artigas *et al.* (2000) demostraron, con bases moleculares, que la especie involucrada en casos de gnatostomiasis animal (y muy probablemente de gnatostomiasis humana) es *G. binucleatum*.

En Japón, Tailandia, China, Islas Filipinas, Vietnam, Israel y Australia, médicamente se consideró a *G. spinigerum* la especie más importante del género *Gnathostoma* debido a la creencia de que era la única capaz de invadir a la especie humana (Miyazaki, 1960). En 1889, Levinsen (*vide* Peláez & Pérez-Reyes, 1970) describió el primer caso de gnatostomiasis humana al estudiar una hembra extraída de una mujer tailandesa; en la publicación apareció como *Cheiracanthus siamensis* n. sp. Tiempo después esta designación devino sinonimia, al comprobarse que 53 años antes Owen ya había denominado a la especie. Después de éste, se han citado muchos más de este importante padecimiento, en su mayoría del sureste de Asia. Sin embargo, las áreas de mayor incidencia son Tailandia (Daengsvang, 1981) y Japón (Miyazaki, 1960, 1966).

En el Continente Americano, Peláez & Pérez-Reyes (1970) registraron las primeras dos infestaciones contraídas en México entre 1965 y 1967. Los pacientes, de 25 y 27 años de edad, eran del sexo masculino. El primero, habitante de la ciudad de México, era portador de una AdvL₃ alojada en la pared abdominal; el segundo, residente en varios estados, ingirió pescado preparado en cebiche en Guanajuato un mes antes de que se iniciaran los síntomas. De la cámara anterior de su ojo izquierdo se extrajo una AdvL₃. Con base en la observación de cortes histológicos, en su descripción y medidas, estos autores concluyeron que "...podría corresponder a la especie *G. spinigerum*, ya que

difiere en sus características de la larva de tercer estadio de *G. procyonis*, aunque cabe la posibilidad de que pertenezca a alguna otra de las descritas para América o quizás a una nueva forma...” Doce años después, Hernández-Ortiz *et al.* (1982) publicaron el segundo caso de Peláez & Pérez-Reyes (1970) como el primero de gnatostomiasis ocular en México y aseveraron que se trataba de una AdvL₃ de *G. spinigerum*. En la actualidad, se cree que *G. binucleatum* es la especie responsable (Almeyda-Artigas *et al.*, 2000; Ashford & Crewe, 2003).

Desde 1975 se empezó a observar en ciudades de la parte baja de la cuenca del Río Papaloapan (principalmente en Temascal, Oaxaca y en Tierra Blanca, Veracruz), un incremento de enfermos con edemas migratorios, característicos de gnatostomiasis humana (Martínez-Cruz *et al.*, 1989). Ésta se relacionó con la ingestión de carne cruda de peces cíclidos alóctonos (mojarras tilapia) de la presa “Presidente Miguel Alemán”, preparada en forma de cebiche, y se suponía que era causada por AdvL₃. Los autores concluyeron que “...la especie implicada, aunque aún no identificada con absoluta seguridad, debe ser muy cercana a *G. spinigerum*...”. Actualmente se sabe que se trata de *G. binucleatum* (Almeyda-Artigas *et al.*, 2000; Ashford & Crewe, 2003).

Ciclo de vida general de *Gnathostoma* spp.

Huevo

El ciclo inicia cuando los huevos fecundados son arrojados junto con las heces del hospedero definitivo (principalmente mamíferos carnívoros con hábitos acuáticos y nocturnos), que defecan durante la noche mientras bajan a beber agua a las orillas de cuerpos de agua. Presentan uno o dos tapones, un cigoto grande no segmentado o en fase de dos/cuatro células en su interior y miden 58-74 µm de largo por 28-42 µm de ancho máximo; la superficie de su delgada cáscara exhibe en ocasiones una granulación que varía de fina a pronunciada (Prommas and Daengsvang, 1933; Almeyda-Artigas, 1998).

Larvas de primer y segundo estadio

Una vez en el agua y a una temperatura de 27°C, en su interior se desarrolla la L₁, la cual muda varios días después para convertirse en L₂ (Ash, 1960; Ando *et al.*, 1989; Daengsvang, 1980), envuelta en una delicada vaina. En su extremidad anterior se observa un diente larvario, el cual emplea para liberarse de dicha envoltura así como para atravesar el tubo digestivo de su primer hospedero intermediario. El cuerpo alcanza una longitud aproximada de 200-300 µm y una anchura máxima de 12-20 µm, mientras que la longitud de la vaina es alrededor del 40% más respecto de la corporal (Almeyda-Artigas *et al.*, 1995).

A los diez días abandona el huevo por el orificio antes ocupado por uno de los tapones y serpentea incesantemente en el agua por espacio de 15 a 20 días (en condiciones experimentales) antes de morir. Si en este lapso es depredada por un copépodo del complejo *Cyclops* (pequeño crustáceo que forma parte esencial del zooplancton y que es la dieta obligada, por ejemplo, de alevines y crías de distintas especies de peces y de formas larvarias de anfibios anuros), atraviesa la pared del intestino y se establece en su celoma entre 1 y 2 hs después de haber sido ingerida. Las etapas de nauplio tardío y copepodito temprano son las que con mayor facilidad se parasitan. Un día después de ser ingerida, desaparece el diente larvario, desarrollándose en su lugar dos labios carnosos y bulbosos asimétricos (Almeyda-Artigas, 1998; Mosqueda Cabrera *et al.*, 2010).

Intervienen como primeros hospederos intermediarios experimentales una gran variedad de especies de copépodos, incluidos en varios géneros no bien delimitados a la fecha.

Larva de tercer estadio temprano

Entre siete y diez días después, a una temperatura de 27°C muda, transformándose en EaL₃ (Ash, 1962a), siendo sus movimientos casi imperceptibles en el celoma del copépodo hospedero; mide 315-531 µm de largo por 48-54 µm de ancho máximo (Almeyda-Artigas *et al.*, 1995). En el extremo anterior se desarrolla un pequeño bulbo cefálico invaginable y trilobulado con papilas, el cual está provisto de cuatro hileras de ganchos de formas y tamaños variados y cuya cantidad varía de acuerdo a su posición. Estos caracteres, junto con la diferencia de los promedios de las hileras IV y I, son considerados útiles en la diferenciación de especies (Almeyda-Artigas, 1998).

El cuerpo está cubierto en su totalidad por más de 200 hileras transversales de pequeñas espinas simples, con sus puntas dirigidas hacia el extremo posterior. Un par de papilas cervicales se encuentra en las primeras hileras corporales. En su interior se observan un esófago muy largo, un intestino sinuoso y dos pares de sacos cervicales que varían en longitud, sobrepasando en ocasiones el esfínter que comunica al esófago con el intestino. El fluido celómico es casi siempre incoloro, mientras que el intestino exhibe una coloración que oscila entre ocre y marrón. Aunque en condiciones experimentales se han observado hasta 20 EaL₃, en condiciones naturales lo más probable es que cada copépodo albergue sólo una larva.

Larva de tercer estadio avanzado

Cuando un copépodo que alberga EaL₃ es depredado por un segundo hospedero intermediario (SHI), las larvas atraviesan su pared gástrica y migran principalmente a la musculatura y más raramente al hígado, sitios en los que aumentan considerablemente de tamaño, en periodos que oscilan entre 30 y

60 días. En general, estas larvas —AdvL₃— son muy similares a las EaL₃, variando básicamente en dimensiones, armadura cuticular y desarrollo del aparato reproductor. Presentan una longitud de entre 2 y 6 mm; la cantidad de ganchos en las cuatro hileras del bulbo cefálico también varía de acuerdo a su posición, incrementándose ligeramente respecto del estadio anterior. Esta característica, junto con la forma y el tamaño de los ganchos, también son de importancia taxonómica, lo que permite distinguir fácilmente especies estrechamente emparentadas que comparten muchas similitudes morfológicas en su estado adulto. Presenta, en términos generales, más de 200 hileras transversales de espinas simples, con sus extremos dirigidos en sentido antero-posterior, siendo las anteriores más grandes que las cercanas al ano. Las papilas cervicales, laterales, se ubican al nivel de las primeras hileras de espinas. El poro excretor, visible en su región ventral, es posterior a las papilas cervicales. Los primordios del aparato reproductor son más evidentes en las hembras, observándose la vulva y los inicios de la vagina a nivel de la unión del segundo y último tercios del cuerpo (Almeyda-Artigas, 1998; Mosqueda-Cabrera, 2003).

Esta vía de infección es conocida como “infección primaria del segundo hospedero intermediario”, entre los que se encuentran una gran variedad de especies de vertebrados superiores, principalmente poiquiloterms (Pisces, Amphibia y Reptilia).

Las larvas se encuentran embebidas en la musculatura de sus hospederos, por lo general enroscadas y enquistadas en una membrana fibrosa, siendo el diámetro del quiste de 2-3 mm. En el caso de Pisces, al parecer, no tiene predilección por paquetes musculares específicos, hallándose en la mayor proporción en regiones aledañas al estómago e inicios del intestino delgado, por ser éstas las más cercanas al sitio de su liberación. El fluido celómico oscila entre incoloro y rojizo, lo que depende de su localización en sus distintos hospederos, ya que, al parecer, se alimentan de sangre, dándole la hemoglobina incorporada esa coloración rojiza.

La otra vía, la “infección secundaria”, se da cuando un hospedero —el llamado paraténico (HP) o de transporte— ingiere AdvL₃ presentes en la musculatura de SHI —adquiridas por la vía primaria— o bien de otros HP. En el estómago de éstos, la larva se desenquista por la acción de los jugos gástricos, atraviesa la pared gástrica y migra hacia la musculatura, en la que vuelve a enquistarse. Se ha demostrado, en el laboratorio, que las larvas pueden pasar indefinidamente de un HP a otro sin perder su infectividad, inclusive de un grupo más evolucionado a uno más primitivo (p. ej., de mamíferos a peces). Actúan como reservorios una gran cantidad de especies de vertebrados superiores con hábitos carnívoros, tanto poiquiloterms (Pisces, Amphibia y Reptilia) como homeoterms (Aves y Mammalia), los cuales intervienen activamente en las cadenas tróficas de los

distintos cuerpos de agua. Este hecho resalta la versatilidad de esta etapa para completar exitosamente su ciclo de vida.

De manera experimental, es posible mantenerlas *in vitro* (p. ej., Sánchez-Miranda, 2001), incluso sin perder su infectividad hasta por 30 días (p. ej., Morakote *et al.*, 1985) o bien lograr su crecimiento y desarrollo, después de más de 180 días, hacia la siguiente fase [larva de cuarto estadio (L₄)] (p. ej., Maleewong *et al.*, 1995). A este respecto, Imai & Hasegawa (2001) consideran que lo observado por Maleewong *et al.* (1995) fue la L₅ (es decir, adultos inmaduros); concluyeron que este grupo carece de la fase L₄ —a diferencia de la mayor parte de los nemátodos— o bien que la AdvL₃ es indistinguible de la L₄, muda que nunca ha sido registrada en la literatura.

Fase adulta

Cuando alguno de los vertebrados silvestres mencionados con anterioridad (principalmente peces) es comido por el hospedero definitivo, las larvas migran temporalmente al hígado para, después de una migración tisular —donde mudan una o dos veces más— penetrar el estómago desde afuera (en ocasiones el esófago y los riñones, dependiendo de la especie), en donde crecen y se desarrollan hasta que ambos sexos alcanzan la madurez sexual. Además de los rasgos que serán mencionados en el siguiente apartado, uno de los más importantes empleados en la diferenciación de especies es su armadura cuticular, la cual está compuesta por decenas de hileras transversales de escamas de formas, tamaños, densidades y extensiones muy variados. En su interior forman una o varias cavernas o uno o varios tumores simples o crateriformes de paredes gruesas y de naturaleza fibrosa, dentro de los cuales puede llegar a vivir una gran cantidad de gnatostomos, generalmente con sus mitades anteriores enterradas en las capas submucosa y *muscularis* y sus extremos posteriores descansando en el lumen del tumor o del estómago. Una vez que los machos fecundan a las hembras, los huevos alcanzan, en el caso de los tumores, primero el estómago —a través de un pequeño orificio en el tumor cuyo diámetro no excede de 3 mm— y después el intestino, cerrándose así su ciclo de vida (Ash, 1962b; Daengsvang, 1972; Almeyda-Artigas, 1998).

Procesos de muda

De acuerdo con Imai & Hasegawa (2001), la cutícula de los nemátodos cambia drásticamente entre mudas, principalmente en cuanto a las ornamentaciones como los ganchos y las espinas corporales. Así, se ha aceptado que no existe una muda entre la EaL₃ y la AdvL₃. Maleewong *et al.* (1997) observaron fragmentos de cutícula (la tercera muda) en el medio RPMI-1640 al cultivar EaL₃ de *G. spinigerum* hasta AdvL₃, la cual se mantuvo unida al cuerpo después de 3 días de cultivo; indicaron,

además, que los ganchos del bulbo cefálico de las EaL₃ eran ligeramente diferentes a los de las AdvL₃. Sin embargo, Imai & Hasegawa (2001) concluyeron que era poco probable que la EaL₃ hubiera mudado, ya que los fragmentos aparentemente carecían de espinas o de ganchos, además de que las diferencias morfológicas entre los ganchos del bulbo cefálico no eran contundentes.

Imai & Hasegawa (2001) hallaron 156 adultos maduros de *G. doloresi* en el estómago de jabalíes *Sus scrofa leucomystax* infectados de manera natural, además de 114 gusanos en su capa muscular, que fueron clasificados en tres grupos: premudados, en proceso de muda y postmudados. Los premudados mostraban características de AdvL₃ obtenidas de SHI o HP naturales de estudios previos (p. ej., el de menor tamaño era ligeramente mayor —4.2 mm— a la AdvL₃ más grande recuperada de un HP —3.98 mm—), mientras que los postmudados presentaban una morfología similar a la de la fase adulta, exhibiendo, entre otras características, una distribución típica de las papilas caudales y espículas desarrolladas en los machos y una vulva evidente en las hembras. Con respecto a los gusanos en proceso de muda, la cutícula exterior era idéntica a la de una AdvL₃, mientras que la nueva cutícula, la interna, era idéntica a la de la fase adulta. Estos resultados les sugirieron fuertemente que las AdvL₃ de *G. doloresi* mudan sólo una vez (muda tercera) en el HD para alcanzar el estado adulto (L₅). Si ese fuera el caso, el adulto sería el cuarto estadio en aparecer y, en consecuencia, no existiría L₄ en *G. doloresi*.

La existencia de la L₄ en otros gnatostómidos ha sido controversial. Por ejemplo, Maleewong *et al.* (1995) se lo asignaron a gusanos postmudados de *G. spinigerum* cultivados en el medio RMPI-1640. Sin embargo, la cantidad de hileras de ganchos del bulbo cefálico (ocho), la armadura cuticular corporal y el desarrollo del aparato reproductor eran similares a los de la fase adulta (además de que la cutícula mudada parcialmente adherida tenía características de AdvL₃, con cuatro hileras en el bulbo cefálico y espinas corporales simples), tal y como sucedió con los gusanos postmudados de *G. doloresi* mencionados por Imai & Hasegawa (2001). Si dichos gusanos postmudados fueran L₄, tendría que darse una muda adicional para poder alcanzar la fase adulta. Sin embargo, tal muda nunca ha sido observada. Estos hechos indican que dichos gusanos no son larvas, sino adultos inmaduros (L₅). Una explicación alterna sería que las larvas premudadas halladas en el HD no fueran AdvL₃ sino L₄. En ese caso, la L₄ tendría que ser morfológicamente indistinguible de la AdvL₃. Sin embargo, esto no es creíble debido a que las ornamentaciones cuticulares se ven alteradas drásticamente, invariablemente, con una muda. Debido a que un fenómeno similar ha sido observado en un género, *Spiroxys*, cercanamente emparentado a *Gnathostoma*, Imai & Hasegawa (2001) propusieron que presumiblemente todos los miembros de la Familia Gnathostomatidae presentan

solamente cuatro estadios en su ciclo de vida: tres larvarios y uno adulto, en contraste con lo mencionado por Maupas, por lo que la historia de vida propuesta para los gnatostómidos sería particularmente excepcional.

En relación con lo anterior, Medina-Vences (1988) infectó dos gatos —una hembra y un macho, con diez y 11 AdvL₃ de *G. binucleatum*, respectivamente—; del gato recuperó, a los 6 días, una larva que presentaba un ligero aumento en la longitud —5.6 mm. De la gata, a los 47 días, recuperó tres adultos inmaduros —dos hembras y un macho mudados. Estos gusanos midieron 8.7-10.3 mm de longitud y presentaban nueve hileras de ganchos en el bulbo cefálico.

Por otro lado, Díaz-Camacho *et al.* (2002) infectaron un gato con AdvL₃ de *G. binucleatum*, el cual fue revisado 17 días después; los gusanos —recuperados del estómago, hígado y músculo— presentaban diferentes estadios de desarrollo [p. ej., uno (ya mudado) presentaba nueve hileras ganchos en el bulbo cefálico y una cutícula en proceso de muda, al parecer con rasgos de AdvL₃]. Además, infectaron un perro, del cual se recuperaron diez gusanos adultos inmaduros (mudados) de la pared gástrica, a los 35 días de la infección, con una longitud de 13 mm. Por su parte, Ash (1960) infectó mapaches con AdvL₃ de *G. procyonis* y encontró cambios morfológicos considerables en el desarrollo a partir de la tercera semana (p. ej., un aumento en su longitud —hasta 7 mm—); en la cuarta semana encontró hembras de 8.4 mm de longitud con nueve hileras de ganchos en el bulbo cefálico y escamas corporales como las de los gusanos adultos (es decir, ya mudadas). En ninguno de los casos mencionados hay evidencias que permitan suponer la existencia de dos mudas entre las AdvL₃ administradas y los L₅ recuperados.

En diversos reportes se ha hecho mención de una larva de cuarto estadio (L₄) en el ciclo de vida de este género (p. ej., Ash, 1962b; García Márquez *et al.*, 2001; Gillespie, 2004; Vázquez Tsuji *et al.*, 2006; Díaz-Camacho *et al.*, 2010). Sin embargo, en ningún caso se hace una descripción o se presentan imágenes que avalen dicho estadio (Fig. 2). No obstante, Le-Van-Hoa *et al.* (1965) presentan un morfotipo de larvas naturales de *G. hispidum* recuperadas de la pared muscular del estómago de un cerdo, las cuales consideran como L₄, mientras que Le Thi Xuan *et al.* (2002) hacen mención de una AdvL₃ “atípica” de *G. spinigerum* recuperada de un paciente, por diferir de la morfología “típica” de las AdvL₃ de dicha especie.

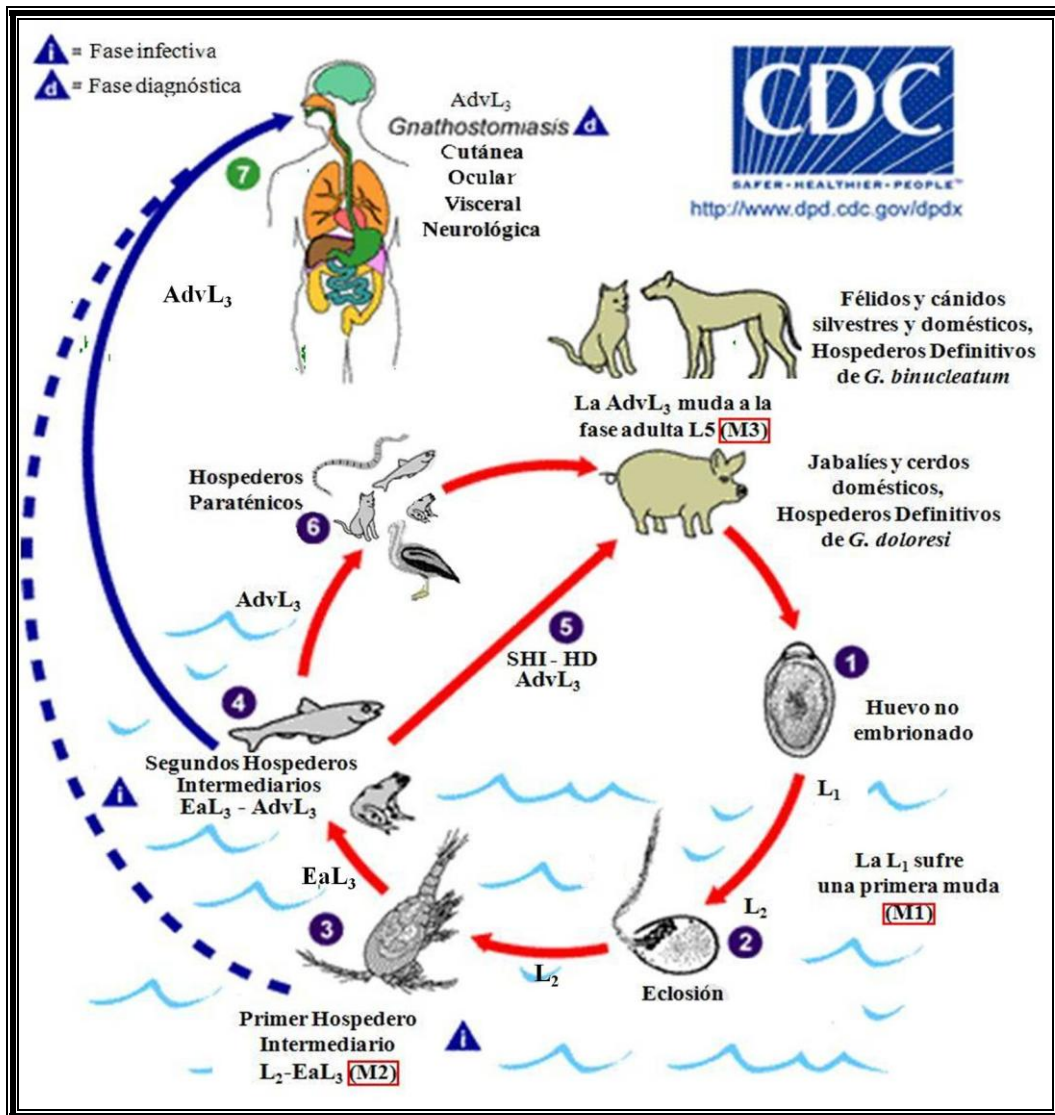


Figura 2.- Ciclo de vida general del género *Gnathostoma*, con énfasis en los procesos de muda (M1, M2 y M3) y la ausencia de una larva de cuarto estadio (L₄) (modificado del CDC, 2010).
 EaL₃ –Larva de tercer estadio temprano, AdvL₃ –Larva de tercer estadio avanzado.

Corticosteroides

La aplicación de acetato de cortisona en ratones permitió el establecimiento y sobrevivencia de adultos de *Trichuris muris* Schrank, 1788 por al menos 70 días, cuando generalmente los gusanos son expulsados a los 20 días de la infección. El uso de corticosteroides impidió la respuesta de linfocitos T. Numerosos reportes sobre la extensión y longevidad de helmintos intestinales por el uso de drogas inmunosupresoras evidencian la existencia de un bloqueo de la respuesta de “cura”, es decir, el tratamiento inmunosupresor induce un estado de inmunotolerancia, debido a una reducción de anticuerpos, que permite continuar con la migración y desarrollo de los estados larvarios. El éxito de los tratamientos con cortisona está determinado por el momento en el que los hospederos son

tratados (previo o posterior a la infección), la dosis (estrechamente relacionada con el peso de los hospederos) así como la periodicidad y la duración de su aplicación (Lee & Wakelin, 1982).

En particular, Nishikubo (1963) investigó el efecto del acetato de cortisona sobre el desarrollo de *G. spinigerum* en un hospedero inadecuado. Obtuvo 130 AdvL₃ de *Channa argus* (Pisces: Channidae) y con ellas infectó vía oral 20 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) —con un peso de 100 g— con 5-8 larvas c/u, al tiempo que les administró una dosis de 1.25 mg de cortisona vía subcutánea cada tercer día, desde el inicio y hasta su necropsia (12-148 días después). La cortisona no produjo cambios significativos en la ruta migratoria de las larvas, con excepción de una mayor permanencia en el hígado (38 vs. 17 días), alcanzando ahí dimensiones de hasta 9.56 mm. Aunque la mayor parte de las AdvL₃ inició el proceso de enquistamiento el Día 29 en tejidos subcutáneos y musculatura, observó una marcada reducción de la respuesta inflamatoria de los tejidos y la supresión de los procesos histopatológicos que conducen a su enquistamiento. Más aun, algunas de las que no se enquistaron —en tejidos subcutáneos, cavidad abdominal y pared bronquial—, se desarrollaron (mudaron) a machos adultos inmaduros —bulbos cefálicos con 7-8 hileras transversales de ganchos, escamas cuticulares con varias puntas, testículos y espículas—, a partir del Día 98 de la infección, alcanzando longitudes de 9.56-11.50 mm. Concluyó que la cortisona había causado una marcada reducción de la respuesta celular hacia los gusanos, lo cual favoreció que éstos pudieran continuar su desarrollo.

Prednisona

La Prednisona es un esteroide sintético que actúa controlando la velocidad de síntesis de proteínas, se metaboliza en el hígado a prednisolona, la forma activa. En comparación con la cortisona, es cuatro veces más potente y muestra una duración de su acción intermedia entre la hidrocortisona y la dexametasona. Tiene principalmente un efecto glucocorticoide cuyas acciones son prevenir o inhibir la inflamación y las respuestas inmunológicas. Después de su administración oral, la Prednisona se absorbe rápidamente, alcanzándose los máximos niveles en sangre en 1-2 horas y los efectos se prolongan entre 18 y 36 horas. Una vez en la circulación sistémica se distribuye rápidamente en los riñones, intestinos, piel, hígado y músculos (VADEMECUM, 2005).

Los efectos de este fármaco han sido evaluados en experimentos con roedores, ya sea sometiéndolos a infecciones parasitarias, o bien a actividades que demandaban una actividad recurrente de la respuesta inmune. Dichos efectos proponen a la Prednisona como un inmunosupresor efectivo y/o un agente antiinflamatorio (Zwadlo-Klarwasser *et al.*, 1998; González-Pérez *et al.*, 2001; Ramos-Remus *et al.*, 2002; González-Castañeda *et al.*, 2007).

III.- JUSTIFICACIÓN

Se pretende —a través de una investigación novedosa, original, concreta, de interés y relevancia biológicos, esbozada en los párrafos anteriores— determinar de manera contundente los momentos en los que se llevan a cabo los procesos de muda (tercera y/o cuarta) entre los miembros del género *Gnathostoma* —empleando como modelo a una especie versátil y exitosa como *G. binucleatum*.

IV.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto de la inmunosupresión causada por la aplicación periódica de un derivado de la cortisona en el proceso de convertir a un segundo hospedero intermediario (hospedero definitivo inadecuado) —parasitado con AdvL₃— en un hospedero definitivo apropiado —en el que mude por lo menos una vez, de AdvL₃ a L₄ y de L₄ a L₅ o bien de AdvL₃ directamente a L₅?

V.- HIPÓTESIS

- La aplicación periódica de un corticosteroide a roedores infectados con AdvL₃ (actuando como segundo hospedero intermediario) provocará que éstos pasen de hospedero definitivo inapropiado a hospedero definitivo apropiado, evidenciándose lo anterior con la aparición de al menos una muda en las larvas presentes y un cambio en la morfología.
- Las AdvL₃ de *G. binucleatum* presentes en roedores inmunosuprimidos mudarán primero a la fase de L₄ y posteriormente a la fase de L₅.
- Las AdvL₃ de *G. binucleatum* presentes en gatos mudarán primero a la fase de L₄ y posteriormente a la fase de L₅.

VI.- OBJETIVOS

- ✓ Establecer la existencia o ausencia de las mudas tercera y/o cuarta durante el desarrollo de *G. binucleatum* en un “hospedero definitivo simulado” (aparentemente inadecuado).
- ✓ Establecer la existencia o ausencia de las mudas tercera y/o cuarta durante el desarrollo de *G. binucleatum* en un “hospedero definitivo adecuado”.
- ✓ Contribuir al conocimiento del ciclo de vida del género *Gnathostoma* en México.

VII.- ZONAS DE RECOLECTA

Tlacotalpan

Ubicado en el centro del estado de Veracruz y en el litoral del Golfo de México (Fig. 3), en la región de “Los Tuxtles”. Colinda al Norte con el municipio de Alvarado; al Este con los municipios de Lerdo de Tejada, Salta Barranca y Santiago Tuxtla; al Sur con los de José Azueta y Amatlán y al Oeste con Acuña e Ixmiquilpan. Sus coordenadas geográficas extremas son: latitud 18°42' N y 18°20' S y longitud 95°30' E y 96°46' W. El municipio representa el 0.83% de la superficie total del estado y se encuentra a 10 m sobre el nivel del mar. Cuenta con una cuenca hidrológica, la del Papaloapan, y tres subcuencas: Río Papaloapan, Río Tesechoacán y Río Camarón. El municipio es rico en recursos hídricos, ya que 12 ríos riegan las tierras que abarca y cuenta con diez lagunas (INEGI, 2009).

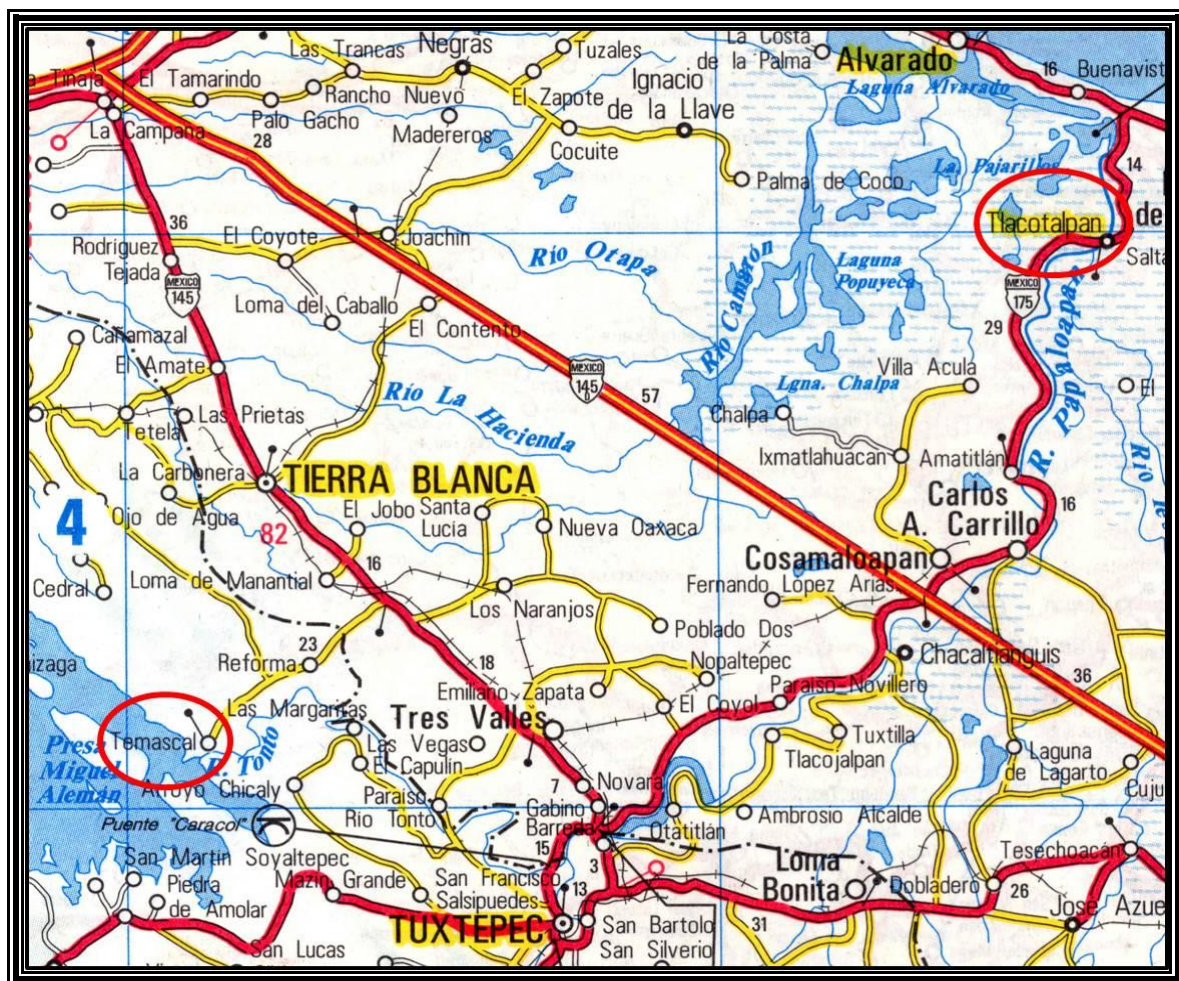


Figura 3.- Mapa de las zonas de recolecta, marcadas por un óvalo rojo. Ambas zonas unidas por la vertiente del río Papaloapan.

Temascal

Situado en el Municipio de San Miguel Soyaltepec, perteneciente a la región del Papaloapan, en el estado de Oaxaca (Fig. 3). Limita al Norte con el municipio de Acatlán de Pérez Figueroa, al Sur con San Juan Bautista Tuxtepec, San Lucas Ojitlán y San Felipe Jalapa de Díaz, al Este con el estado de Veracruz y al Oeste con los municipios de San Pedro Ixcatlán, San José Independencia, San José Tenango y Santa María Chilchotla. La geografía es muy característica de las regiones selváticas. En el municipio confluyen los ríos Arroyo de En Medio, Chihicazapa, Amapa y Tonto. Cuenta con una presa denominada Presidente “Miguel Alemán”, la cual está unida a la presa Cerro de Oro (INEGI, 2009).

VIII.- DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Recrear el desarrollo larvario y determinar procesos transitorios (mudas) conlleva el uso de organismos apropiados que cumplan con ciertos requisitos. Para tal fin se realizaron dos protocolos:

Protocolo I

Se sustituyeron los hospederos definitivos propios del ciclo de vida de *G. binucleatum* (cánidos y félidos silvestres o domésticos), contando con antecedentes poder afirmar que éstos pueden ser remplazados por otros de mucho menor tamaño que permite mantenerlos más fácilmente en condiciones de laboratorio.

La utilización de animales de laboratorio fue autorizado, con el número de registro 57, por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco (CICUAL UAM-X) conforme a la NOM-062-ZOO-1999 (Apéndice 1).

Para este proyecto en particular, se emplearon ratones *Mus musculus domesticus* libres de patógenos específicos (SPF) de la línea Balb/c AnNCrI (Apéndice 2) y ratas Wistar *Rattus norvegicus* que de antemano se sabe son compatibles (Apéndice 3) —en su calidad de segundos hospederos intermediarios— con el parásito, que mediante la aplicación de un derivado sintético de la cortisona (Prednisona) se pretendió modificarlos para que pasaran de hospederos definitivos “inadecuados” a “adecuados”. De este modo inducir los procesos de muda, además de que los gusanos estarían más concentrados, lo que ayudaría a aumentar la probabilidad de recuperar el 100% de los gusanos administrados al momento de efectuar una revisión exhaustiva.

Determinación de variables

Para dicho propósito, previamente fue indispensable determinar dos variables:

1.- “Hospedero definitivo más apropiado” (ratas vs. ratones). Posterior a una primera infección de copépodos Cyclopoida (descrita más adelante en la Etapa I), éstos fueron empleados para infectar vía oral a ratas *Rattus norvegicus* y ratones *Mus musculus domesticus* dosificando 30 EaL₃ a cada individuo. Después de 15 días —tiempo requerido para obtener AdvL₃— los roedores fueron sacrificados por dislocación cervical conforme a la NOM-062-ZOO-1999 y diseccionados, colocando por separado en cajas de Petri la musculatura, el hígado y los órganos restantes. Para cada bloque se empleó la técnica de digestión artificial (Apéndice 4) y posteriormente se revisó exhaustivamente bajo un microscopio estereoscópico; de esta manera se determinó la

presencia/ausencia, la cantidad y el sitio de recuperación de las larvas. Conociendo el porcentaje de recuperación, se seleccionó al roedor más compatible para fungir primero como segundo hospedero intermediario y más adelante como hospedero definitivo experimental.

2.- Dosis letal de AdvL₃ totalmente desarrolladas (ratas vs. ratones). Establecido el hospedero que aportó el mayor porcentaje de recuperación de AdvL₃, se determinó la cantidad de éstas que podrían soportar los roedores y que permitiera su óptimo desarrollo sin causar daño notorio e incluso la muerte del hospedero. Para tal fin, se inocularon vía oral diversas dosis de larvas y se determinaron los efectos que pudieran ser generados —mediante una disección. Lo anterior permitió establecer la cantidad de larvas y roedores requeridos para ser empleados en las etapas posteriores. Establecidas las variables anteriores, la determinación de los procesos de muda se llevó a cabo en tres principales etapas, a saber:

Etapas I. Desarrollo de L₂ a EaL₃

Obtención de formas adultas. Durante visitas a las localidades de Temascal, Oax. y Tlacotalpan, Ver. se monitorearon perros *Canis lupus familiaris* con el propósito de obtener hembras grávidas de *Gnathostoma binucleatum*. De dichos perros se tomó una muestra de excremento para realizar un estudio coproparasitoscópico con la técnica de flotación de Willis (1921) (Apéndice 5) con la finalidad de determinar i) la presencia de fases adultas maduras del parásito y así obtener los huevos requeridos para las posteriores infecciones que involucra esta investigación y ii) los parámetros ecológicos (*sensu* Margolis *et al.*, 1982).

Los perros que resultaron positivos fueron sometidos a una cirugía (realizada por un Médico Veterinario Zootecnista con experiencia) para extraerles el tumor gástrico donde se alojaban las fases adultas. Los tumores fueron diseccionados, inmersos en solución de Locke (Apéndice 6) para evitar un cambio osmótico que pudiera dañar a los adultos, bajo un microscopio estereoscópico y así aislar las formas adultas de *G. binucleatum* con ayuda de un escalpelo, pinzas de disección y pinceles finos (Fig. 4). Las hembras grávidas se colocaron en tubos de ensaye con tapón de rosca con solución de Locke y se mantuvieron a 37°C hasta que arrojasen los huevos. Los machos se fijaron en alcohol etílico al 70% caliente (70-80°C) y se conservaron en viales con alcohol al 70%. Recuperados los huevos, uno o dos días después, las hembras se fijaron y se conservaron de la misma forma que los machos.



Figura 4.- Formas adultas de *Gnathostoma binucleatum* en tumor gástrico.

Desarrollo embrionario y obtención de L₂. Los huevos de *G. binucleatum* se transfirieron —con ayuda de pipetas Pasteur largas— de la solución de Locke a “agua de cultivo” (Apéndice 7) con gentamicina (50 µg/ml) en cajas de Petri de 60 mm y se mantuvieron a una temperatura constante de 27°C en una estufa de cultivo. Durante los primeros 4 días el agua de las cajas fue cambiada cada 24 horas para eliminar al máximo restos de la solución de Locke que pudiesen ser un substrato propicio para el proliferación de hongos o bacterias que pudiesen perturbar el desarrollo dentro del huevo. Una pequeña alícuota de los huevos fue colocada en una cámara húmeda con el fin de monitorear diariamente el desarrollo embrionario.

Infección de copéodos y obtención de EaL₃. Los copéodos Cyclopoida empleados se recolectaron después del crepúsculo en la zona lacustre de Cuemanco —con una red de zooplancton manual— y se mantuvieron en una cubeta equipada con una piedra difusora de aire conectada a una bomba. Para su infección, se sacaron con ayuda de la red de zooplancton y se colocaron en cajas de Petri para facilitar su extracción individual. Con pipetas Pasteur se seleccionaron los estadios juveniles y se depositaron en grupos de tres en tubos de ensaye de 75 mm con agua de cultivo; posteriormente se agregaron entre diez y 15 L₂ recién eclosionadas —con ayuda de una pipeta Pasteur— y se colocaron en rejillas con capacidad de 90 tubos y se mantuvieron en una estufa de cultivo a 27°C por un periodo de 24 hs Después de este tiempo, se seleccionaron algunos aleatoriamente y se examinaron bajo un microscopio compuesto para determinar el estado de la infección. Confirmada la infección, el contenido de los tubos se vertió en peceras con agua de cultivo, proporcionándoles a dichos crustáceos alimento periódicamente para evitar el canibalismo, una temperatura de 27°C y una zona oscura dentro del acuario para no alterar su fotoperiodo.

Cabe mencionar que el material que estuvo relacionado con el cultivo de los huevos fue sumergido varias horas en agua oxigenada al 3% y posteriormente lavado abundantemente con agua destilada estéril, principalmente para evitar el crecimiento de hongos nocivos.

Etapa II. Desarrollo de EaL₃ a AdvL₃

Para dilucidar la existencia o ausencia del tercer proceso de muda durante el desarrollo de EaL₃ a AdvL₃, se llevaron a cabo los siguientes procesos:

- i) Una vez confirmado el máximo desarrollo de las EaL₃ dentro de los copépodos, cada uno de éstos fue revisado bajo un microscopio compuesto para determinar el número de larvas presentes y de esta manera poder distribuir las homogéneamente entre los roedores.
- ii) Con el fin de tener a ratones con diferentes procesos de desarrollo entre EaL₃ y AdvL₃, ocho ratones machos con 25 gr de peso (6-8 semanas) fueron inoculados vía oral utilizando una pipeta Pasteur de plástico en cuatro ocasiones cada 12 hs con un total de 40 larvas (Fig. 5). Teniendo en cuenta que el desarrollo a AdvL₃ dura aproximadamente 15 días, la disección de cada ratón estuvo determinada por la cantidad de días postinfección. De este modo, en función de cúmulos de 48 hs cada ratón fue revisado, teniendo así al primer ratón revisado con larvas de entre 12 y 48 hs de desarrollo y el último con larvas de 14.5 a 16 días de desarrollo. Un noveno ratón fue infectado de la misma manera que los anteriores para excluir que el tercer proceso de muda se hubiera llevado a cabo en las primeras 12 hs de infección.



Figura 5.- Inoculación oral de roedores con copépodos infectados con EaL₃.

- iii) Para la obtención de las larvas, la musculatura, el hígado y las vísceras de los ratones fueron sometidos a la técnica de digestión artificial; para determinar el proceso de muda, las larvas

recuperadas primeramente fueron separadas en función de su tamaño, el cual estaría acorde al tiempo de desarrollo. Posteriormente, en un microscopio compuesto fueron observadas minuciosamente pretendiendo encontrar larvas en procesos de muda (lo cual estaría determinado por la presencia de una doble cutícula o restos de la externa) o larvas mudadas (determinado por la presencia de características diferentes a la fase anterior).

Etapa III. Obtención de L₄ y/o de L₅ (formas adultas)

Con el propósito de inducir la muda tercera entre las AdvL₃ a L₄ y después de L₄ a L₅ (muda cuarta) o bien directamente de AdvL₃ a L₅ (muda tercera), además de determinar la presencia/ausencia de un quiste fibroso alrededor de las larvas, se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

- i) Se infectaron y mantuvieron copépodos como se indicó anteriormente. De igual forma que la etapa anterior, se confirmó el máximo desarrollo de las EaL₃ dentro de los copépodos y éstos se agruparon de acuerdo a la cantidad de larvas.
- ii) Se infectaron dos grupos de ratones: experimental y control. A partir del día 22 postinfección, los experimentales recibieron 10 mg/kg de peso (250 µg/25 gr de peso) de Prednisona (Sigma©, P6254) suministrada diariamente en 100 µl de agua destilada por vía oral con una pipeta dosificadora (Fig. 6) y los controles recibieron un volumen similar de agua destilada.

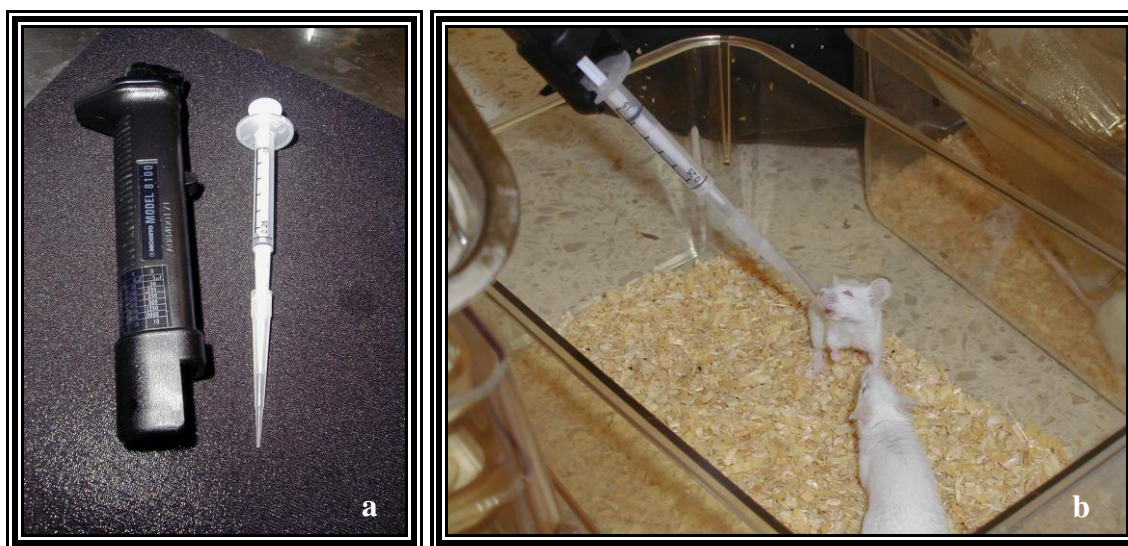


Figura 6.- (a) Pipeta dosificadora, (b) Dosificación de la Prednisona vía oral.

Esta dosis es considerada como equivalente a una moderada para humanos —similar a las prescritas para diversas condiciones clínicas—, la cual permite mantener con vida a los ratones el tiempo requerido para las infecciones y a la vez tener efecto sobre el desarrollo de las larvas (Fachet y Parrott, 1972; Jacobs *et al.*, 1996; Nawada *et al.*, 1996; Zwadlo-Klarwasser y

Schmutzler, 1998; Ramos-Remus *et al.*, 2002). El establecimiento del inicio del tratamiento se determinó al considerar que las AdvL₃ se encontraban totalmente desarrolladas al Día 25 postinfección; por tal motivo, se pretendió iniciar el bloqueo de la respuesta inmune de los ratones tres días antes para que este crecimiento y el posterior proceso de muda tuvieran lugar.

iii) Para evitar la intervención de algún patógeno externo, los roedores fueron colocados en jaulas de polisulfonato equipadas con sistemas micro-barrera (los controles en una sola jaula grande), provistos de cama de madera y alimento estéril de importación PMI 5001 y agua purificada en bebederos de polisulfonato y un fotoperiodo 12/12. Este tipo de jaulas permiten mantener a los roedores bajo las mismas condiciones del banco genético. Por tal motivo, cada cinco días las jaulas fueron cambiadas y esterilizadas en autoclave junto con el bebedero y la cama.

iv) Mediante la revisión aleatoria de los ratones, éstos se sacrificaron por dislocación cervical y diseccionados sometiendo las vísceras, hígado, músculo y la piel a una minuciosa revisión bajo un microscopio estereoscópico con solución salina al 0.85% como medio de suspensión. Cabe mencionar que los días de revisión estuvieron determinados en primer lugar por la cantidad de ratones infectados y, en segundo, por los resultados arrojados a partir de la primera disección.

En la Fig. 7 se esquematiza este primer protocolo desde la obtención de fases adultas de *G. binucleatum* hasta la obtención del estadio correspondiente, L₄ y/o L₅.

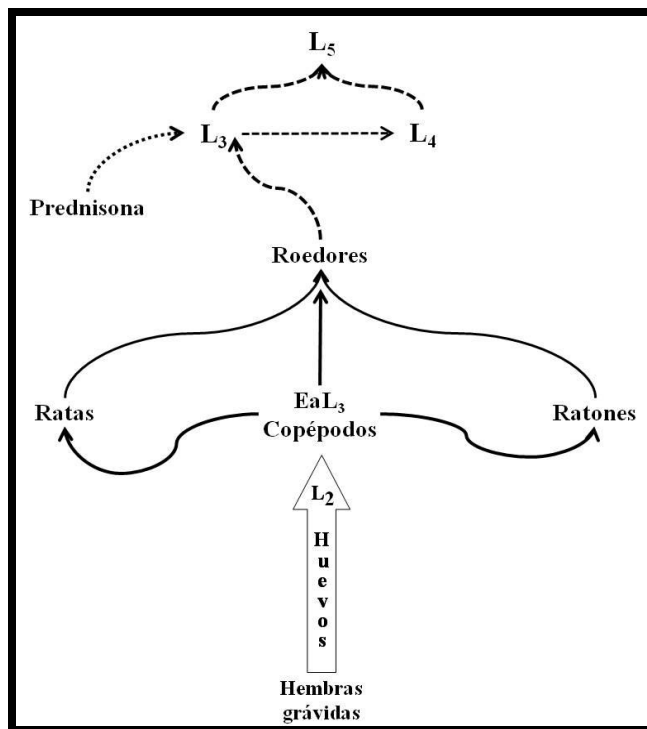


Figura 7.- Desarrollo de la infección durante el Protocolo I (las flechas continuas se refieren a la “selección de hospedero”, mientras que las flechas discontinuas indican la “inducción de muda”).

Protocolo II

Considerando la prioridad específica de determinar la presencia o ausencia del tercer y cuarto procesos de muda y por ende la presencia o ausencia de la L₄, se llevó a cabo la infección de ratones de la línea Balb/c y gatos domésticos *Felis catus* con AdvL₃ obtenidas de manera natural. Para tal fin, se realizaron varios muestreos de hospederos naturales —caracaras *Caracara cheriway*— de Tlacotalpan, Ver. y así obtener las larvas requeridas.

El músculo de estas aves fue revisado empleando la técnica a contraluz (Apéndice 8); de este modo se detectaron las larvas (enquistadas), las cuales fueron aisladas con ayuda de agujas y tijeras de disección y conservadas temporalmente en solución salina al 0.85%.

Infección de roedores

- i) Se infectaron diez ratones (experimentales), cada uno con diez larvas y cada 48 hs tratados con Prednisona y mantenidos bajo las mismas condiciones indicadas en la Etapa III. Este grupo fue tratado con el corticosteroide cinco días antes de su infección, así las larvas que lograsen establecerse contarían con una reducida respuesta inmune del hospedero, lo que facilitaría su óptimo desarrollo.
- ii) Otros diez ratones fueron empleados como controles, inoculados con diez larvas cada uno.
- iii) De cada grupo se revisó un roedor cada diez días para determinar el desarrollo larvario bajo estas características, siguiendo el procedimiento indicado en el inciso “vi” de la Etapa III.

Infección de gatos

➤ Primer grupo

- i) Dos gatos domésticos *F. catus* fueron infectados *ad libitum*, uno de ellos (macho) en dos ocasiones con diez larvas cada vez a un intervalo de cinco días, mientras que el segundo (hembra) fue infectado cinco veces con cinco larvas cada vez con el mismo intervalo de tiempo. Lo anterior con el fin de tener en un mismo individuo larvas con diferente proceso de desarrollo, similar al procedimiento de la Etapa II. Para esta infección, las larvas fueron colocadas dentro de trocitos de alimento (Whiskas®).
- ii) La primera infección se realizó con larvas recién obtenidas de los hospederos naturales, mientras que para las infecciones subsecuentes un grupo extra de ratones fue empleado como reservorio, recuperando las larvas en las fechas marcadas para la infección.
- iii) El primer gato fue examinado a los diez días postinfección, de modo que se obtuvieran larvas con cinco y diez días de desarrollo, mientras que el segundo se sometió a disección a los 35 días

postinfección, pretendiendo obtener larvas con 15, 20, 25, 30 y 35 días de desarrollo. La clasificación de las larvas estaría acorde a sus dimensiones. La eutanasia de estos organismos fue de acuerdo al la NOM-062-ZOO-1999, con una sobredosis de anestésico (Anestosal de Pfizer©).

➤ **Segundo grupo**

- i) Cuatro gatos fueron infectados *ad libitum* en función de la cantidad de AdvL₃ disponibles. Para la primera infección se emplearon larvas recién obtenidas de los hospederos naturales, y para las siguientes infecciones, las larvas fueron mantenidas en refrigeración (4°C).
- ii) Las infecciones se realizaron en el siguiente orden:

Gato 1 (macho): en tres ocasiones con 11, 11 y diez larvas, respectivamente, a intervalos de 5 días, examinado al Día 25, pretendiendo tener gusanos de 15, 20 y 25 días de desarrollo.

Los gatos 2, 3 y 4 recibieron diez larvas en la primera infección y 13 en la segunda, con un intervalo de cinco días. El momento de su estudio estuvo determinado por los resultados obtenidos del primer gato:

Gato 2 (hembra): Día 22, con larvas de 17 y 22 días.

Gato 3 (macho): Día 27, con larvas de 22 y 27 días.

Gato 4 (macho): Día 77, con larvas de 72 y 77 días.

La musculatura y las vísceras de todos los gatos fueron revisadas exhaustivamente con la técnica de contraluz y bajo un microscopio estereoscópico. En la Fig. 8 se esquematiza el segundo protocolo.

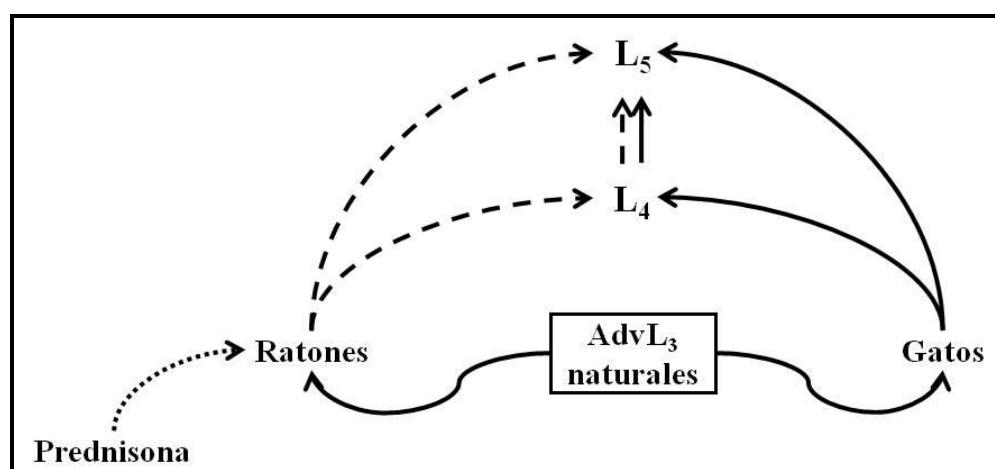


Figura 8.- Desarrollo de la infección durante el Protocolo II. Las flechas discontinuas refieren la “inducción de muda en un hospedero experimental”, mientras que las flechas continuas indican la “inducción de muda en un hospedero natural”.

Morfometría

Finalmente, se realizó una caracterización morfométrica de cada una de las larvas recuperadas de los ratones experimentales y controles, así como de los felinos, para determinar en qué fase de desarrollo se encontraban al momento de las extracciones.

Posterior al proceso de fijación y transparentación temporal con lactofenol de Amann (Apéndice 9), la caracterización tuvo principalmente tres bases: i) mediciones de longitud y ancho corporal, bulbo cefálico y esófago, ii) características morfológicas de los ganchos del bulbo cefálico y de las hileras de ganchos transversales del cuerpo, desarrollo de estructuras internas como el esófago, intestino y órganos sexuales, y iii) presencia o ausencia de una doble cutícula, carácter contundente para determinar el o los procesos de muda entre una fase de desarrollo y otra. Dicha caracterización se realizó con un microscopio compuesto Optiphot II de Nikon© previamente calibrado.

Los datos morfométricos fueron la base de las descripciones de los gusanos; las medidas están presentadas en micras (μm), con los rangos **mínimo-máximo** seguidos del **promedio** entre paréntesis.

Identificación de los hospederos

Los mamíferos empleados durante el transcurso de esta investigación fueron identificados con base en la referencia taxonómica de Wilson y Reeder (2005). Para el caso de las aves, el trabajo de Dove y Banks (1999).

Estadísticos

Los datos se consideraron estadísticamente significativos a $p < 0.05$. Se calcularon las medias aritméticas para describir los datos y desviaciones estándar (\pm) para describir la variabilidad de los datos. La significancia de las diferencias entre la cantidad de larvas libres recuperadas de ratones tratados y controles, así como entre las longitudes de hembras y machos se determinó mediante la prueba de T-student. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) a $p < 0.05$ para determinar la diferencia estadística entre la fase de desarrollo y la longitud.

IX.- RESULTADOS

Protocolo I

Determinación de variables

1.- “Hospedero definitivo más apropiado (ratas vs. ratones)”. Para este propósito se infectaron cinco ratas y cinco ratones. Los resultados demuestran que los ratones son compatibles con el desarrollo de EaL₃ a AdvL₃ aunado a que la recuperación de larvas inoculadas fue del 100%, con excepción de un caso. Respecto a las ratas todas resultaron negativas al establecimiento de la infección (Tabla 2).

Tabla 2.- Porcentaje de recuperación de AdvL₃.

	Ratas					Ratones				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
EaL ₃	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
dpi*	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Sitio de recuperación	-	-	-	-	-	Hígado	Hígado	Hígado	Hígado	Hígado
AdvL ₃	0	0	0	0	0	30	30	30	29	30
%	0	0	0	0	0	100	100	100	96.66	100

* Días postinfección.

Para descartar de manera fehaciente a las ratas como hospederos, un segundo grupo fue infectado con el fin de esclarecer si antes de los 15 dpi se había establecido la infección; sin embargo, todas resultaron negativas.

2.- Dosis letal de AdvL₃ totalmente desarrolladas. Establecidos los ratones como hospederos a emplear, siete grupos con dos individuos cada uno se infectaron con dosis de 10-40 EaL₃, marcando como tiempo de infección 60 días (Tabla 3), siendo el estimado a emplearse a futuro en la primera parte de la Etapa II.

Tabla 3.- Cantidad de AdvL₃ recuperadas y días postinfección alcanzado.

Ratones iniciales	2	2	2	2	2	2	2
EaL ₃ por ratón	10	15	20	25	30	35	40
dpi estimado	60	60	60	60	60	60	60
dpi alcanzado	**	**	**	**	**	**	**
AdvL ₃ recuperadas	8	8	8	8	18	18	18
	8	8	8	8	18	18	18
	18	18	18	19	30	30	35
	34	39	38				

** La disección de estos roedores fue determinada aleatoriamente una vez que se obtuvo la información requerida con los ratones que alcanzaron de 13 a 20 dpi.

En relación con los daños generados, el principal efecto se observó en el hígado (los órganos restantes y el músculo no presentaban daño aparente). Los daños fueron evidenciados por una necrosis que aumentaba gradualmente en relación con la cantidad de larvas (Fig. 9). La distribución de las larvas se vio reflejada en relación a los días postinfección, estando concentradas en el hígado inicialmente y dispersándose en forma gradual en la musculatura después del Día 16.

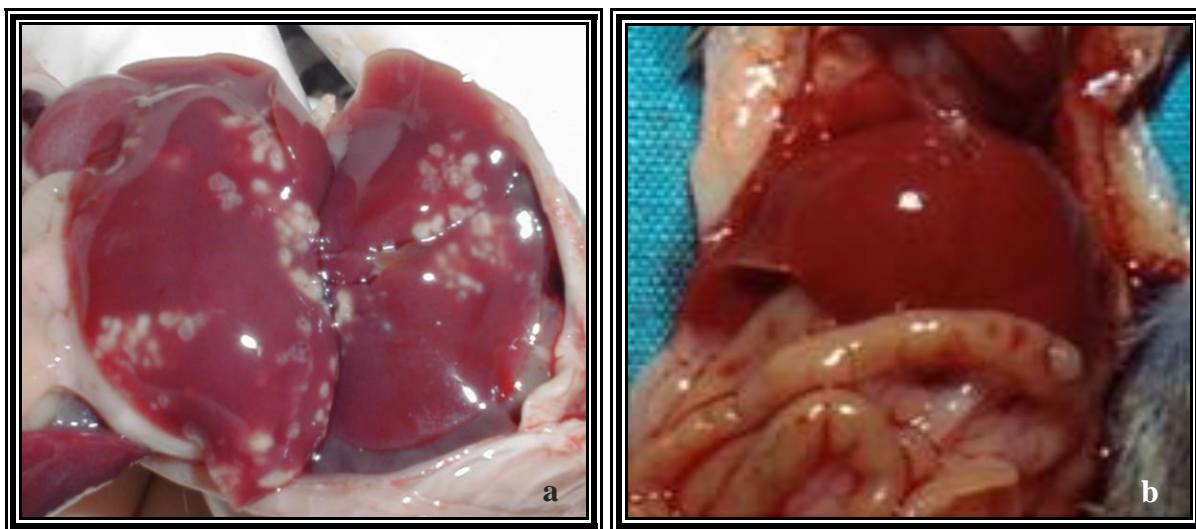


Figura 9.- Hígados de ratones. (a) Dañado por la presencia de larvas (experimental); (b) Sin daño (control).

Etapa I. Desarrollo de L₂ a EaL₃

Obtención de formas adultas. Se hicieron tres visitas durante el año de 2009 a Temascal, Oax. y a Tlacotalpan, Ver., monitoreándose 107 perros, de los cuales únicamente tres resultaron positivos a la presencia de fases adultas. Los resultados generales de este monitoreo se presentan en la Tabla 4. De la cirugía a la que fueron sometidos los perros positivos se recuperaron una hembra y dos machos en el mes de junio y cuatro hembras y dos machos en el mes de octubre.

Tabla 4.- Resultado del monitoreo de perros para obtención de fases adultas maduras del parásito.

Localidad	Mes	Perros revisados	Positivos a fases adultas maduras
Temascal	Febrero	13	0
	Junio	5	1
	Octubre	14	2
Tlacotalpan	Febrero	12	0
	Junio	29	0
	Octubre	34	0

En cuanto a los parámetros ecológicos, la prevalencia fue de 2.8, mientras que la intensidad, intensidad promedio y abundancia (considerando los dos hospederos sometidos a cirugía) fueron de 3-6, 4.5 y 0.1, respectivamente.

Desarrollo embrionario y obtención de L₂. El primer proceso de muda entre la L₁ y la L₂ tuvo lugar entre el Día 5 y el Día 6. A partir del Día 9, las L₂ iniciaron la eclosión (Fig. 10).

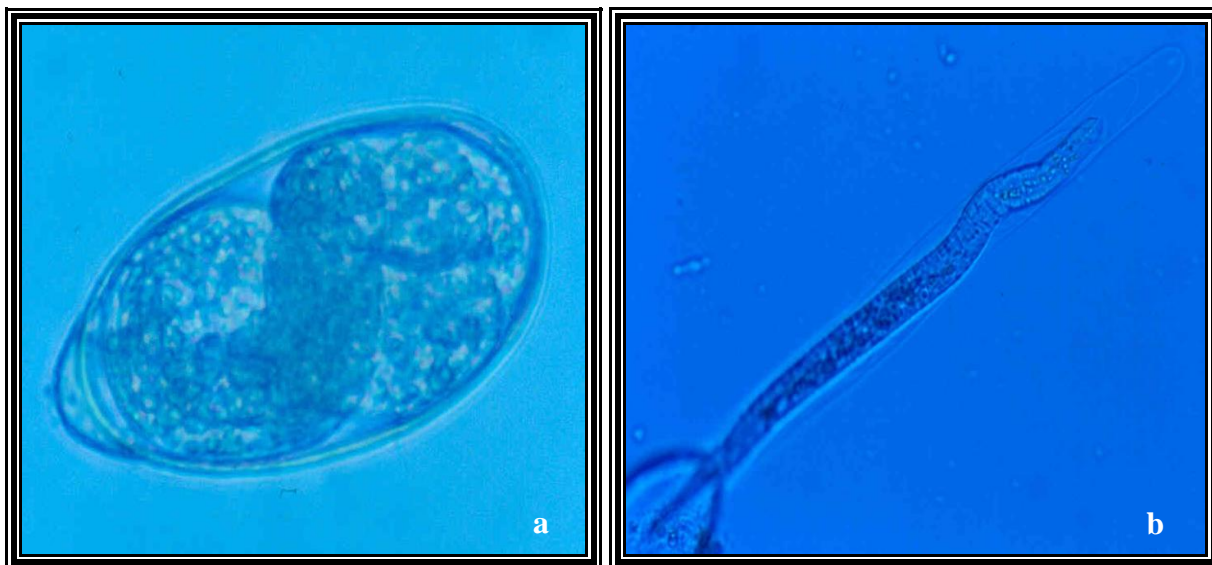


Figura 10.- Primeras fases larvarias (experimentales). (a) Larva de primer estadio previo a la primera muda, (b) Larva de segundo estadio al momento de la eclosión.

Los huevos fertilizados son de forma oval con una evaginación transparente en uno de sus extremos que sobresale en forma de tapón, por el cual las L₂ completamente desarrolladas escapan. Sus dimensiones son de 62.93-66.99 (65.77) de longitud por 32.48-40.60 (36.14) de ancho, y con una cáscara de superficie lisa. En su interior se observan una o dos células de coloración ámbar que darán origen a la L₁ dentro de los primeros cinco días. La distinción de esta fase es posible gracias al movimiento ejecutado por la larva, ya que al no presentar estructuras que permitan diferenciarla es complejo determinar alguna característica particular más allá de una delicada cutícula que le da su forma. Posteriormente, el primer proceso de muda ocurre entre el quinto y sexto día resultando la L₂ que concluye su desarrollo alrededor del noveno día, tiempo en que inicia su eclosión masiva a 27°C. Las larvas de segundo estadio recién eclosionadas permanecen algunos minutos en el fondo (en este caso de la caja Petri) para después iniciar su nado hacia la superficie. Esta fase se caracteriza por presentar un cuerpo alargado con dimensiones de 323.5 de largo por 14.5 de ancho; en el extremo anterior se observa un pequeño diente (Fig. 11a) que utiliza para desgastar el tapón del huevo por donde eclosionará. En algunos casos, se logra apreciar la cutícula de la L₁ aún adherida al cuerpo de la L₂. Esta larva particularmente cuenta con una protección, ya que está provista de una holgada vaina que la cubre totalmente; sus dimensiones son 376.9 de largo por 23.6 de ancho (Fig. 11b).

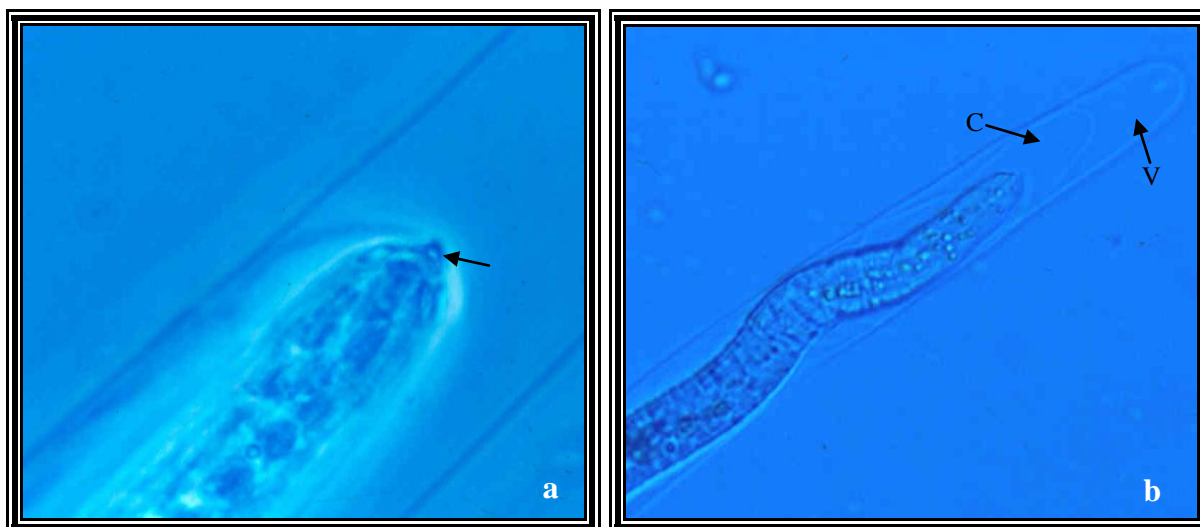


Figura 11.- Larva de segundo estadio. (a) Detalle del diente larvario; (b) Detalle del extremo anterior (C: cutícula de la L₁; V: vaina).

Infección de copéodos y obtención de EaL₃. Mediante la disección diaria y la selección al azar de algunos copéodos, se observó bajo un microscopio compuesto el desarrollo de L₂ a EaL₃ monitoreando el segundo proceso de muda, el cual duró entre nueve y diez días (Fig. 12).

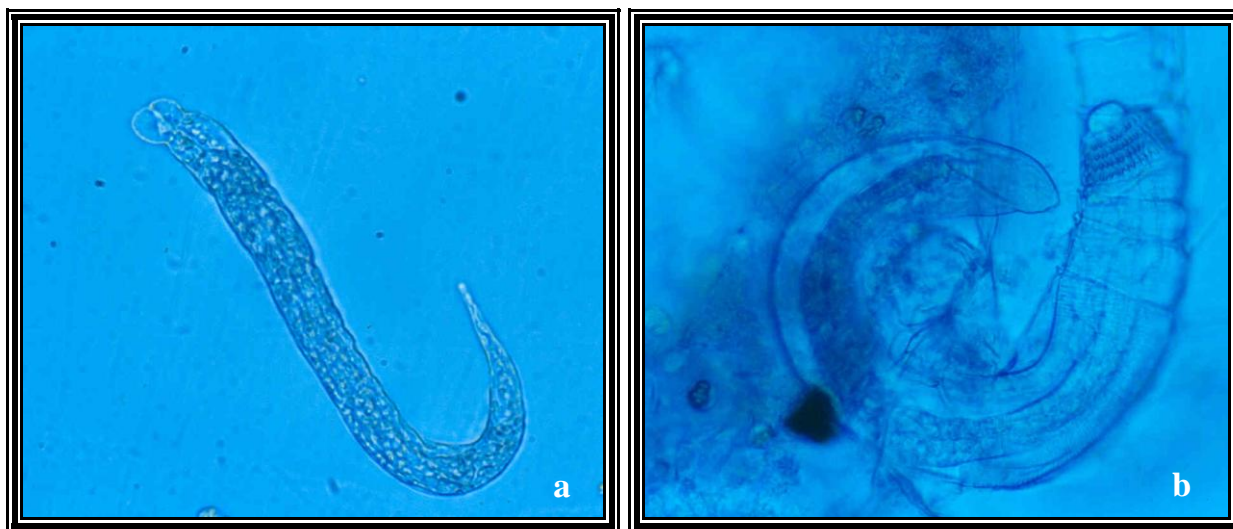


Figura 12.- Proceso de muda entre L₂ y EaL₃. (a) Día 2 de desarrollo; (b) EaL₃ completamente desarrollada dentro del primer hospedero intermediario (*in vivo*).

Las EaL₃ completamente mudadas median 512.2-587.5 (549.9) de longitud y presentaban características típicas de esta fase, tales como estructuras externas: a) cuatro hileras de ganchos en el bulbo cefálico, b) hileras transversales de espinas corporales, c) papilas cervicales, d) poro excretor; y estructuras internas: e) presencia de sacos cervicales, f) esófago y g) intestino (Fig. 13).

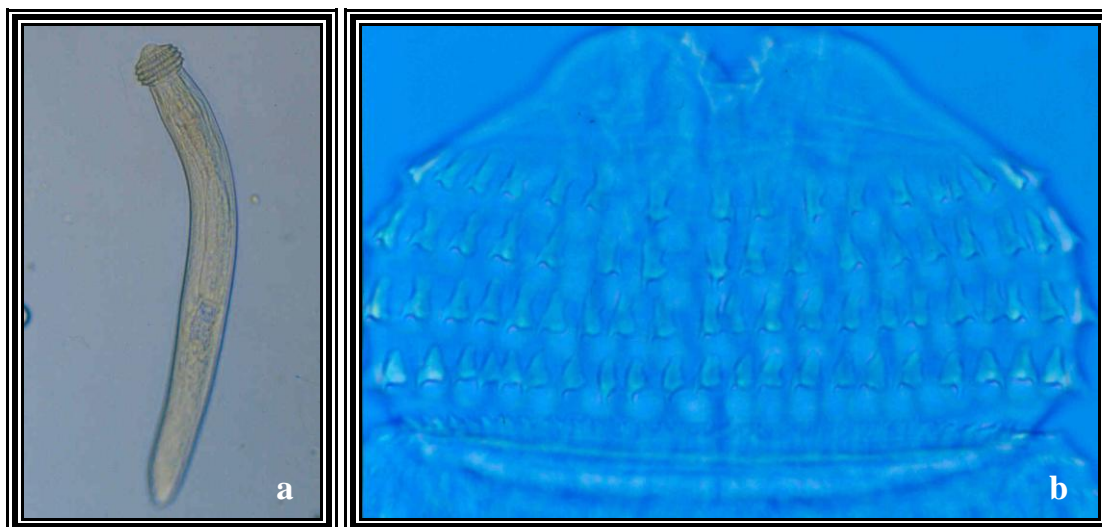


Figura 13.- Larva de tercer estadio temprano. (a) Ejemplar *in toto*, vista lateral; (b) Detalle del bulbo cefálico.

Etapa II. Desarrollo de EaL₃ a AdvL₃

- i) Se requirió un total de 360 EaL₃, las cuales estuvieron distribuidas en nueve grupos (número de ratones empleados) con una cantidad más o menos semejante de copépodos.
- ii) Las larvas recuperadas en ningún momento del desarrollo presentaron diferencia cuticular en cuanto a los ganchos del bulbo cefálico, espinas corporales, ubicación de estructuras como papilas cervicales y poro excretor o algo que indicara un posible proceso de muda entre EaL₃ y AdvL₃, es decir, el tercer proceso de muda. La principal diferencia de las larvas estuvo en función de un crecimiento, dado por el aumento en longitud y ancho del bulbo cefálico, cuerpo y estructuras internas como esófago e intestino. Estas larvas presentaban longitudes de 3053.0 – 4838.0 (3760.3) entre el Día 14.5 y 16.

Tabla 5.- Protocolo de infección de ratones con larvas de tercer estadio temprano

Ratón	EaL ₃ inoculadas	Días de desarrollo	Larvas recuperadas	Sitio de recuperación	Proceso/resto de muda
1	40	0-12 hs	5	Vísceras	NO
2	40	0.5-2.0	0	—	NO
3	40	2.5-4.0	6	Músculo	NO
4	40	4.5-6.0	25	Vísceras	NO
5	40	6.5-8.0	21	Vísceras	NO
6	40	8.5-10.0	26	Vísceras/Hígado	NO
7	40	10.5-12.0	15	Hígado	NO
8	40	12.5-14.0	35	Hígado	NO
9	40	14.5-16.0	36	Hígado/Músculo	NO

Cabe resaltar que las larvas presentaron una migración particular una vez que lograron salir del estómago. Casi inmediatamente desde su llegada, migraron a vísceras donde se mantuvieron hasta

alrededor del Día 8. Posteriormente pasaron al hígado, donde aparentemente se alimentaron por al menos 5 días y finalmente se dirigieron a la musculatura (Tabla 5). Para complementar la información anterior, cabe hacer mención que se cuenta con un registro de que después del Día 18 y hasta por lo menos el Día 30, las larvas fueron recuperadas en su totalidad de la musculatura.

Etapa III. Obtención de L₄ y/o de L₅ (formas adultas)

- i) Debido a una escasez de copépodos infectados, y por consiguiente de EaL₃, únicamente se inocularon 14 ratones, considerando a ocho para someterlos al tratamiento con Prednisona y a seis como controles. Todos los ratones recibieron una dosis de ocho EaL₃.

Tabla 6.- Cantidad de larvas recuperadas en ratones experimentales (○ larva libre; ● larva enquistada; — sitio de infección negativo; NP no procede, ± desviación estándar).

Ratón	dpi	ddt**	No. de larvas			Porcentaje de recuperación	Longitud	
			Músculo	Hígado	Vísceras		Min – Máx (promedio)	○
00*	30	5	○○○	○○	—	62.5	4842.96 - 5638.56 (5276.26) ± 308.57	NP
0*	35	10	○○○○○○	—	—	75.0	5038.80 - 5593.68 (5238.72) ± 192.65	NP
1	40	15	○○○	○	—	50.0	4745.04 - 5614.08 (5272.38) ± 370.99	NP
2	48	23	○○○●	—	—	50.0	4985.76 - 5573.28 (5286.11) ± 293.28	4643.04
3	64	39	○○	●●●●	—	75.0	4867.44 - 5389.68 (5128.56) ± 369.28	4936.80 - 5450.88 (5152.20) ± 248.97
4	80	55	○○●	○●	—	62.5	5018.40 - 5410.08 (5221.71) ± 196.27	5189.76 - 5597.76 (5393.76) ± 288.50
5†	80	55	—	—	—	—	—	—
6	96	71	○○○○●●	—	—	75.0	5348.88 - 5614.08 (5435.58) ± 118.28	5340.72 - 5508.00 (5424.36) ± 120.96

* No cuentan con control **ddt: días de tratamiento † Ratón muerto antes de fecha programada

Tabla 7.- Cantidad de larvas recuperadas en ratones controles (○ larva libre; ● larva enquistada; — sitio de infección negativo; NP no procede, ± desviación estándar).

Ratón	ddt	No. de larvas			Porcentaje de recuperación	Longitud	
		Músculo	Hígado	Vísceras		Min – Máx (promedio)	○
1	15	○○	○	—	37.5	4692.06 - 5287.68 (5057.86) ± 320.25	NP
2	24	●●●	○	—	50.0	5671.20	5079.60 - 5512.08 (5339.36) ± 229.00
3	39	●●●	●●●●	—	87.5	NP	4916.40 - 5728.32 (5260.79) ± 254.18
4	55	●●●	●●●●	—	87.5	NP	4504.32 - 5561.04 (4944.38) ± 338.78
5†	61	—	—	—	—	—	—
6	71	●●●●●●	●	—	87.5	NP	5259.12 - 5573.28 (5383.85) ± 107.12

† Ratón muerto antes de fecha programada

ii) En las Tablas 6 y 7 se exponen el día de la disección, la cantidad de larvas recuperadas, así como el sitio de recuperación y las dimensiones de las larvas.

Considerando que esta etapa tuvo lugar hasta el Día 94 dpi/71 ddt y no se detectó hasta ese momento un cambio morfológico en las larvas, nuevamente se infectaron diez ratones con el fin de dar continuidad al desarrollo larvario bajo el tratamiento con Prednisona (Tabla 8).

Tabla 8.- Cantidad de larvas recuperadas en ratones experimentales (○ larva libre; ● larva enquistada; — sitio de infección negativo; NP no procede, ± desviación estándar).

Ratón	dpi	ddt	No. de larvas			Porcentaje de recuperación	Longitud	
			Músculo	Hígado	Vísceras		Mín – Máx (promedio)	○
1†	23	19	○○○○		—	50.0	4553.28 – 5067.36 (4783.80) ± 220.41	NP
2	71	67	○○●●●	●	—	75.0	5161.20 – 5295.84 (5228.52) ± 95.20	4525.80 – 5385.60 (4967.40) ± 365.86
3	81	77	○○●	●●	—	62.5	5267.28 – 5193.84 (5230.56) ± 51.93	4712.40 – 5230.56 (5000.72) ± 263.98
4	87	83	○●●	●●●	—	75.0	4451.28	4671.60 – 5671.20 (5140.80) ± 386.21
5	98	94	○○○●●	●●	—	87.5	4859.20 – 5960.88 (5401.92) ± 550.98	4549.20 – 5916.00 (5074.50) ± 587.33
6	107	103	○○	●	—	37.5	4900.08 – 4598.16 (4749.12) ± 213.94	4834.80
7	117	113	●●●●●●	●●	—	100	NP	4479.84 – 5087.76 (4867.95) ± 199.01
8	127	123	○	●●●	●	62.5	5418.24	4553.28 – 5308.08 (4963.32) ± 322.75
9	137	133	●●●●	●	●	75.0	NP	4745.04 – 5732.40 (5170.04) ± 329.15
10	152	148	●●●	●	—	50.0	NP	4479.84 – 4838.88 (4703.22) ± 166.88

† Ratón muerto antes de fecha programada

NOTA: Particularmente este grupo experimental no contó con su grupo control, debido a la escasez de copépodos con EaL₃. Los resultados del grupo control del primer experimento, donde el 100% de las larvas recuperadas a partir del Día 39 y hasta el Día 71 se encontraban enquistadas, sirvieron de fundamento para estimar que las larvas que se hubiesen recuperado del grupo control del segundo experimento, hubieran sido recuperadas enquistadas a partir del Día 67 de tratamiento.

Protocolo II

Para este fin, se capturaron cuatro caracaras en las inmediaciones del poblado de Tlacotalpan, Ver, de los cuales se recuperaron 230, 30, 11 y 90 AdvL₃, respectivamente.

Infección de roedores

De los roedores infectados con AdvL₃ obtenidas de manera natural algunos murieron antes de las fechas programadas por causas desconocidas, por lo que sus respectivos controles fueron mantenidos con vida y empleados como fuente de larvas para complementar las faltantes, si así fuera requerido, en la infección de gatos (siguiente apartado). Lo anterior considerando la optimización de las larvas. En las Tablas 9 y 10 se presentan los datos obtenidos del tratamiento con Prednisona y del grupo control.

Tabla 9.- Cantidad de larvas recuperadas en ratones experimentales (○: larva libre; ●: larva enquistada; —: sitio de infección negativo; NP: no procede, ± desviación estándar).

Ratón	dpi ddt	No. de larvas				Tejido subcutáneo	Porcentaje de recuperación	Longitud	
		Músculo	Hígado	Vísceras	Mín – Máx (promedio)			○	●
1**	3	○○○	○	—	—	40	5181.60 – 5732.40 (5463.12) ± 230.82	NP	
2**	9	○○○○	—	—	—	40	5373.36 – 6124.08 (5752.80) ± 408.37	NP	
3**	11	○○○	○	○	—	50	5471.20 – 6038.40 (5678.54) ± 251.08	NP	
4	15	○	—	—	○	20	5593.68 – 5960.48 (5777.08) ± 259.37	NP	
5**	18	—	—	—	—	0	NP	NP	
6	25	—	—	—	○	10	5426.40	NP	
7	35	○○●	—	—	—	30	5601.84 – 5964.96 (5783.40) ± 256.76	5189.76	
8	45	○○	●*	—	●	40	5181.60 – 5597.76 (5389.68) ± 294.27	5752.80	
9	60	○○●●	—	—	—	60	5691.60 – 5720.16 (5705.88) ± 20.19	5385.60 – 5940.48 (5663.04) ± 392.36	
10	76	○○○○○ ●●●●	—	●	—	100	5642.64 – 6544.32 (6106.94) ± 389.00	5565.12 – 6372.96 (5859.70) ± 334.04	

* Larva dañada durante la extracción. ** Ratones muertos antes de fecha programada

Tabla 10.- Cantidad de larvas recuperadas en ratones controles (○: larva libre; ●: larva enquistada; —: sitio de infección negativo; NP: no procede, ± desviación estándar).

Ratón	dpi ddt	No. de larvas				Tejido subcutáneo	Porcentaje de recuperación	Longitud	
		Músculo	Hígado	Vísceras	Mín – Máx (promedio)			○	●
1	14	●●●	—	—	—	30	NP	5242.80 – 5687.62 (5465.21) ± 314.54	
2**	18	●●	—	—	—	20	NP	—	
3**	18	●●●	—	—	—	30	NP	—	
4	24	●●	—	—	—	20	NP	5646.72 – 5973.12 (5809.92) ± 230.80	
5	34	●●●	—	—	—	30	NP	5026.56 – 5491.68 (5259.12) ± 232.56	
6	44	●	—	—	—	10	NP	5671.20	
7	59	●	—	—	—	10	NP	5703.84	
8	76	●	—	—	—	10	NO	5524.32	

* Larvas destinadas al gato 1

Infección de gatos

Primer grupo. A diferencia de lo que se esperarí­a al tratarse de un hospedero definitivo, el establecimiento de las larvas inoculadas se vio alterado por razones aun en cuestionamiento. Los resultados obtenidos de cada gato se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11.- Protocolo de infecci3n de dos gatos con AdvL₃ obtenidas de manera natural.

Gato	AdvL ₃ inoculadas	dpi	Larvas recuperadas	Sitio de recuperaci3n	Proceso/resto de muda
1	20	10	9	8 est3mago y 1 vísceras	NO
2	25	35	2	Est3mago	NO

Las larvas recuperadas no presentaron ning3n indicio de proceso de muda hacia la siguiente fase. Sin embargo, con la informaci3n obtenida hasta el momento, datos adicionales se han sumado con esta infecci3n, como el hecho de que las AdvL₃ pueden alcanzar longitudes superiores a las 6500.00 como se plasma en la Tabla 12, sugiriendo que de darse un proceso de muda hacia la siguiente fase, ya sea L₄ o directamente a L₅ (adulto) se estarí­a llevando a cabo por encima de dichas dimensiones.

Tabla 12.- Cantidad de larvas recuperadas en gatos infectados con AdvL₃ obtenidas de manera natural (\pm desviaci3n estandar.)

Gato	AdvL ₃ inoculadas	dpi	Larvas recuperadas	Porcentaje de recuperaci3n	Longitud Mín - Máx (promedio)
1	20	10	9	45.0	4981.68 - 6552.48 (5912.37) \pm 476.46
2	25	35	2	5.7	5406.00 - 5716.08 (5561.04) \pm 219.26

Segundo grupo. En este grupo de gatos, se logró recuperar vermes en diferentes fases de desarrollo: gusanos premudados, en proceso de muda y adultos inmaduros —postmudados— (Tabla 13).

Tabla 13.- Protocolo de infecci3n de cuatro gatos con AdvL₃ obtenidas de manera natural (—: en espera de la obtenci3n de hembras grávidas).

Gato	AdvL ₃ inoculadas	dpi	Vermes Recuperados	Proceso/resto de muda
1	32	25	18	Premudados/En muda/Postmudados
2	23	22	7	Premudados/En muda
3	23	27	6	Premudados/Postmudados
4	23	77	9	Premudados/Postmudados

La agrupaci3n estuvo de acuerdo al proceso de muda, con base en característ­icas morfol3gicas: i) premudados —con característ­icas de una fase larvaria—, ii) en proceso de muda —presencia de doble cutícula— y iii) postmudados —característ­icas diferentes a los premudados. En las Tablas 14, 15 y 16 se plasman los resultados por grupo.

Tabla 14.- Cantidad de larvas premudadas recuperadas de gatos infectados experimentalmente (HGBC: hileras de ganchos en el bulbo cefálico, \pm desviación estándar).

Gato	AdvL ₃ inoculadas	dpi	Larvas premudadas	Sitio de recuperación	Longitud Min – Máx (promedio)	HGBC
1	32	25	8	1 Pared externa del estómago 7 Paredes internas del estómago	4920.48 – 6491.28 (5896.66) \pm 475.45	4
2	23	22	6	1 Pared externa del estómago 5 Paredes internas del estómago	5846.64 – 6874.80 (6213.84) \pm 400.04	4
3	23	27	5	Paredes internas del estómago	5385.60 – 6732.00 (6017.98) \pm 492.35	4
4	23	77	8	Paredes internas del estómago	5242.80 – 6058.80 (5742.10) \pm 592.85	4

Tabla 15.- Cantidad de larvas en proceso de muda recuperadas de gatos infectados experimentalmente (HGBC: hileras de ganchos en el bulbo cefálico, \pm desviación estándar).

Gato	AdvL ₃ inoculadas	dpi	Larvas en muda	Sitio de recuperación	Longitud Min – Máx (promedio)	HGBC Cutícula Externa	HGBC Cutícula Interna
1	32	25	2	2 Paredes internas del estómago	6262.80 – 6936.00 (6599.40) \pm 476.02	4	10
2	23	22	1	1 Paredes internas del estómago	6572.88	4	9
3	23	27	—	—	—	—	—
4	23	77	—	—	—	—	—

Tabla 16.- Cantidad de adultos inmaduros (gusanos Postmudados) recuperados de gatos infectados experimentalmente (HGBC: hileras de ganchos en el bulbo cefálico, \pm desviación estándar).

Gato	AdvL ₃ inoculadas	dpi	Gusanos Postmudados	Sitio de recuperación	Longitud Min – Máx (promedio)	HGBC Cutícula
1	32	25	8	3 Paredes internas del estómago 5 Lumen	6638.16 – 9738.96 (8099.92) \pm 1194.74	10/11
2	23	22	—	—	—	—
3	23	27	1	Paredes internas del estómago	7172.64	10
4	23	77	1	Paredes internas del estómago	9318.72	10

Descripciones

A continuación se presenta la descripción de los vermes de cada grupo, recuperados tanto de roedores como de gatos. Cabe mencionar que la agrupación estuvo en función de la fase de desarrollo y por el proceso de muda y no por los días de desarrollo.

Larva de tercer estadio avanzado (Fig. 14)

Descripción realizada a partir de 27 larvas libres (nueve machos y 18 hembras) de diez ratones infectados —con AdvL₃ provenientes de caracaras— con 3 a 76 días de tratamiento con Prednisona (véase la Tabla 9). Miden 5181.60-6544.32 (5732.32) de longitud por 342.84-530.40 (438.51) de ancho máximo. En el extremo anterior se encuentra un bulbo cefálico de forma oval que mide

114.24-146.88 (130.11) de largo por 269.28-310.18 (295.24) de ancho; está provisto de cuatro hileras de ganchos cuya base se torna rectangular. Inmediatamente después se hacen presentes las primeras hileras transversales de espinas simples que cubren todo el cuerpo de la larva, oscilando su cantidad total entre 239 y 276 (261.93). Son más abundantes y presentan un tamaño mayor en el primer tercio del cuerpo, cuya separación entre hileras es de 10.20; hacia el extremo posterior las espinas disminuyen gradualmente su tamaño; la separación entre las hileras en el segundo y tercer tercio del cuerpo aumenta hasta 18.36. Presentan un par de papilas cervicales laterales; la derecha se ubica entre las hileras 12 y 14 (13.11), mientras que la izquierda entre las hileras 13 y 15 (13.67). También se observa un poro excretor, ventral, entre las hileras 27 y 31 (28.33). Entre el segundo y tercer tercio del cuerpo se encuentra un par de pequeñas papilas caudales, que al igual que las cervicales son laterales; la derecha se encuentra alrededor del 55% y la izquierda a 66% respecto de la longitud total. La cola mide 61.20-73.44 (68.99). Se logran observar un par de fasmidios muy cerca del extremo posterior, los cuales se hacen más notorios con el aumento de la longitud de la larva. En el interior se distinguen tres diferentes estructuras: sacos cervicales, esófago e intestino. Las dimensiones del segundo son: 1627.92-2370.40 (1964.55) de largo por 269.28-375.36 (322.32) de ancho, lo que representa 34.37% y 73.96% respecto a la longitud total y ancho de la larva.

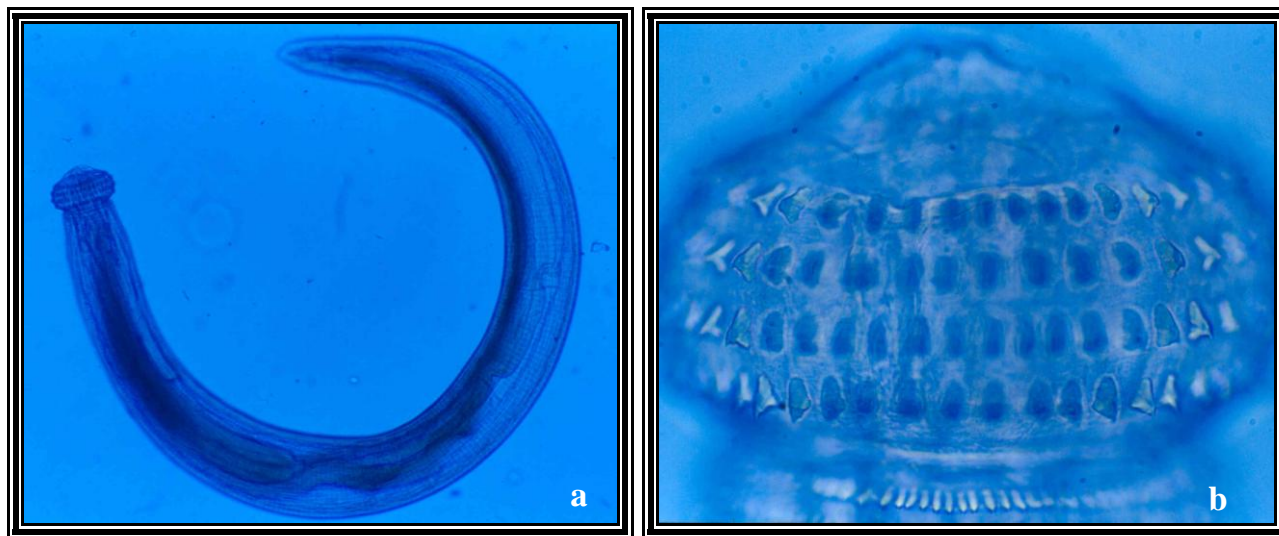


Figura. 14.- Larva de tercer estadio avanzado. (a) Ejemplar *in toto*, vista lateral; (b) Detalle del bulbo cefálico.

Para el caso de las hembras, el primordio genital se ubica entre las dos papilas caudales, por debajo de la derecha y por encima de la izquierda, alrededor del 60.00 % respecto de la longitud total del cuerpo.

Las AdvL₃ libres (21 machos y 19 hembras) de 17 ratones infectados con EaL₃ —provenientes de copépodos—entre 5 y 123 días de tratamiento con Prednisona tienen longitudes oscilantes presentan 4451.3 - 5960.9 (5179.0).

Premudados (Fig. 15)

Descripción realizada a partir de 27 gusanos (siete machos y 12 hembras) de cuatro gatos con 22, 25, 27 y 77 dpi (véase la Tabla 14). Miden 4920.48-6874.80 (6018.47) de largo por 387.60-489.60 (437.20) de ancho máximo. En el extremo anterior se encuentra un bulbo cefálico de forma oval que mide 118.32-142.80 (133.57) de largo por 187.94-326.40 (299.66) de ancho; está provisto de cuatro hieleras de ganchos cuya base se torna rectangular. Inmediatamente después se hacen presentes las primeras hileras transversales de espinas simples que cubren todo el cuerpo de la larva, oscilando su cantidad total entre 240 y 278 (263.07). Son más abundantes y presentan un tamaño mayor en el primer tercio del cuerpo, cuya separación entre hileras es de 10.20; hacia el extremo posterior las espinas disminuyen gradualmente su tamaño; la separación entre las hileras en el segundo y tercer tercio del cuerpo aumenta hasta 24.48. Presentan un par de papilas cervicales laterales; la derecha se ubica entre las hileras 12 y 15 (13.89.), mientras que la izquierda se ubica entre las hileras 13 y 16 (13.78). También se observa un poro excretor, ventral, entre las hileras 27 y 30 (28.22). Entre el segundo y tercer tercio del cuerpo se encuentra un par de pequeñas papilas caudales, que al igual que las cervicales son laterales; la derecha se encuentra a 37.84-67.88% (54.70%) y la izquierda a 55.54-75.26% (67.63%) respecto de la longitud total del cuerpo. La cola mide 73.44-89.76 (80.96), observándose un par de fasmidios muy cerca del extremo posterior.

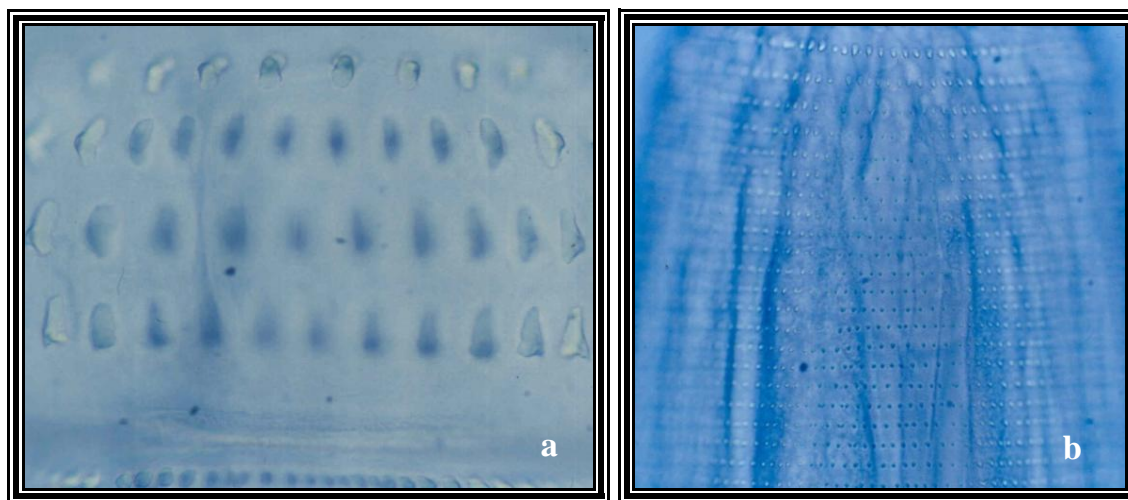


Figura. 15.- Gusano premudado. (a) Bulbo cefálico; (b) Primeras hileras transversales corporales.

En el interior de la larva se distinguen tres diferentes estructuras: sacos cervicales, esófago e intestino. Las dimensiones del segundo son: 1880.88-2203.20 (2017.34) de largo por 169.20-375.36 (312.55) de ancho, lo que representa 32.99% y 71.49% respecto a la longitud total y ancho de la larva, respectivamente.

Para el caso de las hembras, el primordio genital se ubica entre las dos papilas caudales, por debajo de la derecha y por encima de la izquierda, a 51.36-66.31% (60.64%) respecto de la longitud total.

En proceso de muda (Fig. 16)

Descripción basada en tres gusanos (un macho y dos hembras) de dos gatos con 22 y 25 dpi (véase la Tabla 15). Miden 6262.80-6936.00 (6590.56) de largo por 412.08-452.88 (431.12) de ancho máximo. En el extremo anterior se encuentra un bulbo cefálico de forma oval con una longitud de 134.64-150.96 (141.44) y un ancho máximo de 297.84-318.24 (307.36). La cutícula externa del bulbo cefálico está provista de cuatro hileras de ganchos cuya base se torna rectangular, mientras que la cutícula interna presenta entre nueve y diez hileras de ganchos que exhiben una base semicircular y una punta pronunciada. Inmediatamente después del bulbo cefálico se hacen presentes las primeras hileras transversales de espinas simples que cubren toda la cutícula externa de la larva, oscilando su cantidad total entre 238 y 256 (252.7). Son más abundantes y presentan un tamaño mayor en el primer tercio del cuerpo, con una separación entre hileras de 10.20; hacia el extremo posterior las espinas disminuyen gradualmente su tamaño; la separación entre las hileras en el segundo y tercer tercio del cuerpo aumenta hasta 34.64. La cutícula interna está armada de escamas complejas en el primer tercio, cuya base se torna rectangular y con dos y tres puntas; hacia el extremo posterior las escamas se vuelven simples y cada vez más pequeñas. La distancia entre las hileras de escamas aumenta gradualmente hacia el extremo posterior, mientras que la cantidad de las escamas por hilera disminuye gradualmente. Presentan un par de papilas cervicales laterales; la derecha se ubica entre las hileras 14 y 16 (15.0.), mientras que la izquierda se ubica entre las hileras 12 y 14 (13.0). También se observa un poro excretor, ventral, entre las hileras 27 y 28 (27.7). Entre el segundo y tercer tercio del cuerpo se encuentra un par de pequeñas papilas caudales, que al igual que las cervicales son laterales; la derecha se encuentra a 55.00% y la izquierda a 66.00% respecto de la longitud total. La cola mide 73.44-77.52 (76.19), en cuyo extremo final se observa un par de fasmidios. En el interior de la larva se distinguen tres diferentes estructuras: sacos cervicales, esófago e intestino. Las dimensiones del segundo son: 1954.32-2040.00 (1984.24) de largo por 306.00-354.96 (322.32) de ancho, lo que representa 30.16% y 74.89% respecto de la longitud total y ancho

de los gusanos, respectivamente. Para el caso de las hembras, la vagina, plenamente desarrollada, se ubica alrededor del 61.30 % respecto de la longitud total del cuerpo.

Cabe resaltar que uno de los tres ejemplares (macho) se encontraba en los inicios del proceso de muda, por lo que la cutícula interna apenas se distinguía. En el bulbo cefálico se apreciaba débilmente la formación de los ganchos y las bases de las escamas corporales estaban en formación. El hecho de que no se hayan detectado las espículas —aún en desarrollo—, también es indicio del inicio de dicho proceso.

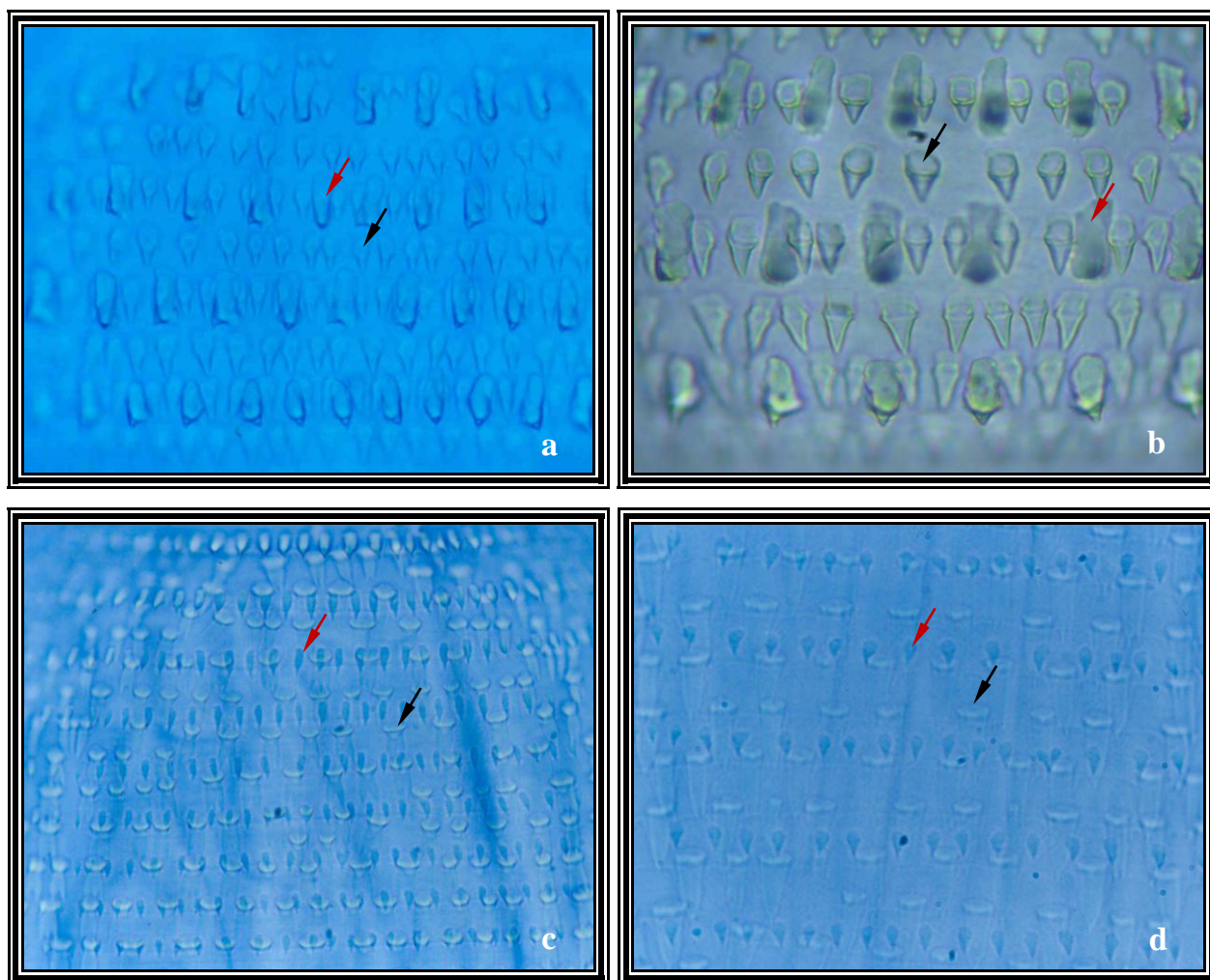


Figura. 16.- Gusanos en proceso de muda. (a y b) Detalle del bulbo cefálico; (c) Primeras hileras transversales corporales (d) Hileras transversales de espinas/escamas en las inmediaciones del ecuador del cuerpo (la flecha roja señala la cutícula externa y la flecha negra se refiere a la cutícula interna).

Postmudados (Fig. 17)

Descripción realizada a partir de nueve gusanos (cuatro machos y cinco hembras) de dos gatos con 25 y 27 dpi (véase la Tabla 16). Miden 6638.16-9738.96 (7996.80) de largo por 403.92612.00 (485.97) de ancho máximo. En el extremo anterior se encuentra un bulbo cefálico de forma oval que

mide 146.88-204.00 (177.25) de largo por 330.48-469.20 (392.08) de ancho; está provisto de diez hileras de ganchos cuya base es semicircular y con puntas pronunciadas. Inmediatamente después se presentan alrededor de 360 hileras transversales de escamas que cubren todo el cuerpo. En el primer tercio tienen bases de ovaladas a rectangulares con dos y tres puntas —la punta central más pronunciada que las laterales—; hacia el extremo posterior las escamas se vuelven simples y cada vez más pequeñas. La distancia entre las hileras de escamas aumenta gradualmente hacia el extremo posterior, mientras que la cantidad de las escamas por hilera disminuye gradualmente. Presentan un par de papilas cervicales laterales; la derecha se ubica entre las hileras 12 y 18 (15.11.), mientras que la izquierda entre las hileras 13 y 18 (16.33). El poro excretor no es visible. La cola mide 72.52-85.68 (80.69).

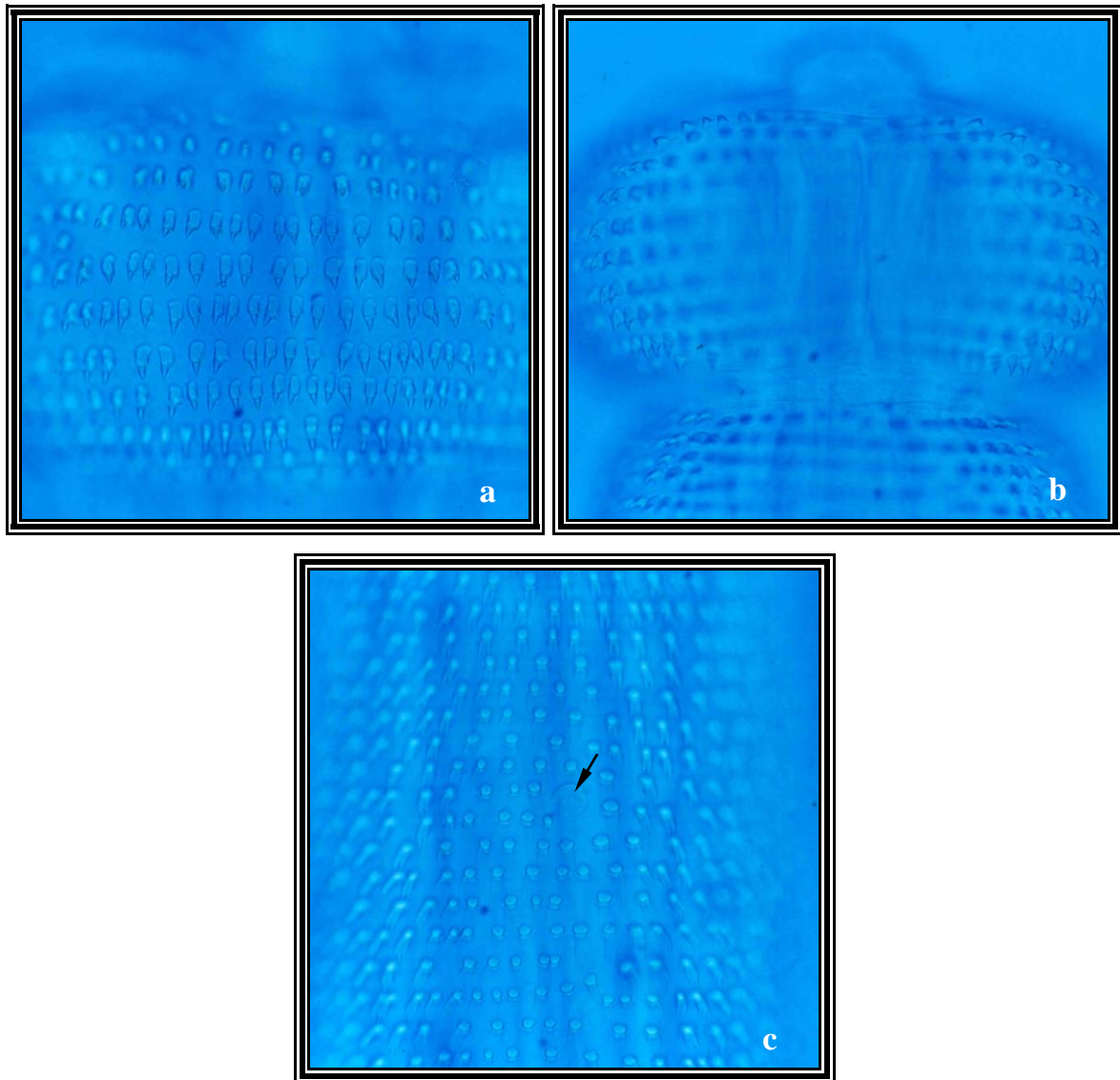


Figura 17.- Gusano postmudado. (a) Detalle de los ganchos centrales del bulbo cefálico; (b) Detalle de los ganchos laterales del bulbo cefálico; (c) Escamas corporales a la altura de la papila cervical (flecha negra).

En el interior se distinguen tres diferentes estructuras: sacos cervicales, esófago e intestino. Las dimensiones del segundo son: 2162.24-2537.76 (2354.60) de largo por 261.12-385.60 (327.08) de ancho, lo que representa 29.90 % y 68.15 % respecto de la longitud total y ancho de los gusanos, respectivamente. La vagina se encuentra alrededor del 59.00 % respecto de la longitud total del cuerpo. Los machos presentan un par de espículas cerca del extremo posterior, cuyas longitudes son: 223.30-272.02 (244.11) (derecha) y 568.40-710.51 (630.32) (izquierda).

X.- DISCUSIÓN

Protocolo I

Determinación de variables

El uso de roedores como modelos experimentales ha sido recurrente en diversas investigaciones. Particularmente su papel como segundos hospederos experimentales, y posteriormente como definitivos, estuvo sustentado por antecedentes personales y por la información presentada por otros autores (p. ej., Nishikubo, 1963; Daengsvang, 1980; Anantaphruti *et al.* 1986; Rojekittikhun *et al.*, 1989; Maleewong *et al.*, 1992; Rojekittikhun y Pubampen, 1998, Caballero-García *et al.*, 2005) donde se ostenta el desarrollo óptimo de EaL₃ de *G. spinigerum*, *G. hispidum* y *G. binucleatum* hasta alcanzar la fase de AdvL₃, lo que fortalece la compatibilidad parásito-hospedero, en este caso particular *G. binucleatum*—*Mus musculus*. Como estrategia para mantener a los ratones inoculados el tiempo necesario, se consideró el hecho de que cargas parasitarias altas y el tiempo de exposición al parásito merman el desarrollo de los parásitos debido a que incrementa la respuesta evasiva por parte del hospedero (Mulcahy *et al.* 2005).

Etapa I. Desarrollo de L₂ a EaL₃

Obtención de formas adultas. Los resultados de los parámetros ecológicos de la infección tan bajos podrían deberse a un periodo prepatente de la infección (*sensu* Mehlhorn, 1988). El análisis coproparasitológico está sesgado a fases adultas, determinadas por la presencia de huevos en las heces del hospedero, lo que excluye la presencia de fases larvarias, por lo que no se descarta la posibilidad de que los cánidos hayan estado infectados con estadios larvarios del parásito (AdvL₃) o con fases adultas (L₅) inmaduras. Un factor determinante de la infección es la complejidad inherente del ciclo de vida de *G. binucleatum* [considerando que requiere de la participación de una amplia gama de hospederos intermediarios (silvestres) para garantizar el encuentro (Apéndice 3) con el hospedero definitivo —cánidos o félidos—] el cual bajo condiciones urbanas o rurales la posibilidad de que el parásito y el hospedero se encuentren es baja, a diferencia de otros parásitos con ciclos de vida directos (p. *Toxocara* y *Ancylostoma*) que igualmente concluyen su ciclo en perros.

Desarrollo embrionario y obtención de L₂. Las diferencias entre especies del género relacionadas al huevo y las L₂ se presentan en la Tabla 17, donde las características de estas fases podrían ser criterios suficientes para su identificación en caso de desconocer el origen, es decir, el hospedero

definitivo. De este modo, se podría distinguir a *G. turgidum* de *G. binucleatum* por la presencia de dos tapones en la primera especie y uno en la segunda, o bien, porque las L₂ de *G. turgidum* son más pequeñas que las L₂ de *G. binucleatum*.

Tabla 17.- Comparación de la fase de huevo y L₂ de las especies del género *Gnathostoma*.

Especie	Tapones	Huevo		L ₂
		Dimensiones	Cáscara	Dimensiones
<i>G. spinigerum</i> ¹	1	69.3 x 38.5	Porosa	265.2 x 15.8 ²
<i>G. hispidum</i> ²	1	66.0 x 38.0	Porosa	—
<i>G. doloresi</i> ²	2	64.0 x 32.0	Porosa	234.5 x 11.2
<i>G. nipponicum</i> ³	1	73.0 x 42.0	Porosa	280.3 x 12.9
<i>G. malaysiae</i> ⁴	2	67.5 x 36.0	Porosa	—
<i>G. vietnamicum</i> ²	1	70.0 x 40.0	Porosa	262.0 x 14.0
<i>G. sociale</i> ⁵	1	68.0 x 40.0	—	—
<i>G. miyazakii</i> ⁵	1	69.0 x 42.0	—	—
<i>G. americanum</i> ⁶	2	63.0 x 28.0	—	—
<i>G. turgidum</i> ⁷	2	66.0 x 32.3	Porosa	178.0 x 9.0
<i>G. procyonis</i> ⁸	1	66.0 x 40.0	Porosa	276.0 x 14.0
<i>G. binucleatum</i> ⁹	1	66.9 x 37.1	Lisa	230.0 x 12.5
<i>G. lamothei</i> ¹⁰	1	69.2 x 38.9	Lisa	323.5 x 14.5
<i>Gnathostoma</i> sp. II ¹⁰	2	62.8 x 38.6	Porosa	250.5 x 12.7
<i>Gnathostoma</i> sp. III ¹⁰	2	—	—	—

1.- Miyazaki (1954). 2.- Daengsvang (1980). 3.- Ando *et al.* (1989). 4.- Miyazaki y Dunn (1965). 5.- Anderson (1964). 6.- Travassos (1925). 7.- Mosqueda-Cabrera *et al.* (2010). 8.- Ash (1962a). 9.- Presente estudio. 10.- Datos no publicados (LSAyPM). — Dato no presentado.

Respecto al día de la eclosión, éste no representa un carácter de diferenciación entre especies ya que depende directamente de la temperatura a la que sea expuesto el desarrollo embrionario. Por ejemplo, Ash (1962a) reporta la eclosión de L₂ de *G. procyonis* alrededor del Día 12 a 23-25°C de incubación, mientras que Ando *et al.* (1989) hacen mención de la eclosión de las L₂ de *G. nipponicum* al Día 6 bajo temperaturas de 30 y 35°C.

Infección de copépodos y obtención de EaL₃. El segundo proceso de muda de L₂ a EaL₃ tiene lugar exclusivamente en copépodos del complejo *Cyclops*, en etapa de copepodito, como primer hospedero intermediario (Prommas and Daengsvang, 1933; Miyazaki, 1954; Ishi, 1956; Ash, 1962a; Ando *et al.* 1989; Almeyda-Artigas *et al.* 1995; Harnnoi, 2005). Este proceso inicia en las tres primeras horas después de que la L₂ es ingerida. Una vez en el conducto digestivo del copépodo la larva lo perfora para establecerse en la cavidad celómica dando paso a los primeros cambios, como la pérdida del diente larvario que en su lugar se desarrolla una estructura globular que darán origen al bulbo cefálico. Durante los siete u ocho días posteriores, el cuerpo de lo que será una EaL₃ está protegido por la cutícula de la L₂ que funciona como una cubierta o vaina. Entre el noveno y decimo día se

observan estructuras (cuatro hileras de ganchos en el bulbo cefálico, hileras transversales de espinas corporales, papilas cervicales, poro excretor; sacos cervicales, esófago e intestino) que indican un desarrollo total de las EaL₃.

Nuevamente, el único factor que marcó la diferencia en la duración de este proceso de muda y los datos presentados por otros autores fue la temperatura. Las EaL₃ de *G. nipponicum* se desarrollaron totalmente en seis días a 30°C (Ando *et al.*, 1989), mientras que las larvas de *G. binucleatum* presentaron características de una larva completamente desarrollada en el día nueve después a 27°C.

Etapas II. Desarrollo de EaL₃ a AdvL₃

Se ha descartado que exista una muda entre las EaL₃ y las AdvL₃, ya que durante el monitoreo diario ninguna de las larvas recuperadas mostró indicios de dicha muda, ya sea una doble cutícula, restos de ésta o caracteres morfológicos distintos, por lo que se trata del mismo estadio larvario en diferente fase de desarrollo. Cabe hacer mención que hay registros (datos no publicados, LSAYPM) de AdvL₃ con longitudes de 2539.0 – 3455.1 (3836.0) recuperadas de ratones experimentales con 25 a 30 dpi, mientras que las larvas de 14.5 y 16 días en promedio median 3760.3. Una observación durante este desarrollo fue la migración tisular efectuada por las larvas, la cual se aborda a continuación.

La ruta trazada por las larvas puede ser considerada como una estrategia evasiva por parte del parásito en contra de la respuesta inmune del hospedero, estrategia que le permite continuar con el desarrollo pese al hecho de requerir mayor costo energético y la necesidad de adaptarse a condiciones físico-químicas del hospedero. Sin embargo, la migración refleja un beneficio de supervivencia específico de las especies parásitas (Douglas y Baker 1959; Duncan, 1972; Mulcahy *et al.* 2005). Al respecto, Read y Skorpung (1995) compararon diversos grupos de nemátodos (p. ej. *Ascaris* y *Strongylus*) con o sin migración, y concluyeron que el incremento en el tamaño del parásito, o bien, una maduración más rápida se asociaban con la migración. En general se piensa que estas migraciones representan legados ancestrales de las estrategias de transmisión (Sukhdeo *et al.* 1997). Sin embargo, aún se desconoce la razón por la cual algunos parásitos llevan a cabo una migración en su hospedero. Existen dos hipótesis sobre los orígenes evolutivos de los nemátodos parásitos que podrían explicar este hecho: (a) La técnica "original" de los nemátodos para infectar a su hospedero era penetrando la piel (transmisión percutánea), (b) que la colonización de hospederos vertebrados se produjo a través de la ingestión accidental (transmisión oral) (Chabaud, 1955; Adamson, 1986, 1989, Clark, 1994).

El primer paso hacia el parasitismo fue la penetración de la piel por los nemátodos de vida libre (transmisión percutánea). Bajo este punto de vista, la piel húmeda de los primeros tetrápodos

(anfibios) pudo haber facilitado la penetración de los nemátodos de vida libre, generalmente microbívoros, y por lo tanto, la penetración a través de la piel requiere una migración tisular para llegar a su fuente de alimento en la microflora intestinal (Fülleborn, 1929; Chabaud, 1955; Adamson, 1986). Posteriormente, el modo de transmisión percutánea se perdió y se sustituyó con la infección por la ingestión (transmisión oral), pero la fase de migración vestigial se mantuvo (p. ej., *Strongylus vulgaris*).

Respecto a la cantidad de larvas recuperadas en el hígado, hay evidencia suficiente para suponer que el paso de las larvas por este órgano es esencial para su desarrollo (p. ej., Miyazaki, 1960; Ash, 1962a; Daengsvang, 1971; Le Thi Xuan y Rojekittikhun, 2000), pese al hecho de no contar con los estudios correspondientes sobre la real demanda del parásito. En un caso particular, y a diferencia de otras especies del género que se mantienen en la fase de AdvL₃, durante la estancia en el hígado *G. turgidum* logra mudar a adultos inmaduros —maduración intrahepática— antes de dirigirse al estómago de tlacuaches (HD) donde concluye el desarrollo en adultos totalmente maduros (L₅) (Mosqueda-Cabrera *et al.*, 2009; Almeyda-Artigas *et al.*, 2010; Díaz-Camacho *et al.*, 2010).

Etapas III. Obtención de L₄ y/o de L₅ (formas adultas)

Los resultados obtenidos de los ratones tratados con Prednisona no revelan un efecto determinante de este fármaco sobre las AdvL₃ que pudiera indicar un proceso de muda hacia el siguiente estadio (L₄ o L₅) ya que al compararlas con las larvas de los ratones controles no presentan diferencias en cuanto a morfología se refiere. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que dicha muda pudiera tener lugar en días posteriores al Día 152 de desarrollo y Día 148 de tratamiento (Tabla 8). Para comprobar esta hipótesis se habría requerido de más ratones inmunosuprimidos y así abarcar más días de tratamiento.

Al comparar las AdvL₃ de esta etapa con las recuperadas en la Etapa II, la diferencia radicó en el aumento en longitud y ancho del bulbo cefálico, cuerpo (3760.3 vs. 5179.0), esófago e intestino, siendo éstos últimos más desarrollados. En todas las larvas, tanto de ratones experimentales como de controles, se lograron observar pronunciadamente los fasmidios o glándulas precaudales (par de órganos glándulosensoriales unicelulares que desembocan separadamente a cada lado de la cola) (Fig. 18) y en el caso particular de las hembras, se notó un mayor desarrollo del primordio genital (Fig. 19), además de dimensiones corporales significativamente superiores ($P < 0.001$) a las de los machos (Tablas 18 y 19).

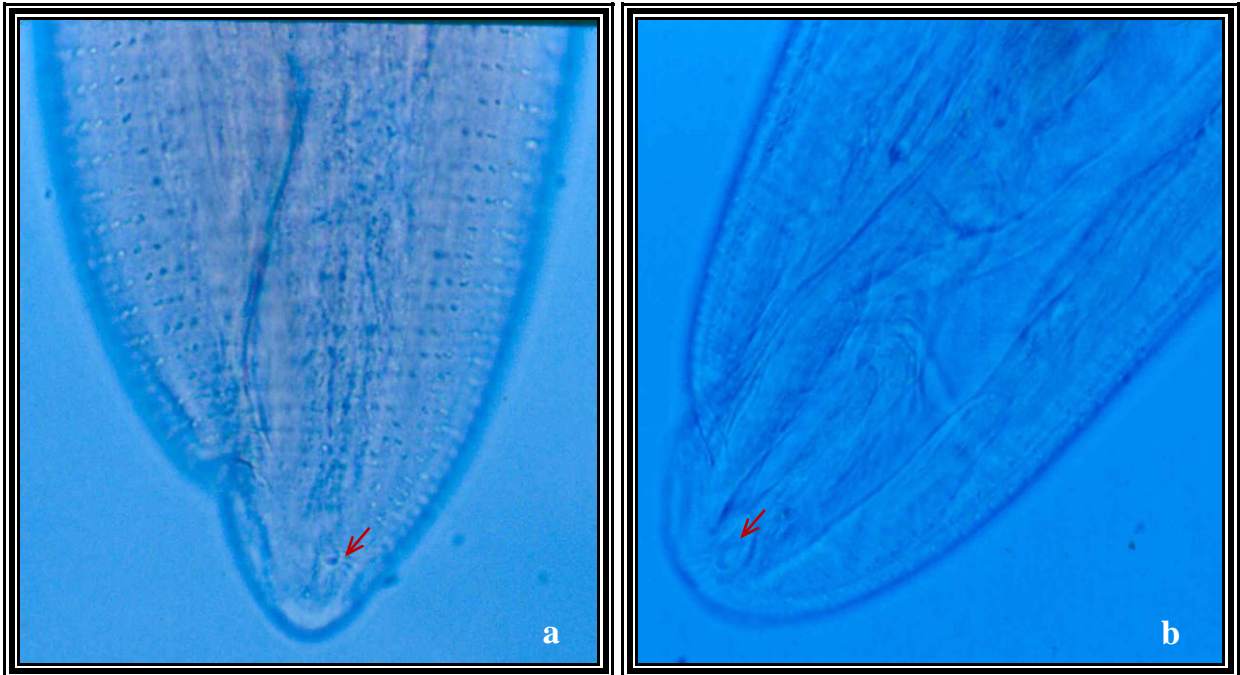


Figura 18.- Fasmidios en el extremo posterior de dos AdvL₃. (a) En desarrollo; (b) Completamente desarrollados.

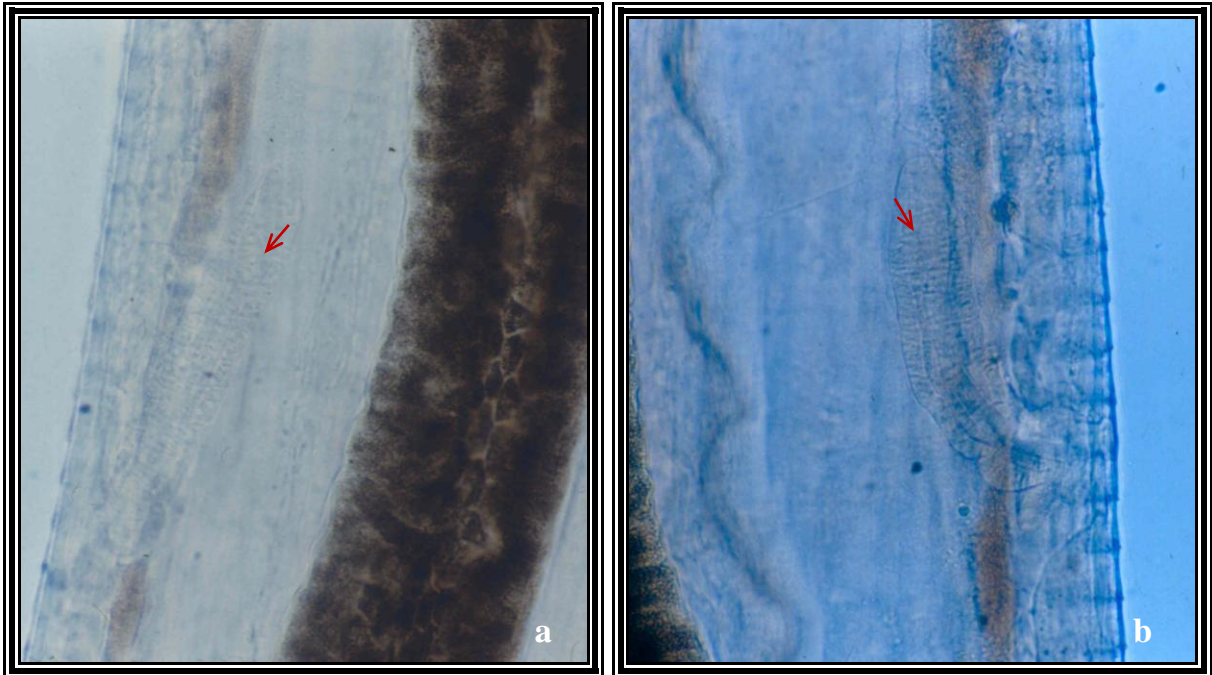


Figura 19.- Detalle del primordio genital de dos AdvL₃ hembras. (a) En desarrollo; (b) Completamente desarrollado.

Tabla 18.- Comparación entre longitudes de AdvL₃ hembras y machos libres o enquistadas de ratones experimentales vs. controles (—: cero).

Ratón	Experimentales				Controles			
	Libres		Enquistadas		Libres		Enquistadas	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
00	5384.58 (n = 4)	4842.96 (n = 1)	—	—	—	—	—	—
0	5286.32 (n = 3)	5191.12 (n = 3)	—	—	—	—	—	—
1	5448.16 (n = 3)	4745.04 (n = 1)	—	—	5193.84 (n = 1)	4989.87 (n = 2)	—	—
2	5573.28 (n = 1)	5142.52 (n = 2)	4643.04 (n = 1)	—	5671.20 (n = 1)	—	5536.56 (n = 2)	5079.60 (n = 1)
3	5128.56 (n = 2)	—	5152.20 (n = 4)	—	—	—	5201.18 (n = 5)	5409.80 (n = 2)
4	—	5221.71 (n = 3)	5393.76 (n=2)	—	—	—	5196.56 (n = 3)	4755.24 (n = 4)
5	5508.00 (n = 1)	5340.72 (n = 1)	5508.00 (n = 2)	5363.16 (n = 2)	—	—	5388.05 (n = 5)	5373.36 (n = 2)

Tabla 19.- Comparación entre longitudes de AdvL₃ hembras y machos libres o enquistadas de ratones experimentales (—: cero).

Ratón	Experimentales				Controles			
	Libres		Enquistadas		Libres		Enquistadas	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
1	—	4783.80 (n = 4)	—	—	—	—	—	—
2	5295.84 (n = 1)	5161.20 (n = 1)	5246.88 (n = 2)	4687.98 (n = 2)	—	—	—	—
3	5267.28 (n = 1)	5193.84 (n = 1)	5144.88 (n = 1)	4712.40 (n = 1)	—	—	—	—
4	—	4451.28 (n = 1)	5234.64 (n = 3)	5000.04 (n = 2)	—	—	—	—
5	5960.88 (n = 1)	5122.45 (n = 2)	5406.00 (n = 2)	4743.00 (n = 2)	—	—	—	—
6	4598.16 (n = 1)	4900.08 (n = 1)	—	4834.80 (n = 1)	—	—	—	—
7	—	—	4932.72 (n = 2)	4846.36 (n = 6)	—	—	—	—
8	5418.24 (n = 1)	—	4828.68 (n = 2)	5097.96 (n = 2)	—	—	—	—
9	—	—	5400.56 (n = 3)	4939.52 (n = 3)	—	—	—	—
10	—	—	4830.72 (n = 2)	4575.72 (n = 2)	—	—	—	—

Un efecto probable de la Prednisona es la formación de un quiste que rodea a la larva en ambos grupos de ratones a los Días 23 y 24 del experimento (Días 48 y 49 postinfección). La formación de este quiste depende principalmente de la defensa del hospedero contra el parásito, o bien se forma una vez que la larva ha alcanzado su máximo desarrollo. Nishikubo (1963) hace notar la formación de quistes tanto en ratas experimentales como en controles a partir de los Días 29 y 21, respectivamente, lo que podría estar indicando un retraso en la formación del quiste en los roedores tratados con Prednisona (una en el Día 23 de ratones experimentales vs. tres en ratones controles en

el Día 24; Tablas 6 y 7). Al comparar estadísticamente el efecto del tratamiento contra el grupo control, considerando la cantidad de larvas recuperadas libres, sí existe una diferencia entre ambos grupos ($P < 0.006$).

Respecto a las longitudes de las larvas, Nishikubo (1963) reporta promedios de 5184.00, 4752.00, 5562.00 y 5762.00 a los 12, 14, 19 y 25 días de tratamiento, respectivamente, y en los controles 4610.00, 4970.00 y 4010.00 a los Días 14, 20 y 26, respectivamente. De manera individual, al Día 19 se obtuvo una larva de 7296.00. Considerando que las AdvL₃ empleadas en el trabajo de Nishikubo (1963) habían alcanzado un máximo desarrollo en un hospedero paraténico natural *Channa argus*, larvas cuya longitud máxima es de 3000 a 4000 según Daengsvang (1981) y Maleewong *et al.* (1995), al ser sometidas a los efectos del acetato de cortisona ganaron longitud e incluso alcanzaron la fase L₅ inmadura. Por su parte, las AdvL₃ empleadas en la Etapa III permanecieron en los ratones desde su fase EaL₃ y se consideraron AdvL₃ a partir del Día 25 postinfección. Por tal motivo, el tratamiento con Prednisona inició una vez considerando el máximo desarrollo de las AdvL₃.

Sin embargo, con los resultados obtenidos y al no detectar cambios morfológicos en las larvas recuperadas se deduce que aún se mantienen en crecimiento; al comparar los resultados del Día 71 donde las larvas que alcanzaron 5614.08 de longitud y al dar continuidad con el experimento, las larvas lograron alcanzar longitudes de 5960.88 en el Día 94 de tratamiento con el fármaco.

En cuanto al porcentaje de AdvL₃ recuperadas, Nishikubo (1963) presentó un promedio general de alrededor del 80 %, mientras que las larvas recuperadas en la Etapa III representan, en promedio, el 52.10% y el 43.75% de recuperación en ratones experimentales y controles, respectivamente, considerándose hasta el Día 71 de tratamiento. La diferencia entre estos porcentajes puede deberse a diferentes razones, a saber: i) larvas inmaduras en los copépodos, ii) incompatibilidad entre ratones y *G. binucleatum*, iii) daños sufridos durante la inoculación y iv) establecimiento en tracto digestivo y migración hacia el hígado. De las posibles causas señaladas, se descartan las tres primeras para el caso particular del presente estudio —con base en los resultados de la Etapa II y en el método empleado al momento de la inoculación. Durante su establecimiento y migración, algunas de las larvas pudieron haber estado expuestas un mayor tiempo a los jugos gástricos del hospedero, o bien pudieron no haber alcanzado los sitios de alimentación y crecimiento (desarrollo) en el tiempo requerido, lo que estaría reflejándose en la baja de larvas al momento de las disecciones. El porcentaje de recuperación aumentó en el experimento que dio continuidad con esta Etapa, en el cual se presentó un 70 % de larvas recuperadas y teniendo un caso de hasta el 100 % de recuperación (Día 117 de tratamiento), lo que apoya los supuestos anteriormente mencionados.

Finalmente, otro factor que indica los efectos del fármaco es el expresado en el peso de los ratones. Mientras que en promedio los ratones bajo tratamiento pesaban 22.09 gr hasta el Día 71 de tratamiento, los del grupo control incrementaron su peso hasta 30.4 gr. Los ratones empleados hasta el Día 152 de tratamiento, presentaron un peso de entre 19.9 y 22.7 gr, considerando la pérdida de peso como uno de los efectos de la inmunosupresión resultante del uso de corticosteroides (Whitmire, 1957; Mathies, 1962; Jacobs *et al.*, 1996).

Protocolo II

Infección de roedores

Las características de las larvas recuperadas de roedores infectados con AdvL₃ naturales no revelan indicio de muda hacia la fase siguiente. De acuerdo a lo reportado en el protocolo anterior (Etapa III), nuevamente se detectó un incremento en la longitud de algunas larvas, las cuales lograron alcanzar 6544.32 hacia el Día 76 de tratamiento, lo que estaría indicando que aún se encuentran en desarrollo pese a que provienen de un hospedero natural donde se esperaría que hubiese alcanzado su máximo desarrollo, tal y como ocurrió con las larvas mencionadas por Nishikubo (1963). Cabe señalar que en ningún trabajo presentado a la fecha se hace mención de AdvL₃ de dimensiones corporales como las presentadas en el presente estudio.

Nuevamente no se descarta el efecto de la Prednisona, ya que hubo un retraso en el enquistamiento en ratones experimentales, tres larvas enquistadas entre el Día 35 y el Día 45 de tratamiento, mientras que en el grupo control la totalidad de las larvas recuperadas estaban enquistadas desde el Día 14. Además, el peso de los roedores también se vio afectado por el fármaco: mientras que en los experimentales el peso oscilaba alrededor de los 22.1 gr, en los controles aumentaba con el paso de los días postinfección llegando hasta 27.6 gr.

La aplicación de corticosteroides a murinos ha sido practicada para modelar infecciones de nemátodos en hospederos inadecuados, es decir, que no participan como hospederos habituales en el ciclo de vida del parásito. Datos experimentales muestran que la cortisona y/o esteroides generalmente reducen la resistencia de mamíferos a infecciones por virus, bacterias, protozoarios y helmintos como resultado de la supresión o debilitamiento de los mecanismos inmunes del hospedero —inhibición de la actividad de eosinófilos, mastocitos y macrófagos—, permitiendo un incremento en la duración de la infección (Spain *et al.*, 1952; Campbell, 1963; Gleich y Loegering, 1984; Abe y Nawa, 1988; Behm y Ovington, 2000; Meeusen y Balic, 2000).

En el caso particular de nemátodos, además del trabajo de Nishikubo (1963) referente a *Gnathostoma*, la aplicación de estos fármacos ha tenido efectos positivos en el establecimiento de

otras especies, por ejemplo: *Nippostrongylus brasiliensis* —parásito gastrointestinal de ratas— presenta un bajo o nulo establecimiento en ratones, hámsters y conejos a diferencia de las ratas, pero la aplicación diaria de acetato de cortisona a conejillos de indias *Cavia porcellus* ha permitido el establecimiento de larvas y gusanos adultos del parásito (Parke, 1961). Particularmente, las larvas de *N. brasiliensis* en hospederos inadecuados son atrapadas por la respuesta inflamatoria del hospedero impidiendo su migración hacia el intestino donde completan su desarrollo, pero la cortisona suprime dicha respuesta permitiendo la migración además de incrementar los porcentajes de recuperación de parásitos, 1.1-5.9 % en controles y 12.0-18.3 % en experimentales. *Trichuris muris* parasita a ratones pero con una expulsión temprana en una primera infección (20 dpi); sin embargo, la supresión de las células T mediante la aplicación de cortisona ha inhibido dicha expulsión manteniendo la infección por un tiempo más prolongado (70 dpi) además de incrementar la carga parasitaria (Wakelin y Selby, 1974; Phillips y Wakelin, 1976; Lee y Wakelin, 1982). Casos similares han sido reportados para *Aspergillus fumigatus* (Duong *et al.*, 1998), *Aspicularis tetraptera* (Mathies, 1962) y *Trichinella spiralis* (Coker, 1956; Markell, 1958), generando incrementos en las cargas parasitarias y suprimiendo la respuesta inflamatoria.

Infección de gatos

La infección de hospederos definitivos propios de *G. binucleatum* (perros y gatos) ha sido recurrente para obtener su fase adulta (Medina-Vences, 1988; Almeyda-Artigas, 1991; Koga *et al.*, 1999; Díaz-Camacho *et al.*, 2002; Álvarez-Guerrero *et al.* 2010), y como resultado se ha logrado obtener fases larvarias, adultos inmaduros y adultos maduros. Sin embargo, en ninguno de los casos se hace mención de algún morfotipo larvario que pudiera manifestar la presencia de un cuarto estadio. En el caso particular de Díaz-Camacho *et al.* (2002), se infectaron cinco gatos y un perro con 20 AdvL₃ cada uno —obtenidas de garzas y peces—, recuperando de un gato parásitos en diferentes etapas de desarrollo en estómago, hígado y músculos torácicos a los 17 dpi. Uno de los gusanos, catalogado como un “adulto joven”, además de tener características propias de la fase adulta (p. ej., nueve hileras de ganchos en el bulbo cefálico) presentaba restos de una cutícula con características de una AdvL₃ que se extendía desde la parte media del cuerpo hacia el extremo posterior. Del perro lograron recuperar diez gusanos (sin catalogar) a los 35 dpi.

Descripciones

Larva de tercer estadio avanzado/Premudados

En términos generales, las características morfológicas de las **larvas de tercer estadio avanzado** y de los gusanos **premudados** de *G. binucleatum* recuperados tanto de ratones inmunosuprimidos de los Protocolos I y II como de gatos, no difieren entre sí, ni respecto de datos morfológicos presentados por diversos autores para AdvL₃ naturales. La única diferencia a considerar fue el incremento en su longitud como una posible respuesta a la inmunosupresión o por haberse desarrollado en un hospedero definitivo propio de la especie, alcanzando, p. ej., longitudes de 6874.8 en un gato con 22 dpi. Por su parte, las AdvL₃ recuperadas en hospederos intermediarios y paraténicos muestran normalmente longitudes de entre 3100.0 y 4300.0 (Almeyda-Artigas, 1991; Kifune *et al.*, 2004; Álvarez-Guerrero y Alba-Hurtado, 2007; García-Márquez *et al.*, 2009), aunque pueden alcanzar hasta 5800.0 —recuperada de un caracara— (dato no publicado, LSAyPM). Lo anterior considerando que se trata de hospederos en los que las larvas no continúan con su desarrollo, por lo que el aumento en longitud se ve mermado, contrario a las condiciones ofrecidas por los ratones y los gatos, lo que les permitió incrementar su longitud e incluso mudar a fase siguiente (L₅).

En proceso de muda

Los reportes de gusanos en proceso de muda de *G. hispidum*, *G. spinigerum*, *G. doloresi*, *G. binucleatum* y *G. turgidum* hacen alusión a una cutícula externa con características propias de una AdvL₃ (cuatro hileras de ganchos en el bulbo cefálico, hileras de espinas simples en el cuerpo), mientras que la nueva cutícula, es decir, la interna, presenta características de la fase adulta (p. ej., ocho a diez hileras de ganchos en el bulbo cefálico, hileras de escamas complejas en el cuerpo, presencia de vagina y espículas en desarrollo). En algunos casos, la cutícula externa permaneció unida al cuerpo (Imai y Hasegawa, 2001; Díaz-Camacho *et al.*, 2002; Mosqueda-Cabrera *et al.*, 2009), mientras que en otros, se había desprendido casi en su totalidad (Maleewong *et al.*, 1995). Los gusanos en proceso de muda recuperados de los gatos se encontraban en una etapa inicial de este proceso, por lo que las cutículas estaban sobrepuestas manteniendo las características de ambas fases (AdvL₃ y L₅). Esta doble cutícula permite plantear dos hipótesis: i) existe una larva de cuarto estadio, que es morfológicamente indistinguible de una AdvL₃ o de un L₅ inmaduro; ii) la AdvL₃ muda directamente a L₅. Las observaciones morfológicas de este trabajo, junto con el hecho de que el crecimiento y desarrollo de los nemátodos es mediado por procesos de muda (que consisten de dos

pasos: la síntesis de una nueva cutícula y el desprendimiento de la antigua), y que entre cada proceso se presentan cambios morfológicos que distinguen a las diferentes fases (Lee, 1970; Imai & Hasegawa, 2001), permiten sustentar la segunda hipótesis.

Postmudados

Las características morfológicas de los gusanos postmudados comparadas con las de adultos inmaduros y/o adultos presentados en la literatura no muestran diferencias contundentes como para suponer que los primeros pertenezcan a un estadio distinto a la fase adulta. En todos los casos se hace mención de gusanos con un bulbo cefálico provisto de nueve o diez hileras completas de ganchos, papilas cervicales, poro excretor, hileras de escamas que cubren en su totalidad el cuerpo, las cuales son complejas en el extremo anterior (con dos o tres puntas) y simples hacia el extremo posterior (una punta). Las hembras presentan una vulva ubicada alrededor de 60 % del cuerpo, mientras que los machos tienen un par de espículas y papilas caudales. Al comparar las longitudes de gusanos adultos recuperados de hospederos naturales y experimentales, las cuales oscilan entre 13.0 y 57.0 mm (Almeyda-Artigas, 1991; Mosqueda-Cabrera, 2003; Álvarez-Guerrero *et al.* 2010; Díaz-Camacho *et al.* 2002), se considera a los gusanos postmudados como adultos en crecimiento al presentar longitudes de entre 6.6 y 9.7 mm.

Tiempo, Longitud y Desarrollo

Inicialmente se creyó que habría una marcada relación entre el tiempo de infección, la longitud y el desarrollo del parásito, lo que permitiría agrupar a los gusanos recuperados en las diferentes etapas de experimentación, en caso de no presentarse una diferencia morfológica (indicativo de muda); sin embargo, no siempre sucedió así.

Al inicio de los experimentos, hubo un desarrollo homogéneo entre los procesos de muda de los primeros estadios (L_1 — L_2 — EaL_3) respecto al tiempo, alcanzando el estadio siguiente de forma sincronizada. No obstante, dicha relación perdió sentido durante el desarrollo de la $AdvL_3$ hacia el estadio siguiente (L_4 o L_5), ya fuese empleando hospederos definitivos inadecuados (roedores bajo inmunosupresión) u hospederos definitivos naturales (gatos infectados experimentalmente). En todos los hospederos (roedores y gatos), el comportamiento en el desarrollo fue irregular, ya que se hubiera esperado encontrar gusanos con un mismo desarrollo, o al menos muy próximo, al momento de su recuperación en función del tiempo postinfección. No obstante, el estado de desarrollo de las larvas y de los adultos inmaduros no reflejó una relación particular con los días postinfección, o bien,

respecto a su longitud. Por ejemplo, en ratones infectados con EaL₃ al Día 30 postinfección con cinco días de tratamiento con Prednisona, se obtuvieron larvas libres con longitudes de entre 4842.96 y 5638.56, mientras que larvas recuperadas a los 107 dpi con 103 días de tratamiento medían entre 4598.16 y 4900.08 de longitud, siendo más pequeñas que las primeras (4598.16 vs. 5638.56). Respecto a las larvas libres de ratones infectados con AdvL₃ obtenidas de un hospedero natural (caracara), las longitudes oscilaron entre 5180.60 y 6544.32 en un lapso de 76 dpi/ddt.

En los gatos el comportamiento del desarrollo también fue irregular, pese a que trataba de hospederos definitivos adecuados. En el primer grupo de dos gatos, en los que se esperaba tener larvas con cinco y diez días de desarrollo en uno de ellos, las larvas midieron entre 4981.68 y 6552.48 de longitud, mientras que en el otro al Día 35 tenían longitudes de entre 5406.00 y 5716.08 (Tabla 14). En el segundo grupo (de cuatro gatos), el crecimiento fue discontinuo al tener larvas con longitudes de 6874.80 al Día 22 y de 6058.80 al Día 77. La fase de desarrollo no mantuvo relación respecto a los días postinfección, teniendo así gusanos premudados desde el Día 17 y hasta el Día 77; en proceso de muda en los Días 22 y 25, y gusanos mudados (adultos inmaduros) en los días 25, 27 y 77. Además, en los últimos casos, la cantidad de gusanos mudados se vio disminuida (Tabla 18).

Al respecto, otros estudiosos del tema han reportado adultos inmaduros de *G. binucleatum* después de los Días 17, 35 y 47, e incluso en el séptimo, noveno y treceavo mes, así como adultos maduros desde el octavo mes (Medina-Vences, 1988; Almeyda-Artigas, 1991; Koga *et al.*, 1999; Díaz-Camacho *et al.*, 2002; Álvarez-Guerrero *et al.* 2010). Así, en la Tabla 20 se observa que dentro de los primeros cuatro meses postinfección pueden ser recuperados indistintamente gusanos premudados (AdvL₃) o adultos inmaduros (p. ej., a partir del Día 17).

Tabla 20.- Relación entre desarrollo y tiempo postinfección en hospederos definitivos experimentales (*: terminología empleada en el presente estudio).

A. Maduros												
Postmudados* (= A. Inmaduros)												
En muda												
Premudados* (= AdvL ₃)												
	6	17	22	25	27	35	47	77	4	7	9	13
	Días								Meses			

La relación entre las diferentes fases de desarrollo y sus longitudes (Tabla 21) refleja una dependencia. Al comparar caracteres morfológicos, datos morfométricos y estadísticos, las AdvL₃ y los gusanos premudados no presentan diferencias entre sí que indiquen que se trata de fases distintas, por lo que las AdvL₃ pueden alcanzar longitudes que oscilan entre 4553.28 y 68740.80; durante este crecimiento aumenta el desarrollo de estructuras como el esófago, los fasmidios y, en el caso de las hembras, la incipiente vagina.

Los gusanos en proceso de muda presentan longitudes significativamente diferentes ($P < 0.04$) con respecto a las AdvL₃, lo que permite su agrupación, aunado a la presencia de la doble cutícula. En el caso de los postmudados, existen diferencias significativas ($P < 0.001$) entre sus longitudes y las de adultos inmaduros y maduros; sin embargo, las características morfológicas indican que se trata de la misma fase, en crecimiento. No obstante, los gusanos postmudados y los adultos inmaduros pueden distinguirse perfectamente de los adultos sexualmente maduros —con espículas totalmente desarrolladas (machos) y úteros con huevos (hembras).

Finalmente, cabe resaltar que de acuerdo con Medina-Vences (1988), Almeyda-Artigas (1991), Koga *et al.* (1999), Díaz-Camacho *et al.* (2002) y Álvarez-Guerrero *et al.* (2010), se pueden encontrar AdvL₃ con longitudes de 6544.32 y al mismo tiempo gusanos de 6262.80 en proceso de muda, o bien gusanos postmudados de 6638.13 y AdvL₃ de 6874.80 (Tabla 21).

Tabla 21. - Relación entre las fases de desarrollo y sus longitudes (A: Adultos; *: terminología empleada en el presente estudio).

	Mínima	Máxima	Promedio
A. Maduros	20950.00	57000.00	38975.00
A. Inmaduros	8694.00	26770.00	17732.00
Postmudados*	6638.16	9738.96	7996.80
En muda	6262.80	6936.00	6590.56
Premudados*	4920.48	6874.80	6018.47
AdvL₃	4553.28	6544.32	5548.80

Larva de cuarto estadio

La presencia de una larva de cuarto estadio al interior del género *Gnathostoma* ha sido considerada en la literatura principalmente de manera hipotética, o bien, teniendo bases en especímenes atípicos. La hipótesis sobre la presencia de este estadio retoma el supuesto de que los nematodos están conformados por cuatro estadios larvarios y un adulto, como ocurre por ejemplo en ascáridos,

rabdítidos, estrombóridos y espirúridos, lo que podría sugerir que esta característica es compartida por todos los nemátodos. Sin embargo, se presentan casos en los que esta regla no se cumple; por ejemplo, Hasegawa *et al.* (2000) realizaron experimentalmente el ciclo *in vivo* de *Spiroxys hanzaki* (Nematoda: Gnathostomatidae), determinando la ausencia del cuarto estadio al no encontrar gusanos morfológicamente distintos a las larvas de tercer estadio y a los adultos, y sugirieron que este hecho podría ser característico de otros gnatostómidos.

La descripción de larvas atípicas de *Gnathostoma* se basa principalmente en diferencias cuticulares de algunos ejemplares. Por ejemplo, Le-Van-Hoa *et al.* (1965) hicieron mención de larvas de *G. hispidum* recuperadas de su hospedero definitivo *Sus scrofa domesticus*, las cuales midieron entre ocho y 12 mm de longitud, con cuatro hileras de ganchos en el bulbo cefálico y con hileras de espinas transversales en forma de “mamelones”. Además, lograron recuperar gusanos en proceso de muda cuya cutícula externa tenía características de una larva, aparentemente de cuarto estadio, con longitudes de entre 12.5 y 13.7, órganos sexuales definidos y una cutícula externa con características típicas del adulto; sin embargo, más allá de las cuatro hileras en el bulbo cefálico no presentaron una descripción de las espinas cuticulares externas. Así mismo, Le Thi Xuan *et al.* (2002), mencionaron una larva atípica de *G. spinigerum* considerando las diferencias en los ganchos del bulbo cefálico, ya que la base de los ganchos de una AdvL₃ típica es ovalada (p. ej., 13 x 8 y 16 x 8 µm), mientras que los de la reportada era casi circular (p. ej., 11 x 13 y 10 x 10 µm).

Por otro lado, Almeyda-Artigas *et al.* (2010) describieron un caso de precocidad de una AdvL₃ de *G. turgidum* en un hospedero paraténico, aunque pudiera tratarse de una L₄; dicha duda surgió al comparar la morfología cuticular de una AdvL₃ típica con la cutícula del gusano en cuestión. La cutícula de las primeras presenta hileras transversales de espinas que cubren todo el cuerpo; sin embargo, la cutícula evaluada presentaba hileras de espinas que sólo cubrían alrededor del 25 % de su cuerpo, además de presentar un bulbo cefálico con cuatro hileras de ganchos con una base casi circular. Otra diferencia entre ambos grupos de larvas es el aumento en las dimensiones corporales, ya que las AdvL₃ típicas de *G. turgidum* alcanzan longitudes de entre 1.5 y 2 mm de largo, mientras que la probable/supuesta L₄ midió 9.7 mm.

En este sentido, los cambios morfológicos de los casos anteriores pudieran indicar que existe un cuarto estadio con características diferentes a una AdvL₃ y a la fase adulta. Sin embargo, las fases larvarias recuperadas de gatos y ratones no presentaron alguna modificación cuticular, sólo un aumento en su longitud como ocurrió en los casos de *G. hispidum* y *G. turgidum*, por lo que de existir un cuarto estadio larvario se hubiera recuperado al menos un gusano que morfológicamente

indicara un estadio distinto, lo anterior considerando la cantidad de vermes recuperados y los monitoreos periódicos del desarrollo, desde el embrionario hasta la obtención de adultos inmaduros. Respecto al aumento en la longitud, esto puede tener sentido bajo la luz del hecho de que en los espirúridos, al usar hospederos intermediarios, sus larvas de tercer estadio no crecen considerablemente en ellos, mientras que en los gnatostómidos éstas ganan longitud corporal (de ahí que se les conozca como AdvL₃). No obstante, las larvas de tercer estadio de los espirúridos rara vez crecen marcadamente en el hospedero definitivo, pero mudan al cuarto estadio, mientras que las AdvL₃ de *Gnathostoma* crecen ampliamente antes de mudar. Esto sugiere que el inusual crecimiento “preparatorio” estaría compensando la ausencia de una larva de cuarto estadio (Anderson, 2000; Imai y Hasegawa, 2001).

XI.- CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en las que se llevó a cabo el experimento se puede concluir que:

- ❖ No es posible afirmar que el uso del corticosteroide en ratones infectados permita sustituir al hospedero definitivo natural, ya que durante el periodo de tratamiento (148 días para larvas provenientes de copépodos y 76 días para larvas provenientes de hospederos paraténicos naturales) no se obtuvieron larvas mudadas o en proceso de muda.
- ❖ Sin embargo, se puede afirmar que el uso del corticosteroide permitió el crecimiento y el desarrollo de las larvas de tercer estadio avanzado que no se enquistaron, como consecuencia del retraso de la respuesta inflamatoria.
- ❖ Los gusanos premudados hallados en la pared muscular de gatos infectados corresponden a larvas de tercer estadio avanzado.
- ❖ La cutícula externa de los gusanos en proceso de muda es idéntica tanto a la de larvas de tercer estadio avanzado típicas así como a la de los gusanos premudados.
- ❖ Las características de la cutícula interna de los gusanos en proceso de muda y de los gusanos postmudados corresponden a adultos inmaduros (L₅).
- ❖ Con base en la comparación morfológica de gusanos premudados, en proceso de muda y postmudados, se concluye que, para el caso de *G. binucleatum*, se presenta una sola muda en el hospedero definitivo; es decir, no hay larva de cuarto estadio. Así, su ciclo de vida queda conformado por tres estadios larvarios (L₁, L₂ y L₃) y formas adultas (L₅).

XII.- BIBLIOGRAFÍA

- Abe, T.** & Y. Nawa. 1988. Worm expulsion and mucosal mast cell response induced by repetitive IL-3 administration in *Strongyloides ratti* infected nude mice. *Immunology* **63**:181-185.
- Adamson, M. L.** 1986. Modes of transmission and evolution of life histories in zooparasitic nematodes. *Canadian Journal of Zoology* **64**: 1375-1384.
- Adamson, M. L.** 1989. Constraints in the evolution of life histories in zooparasitic Nematoda. In: KoRC, ed. Current Concepts in Parasitology. Hong Kong: University Press, Hong Kong 221-253.
- Almeyda-Artigas, R. J.** 1991. Hallazgo de *Gnathostoma binucleatum* n. sp. (Nematoda: Spirurida) en felinos silvestres y el papel de peces dulceacuícolas y oligohalinos como vectores de la gnatostomiasis humana en la Cuenca Baja del Río Papaloapan, Oaxaca-Veracruz, México. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México* **18** (2): 137-155.
- Almeyda-Artigas, R. J.,** M. A. Mosqueda-Cabrera, E. Sánchez-Núñez, G. Saldaña-Martínez, M. E. Hernández-Viciconti, E. Alcolea-Herrera. 1995. Development of *Gnathostoma binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991 (Nematoda: Gnathostomidae) in its first intermediate experimental host. *Research and Reviews in Parasitology* **55**: 189–194.
- Almeyda-Artigas, R. J.** 1998. *Caracterización y diferenciación de especies del género Gnathostoma Owen, 1836 (Nematoda: Spirurida: Gnathostomatoidea) en base a secuencias de genes ribosomales (5.8S y 18S) y sus respectivos espaciadores internos (ITS-1 e ITS-2)*. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Valencia, España, 545 pp.
- Almeyda-Artigas, R. J.,** M. A. Mosqueda-Cabrera, E. Sánchez-Núñez, G. Saldaña-Martínez, M. E. Hernández-Viciconti & E. Alcolea-Herrera. 1995. Development of *Gnathostoma binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991 (Nematoda: Gnathostomidae) in its first intermediate experimental host. *Research and Reviews in Parasitology* **55** (3): 189-194.
- Almeyda-Artigas, R. J.,** M. D. Barges & S. Mas-Coma. 2000. ITS-2 rDNA sequencing of *Gnathostoma* species (Nematoda) and elucidation of the species causing human gnathostomiasis. *Journal of Parasitology* **86** (3): 537-544.
- Almeyda-Artigas, R. J.,** M. A. Mosqueda-Cabrera, E. Sánchez-Núñez. 2010. Precocity of *Gnathostoma turgidum* in naturally infected four-eyed opossum *Philander opossum pallidus* from Temascal, Oaxaca, Mexico. *Parasitology Research* **106**: 493-443.
- Álvarez-Guerrero, C.** & F. Alba-Hurtado. 2007. Estuarine fish and turtles as intermediate and paratenic hosts of *Gnathostoma binucleatum* in Nayarit, México. *Parasitology Research* **102** (1): 117-122.
- Álvarez-Guerrero, C.,** M. A. Muñoz-Guzmán, J. A. Buendía-Jiménez & F. Alba-Hurtado. 2010. *Gnathostoma binucleatum*: Pathological and parasitological aspects in experimentally infected dogs. *Experimental Parasitology* **127** (1): 84-9.
- Anantaphruti, M.,** J. Waikagul, S. Nithi-Uthai, S. Pubampen & W. Rojekittikhun. 1986. Detection of humoral immune response to *Gnathostoma spinigerum* in mice. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* **17**(2):172-176.
- Anderson, R. C.** 1964. *Gnathostoma miyazakii* n. sp. from the otter (*Lutra c. canadensis*) with comments on *G. sociale* (Leidy, 1858) of mink (*Mustela vison*). *Canadian Journal of Zoology* **42** (2): 249-254
- Anderson, R. C.** 1988. Nematode transmission patterns. *Journal of Parasitology* **74**: 30-45.
- Anderson, R. C.** 2000. *Nematode parasites of vertebrates. Their development and transmission*. 2nd ed. CAB International Publishing, Wallingford, UK, 650 pp.

- Ando, K.**, H. Tanaka & Y. Chinzei. 1989. Influence of temperature on development of eggs and larvae of *Gnathostoma nipponicum* Yamaguti, 1941. *Journal of Parasitology* **38**: 31-37.
- Ash, L. R.** 1960. *The life cycle and epidemiology of Gnathostoma procyonis* Chandler, 1942, a nematode parasite of the raccoon. Doctoral thesis, University of Tulane, New Orleans, Louisiana, USA, 68 pp.
- Ash, L. R.** 1962a. Development of *Gnathostoma procyonis* Chandler, 1942, in the first and second intermediate hosts. *Journal of Parasitology*, **48** (2): 298-305.
- Ash, L. R.** 1962b. Migration and development of *Gnathostoma procyonis* Chandler, 1942, in mammalian hosts. *Journal of Parasitology* **48** (2): 306-313.
- Ashford, R. W.** & W. Crewe. 2003. *The parasites of Homo sapiens. An annotated checklist of the Protozoa, Helminths and Arthropods for which we are home.* 2nd ed. Taylor & Francis Inc., NY, USA, 142 pp.
- Babero, B. B.** & J. R. Shepperson. 1959. On the occurrence of gnathostomes in Georgia, USA. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* **26** (1): 53-54.
- Behn, C. A.** & K. S. Ovington. 2000. The role of eosinophils in parasitic helminth infections: insights from genetically modified mice. *Parasitology Today* **16** (5): 202-209.
- Caballero-García, M. L.**, R. J. Almeyda-Artigas, M. A. Mosqueda-Cabrera & E. Jiménez-Cardozo. 2005. Protein profile analysis from advanced third-stage larvae (AdvL₃) and adult worms of *Gnathostoma binucleatum* (Nematoda: Spirurida). *Experimental Parasitology* **110**: 140-145.
- Campbell, W.** 1963. Spontaneous cure in *Trichuris muris* infections in albino mice and its suppression by cortisone. *Journal of Parasitology* **49** (4): 628-632.
- Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC).** www.cdc.gov. Actualización 2010.
- Chabaud, A. G.** 1955. Essai d'interprétation phylétique des cycles évolutifs chez nématodes parasites des vertébrés. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* **30** (1-2): 83-126.
- Clark, W. C.** 1994. Origins of the parasitic habit in the nematoda. *International Journal for Parasitology* **24**: 1117-1 129.
- Coker, C. M.** 1956. Effects of cortisone on cellular inflammation in the musculature if mice given one infection with *Trichinella spiralis*. *Journal of Parasitology* **42** (5): 479-484.
- Combes, C.** 2001. *Parasitism. The ecology and evolution of intimate interactions.* University of Chicago Press, USA, 728 pp.
- Daengsvang, S.** 1971. Infectivity of *Gnathostoma spinigerum* larvae in primates. *Journal of Parasitology* **57** (3): 476-478.
- Daengsvang, S.** 1972. An experimental study on the life cycle of *Gnathostoma hispidum* Fedchenko, 1872, in Thailand, with special reference to the incidence and some significant morphological character of the adult and larval stages. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* **3**:376-389.
- Daengsvang, S.** 1980. *A monograph on the genus Gnathostoma and gnathostomiasis in Thailand.* Southeast Asian Medical Information Center and International Medical Foundation, Tokyo, Japan, 85 pp.
- Daengsvang, S.** 1981. Gnathostomiasis in southeast Asia. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* **12** (3): 319-332.
- Díaz-Camacho, S. P.**, K. Willms, M. Zazueta-Ramos, M. C. de la Cruz-Otero, Y. Nawa & H. Akahane. 2002. Morphology of *Gnathostoma* spp. isolated from natural hosts in Sinaloa, Mexico. *Parasitology Research* **88** (7): 639-645.
- Díaz-Camacho, S. P.**, F. Delgado-Vargas, K. Willms, M. C. de la Cruz-Otero, J. G. Rendón-Maldonado, L. Robert, S. Antuna & Y. Nawa. 2010. Intrahepatic growth and maturation of *Gnathostoma turgidum* in the natural definitive opossum host, *Didelphis virginiana*. *Parasitology International* **4**: 1-6.

- Dove, C. J.** & R. C. Banks. 1999. A taxonomic study of crested caracaras (Falconidae). *The Wilson Bulletin* **111** (3): 330-339.
- Douglas, J. R.** & N. F. Baker. (1959). The chronology of experimental intrauterine infections with *Toxocara canis* (Werner, 1782) in the dog. *Journal of Parasitology* **45** (Suppl.): 43-44.
- Duncan, J. L.** 1972. The life cycle, pathogenesis and epidemiology of *Strongylus vulgaris* in the horse. *Equine Veterinary Journal* **5** (1): 20-25.
- Duong, M.,** N. Ouellet, M. Simard, Y. Bergeron, M. Olivier & M. Bergeron. 1998. Kinetic study of host defense and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus* in steroid-induced immunosuppressed mice. *Journal of Infectious Diseases* **178** (5): 1472-1482.
- Euzet, L.** & C. Combes. 1980. Les problèmes de l'espèce chez les animaux parasites. **In:** Ch. Bocquet, J. Générmont et M. Lamotte (Eds.), *Problèmes de l'espèce dans le Règne Animal*, Mémoire no. 40 de la Société Zoologique de France **3**: 239-285.
- Fachet, J.** & D. M. V. Parrott, 1972. Effect of corticosteroids and adult thymectomy on induction and recall of contact sensitivity in mice. *Clinical & Experimental Immunology* **10** (4): 661-672.
- Flores-Barroeta, L.,** E. Hidalgo-Escalante & F. García-Torres. 1961. Datos adicionales de *Gnathostoma* en huéspedes norteamericanos. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, México* **10**: 107-111.
- Fülleborn, F.** 1929. On the larval migration of some parasitic nematodes in the body of the host and its biological significance. *Journal of Helminthology* **7**: 15-26.
- García Márquez, L. J.,** S. P. Díaz Camacho & D. Osorio Sarabia. 2001. Reacción inflamatoria causada por larvas de *Gnathostoma* sp. (Nematoda: Gnathostomatidae) en músculos de aves ictiófagas en México. *Veterinaria México* **32** (4): 265-270.
- García-Márquez, L. J.,** R. Lamothe-Argumedo, D. Osorio-Sarabia², L. García-Prieto & V. León-Règagnon. 2009. Morphological and molecular identification of *Gnathostoma binucleatum* (Nematoda: Gnathostomatidae) advanced third stage larvae (AdvL3) in the state of Colima, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **80**: 867- 870.
- Gillespie, S. H.** 2004. Cutaneous larva migrans. *Current Infectious Disease Reports* **6** (1): 50-53.
- Gleich, G. J.** & D. A. Loegering. 1984. Immunobiology of eosinophils. *Annual Review of Immunology* **2**:429-459.
- González-Castañeda, R. E.,** E. A. Castellanos-Alvarado, M. R. Flores-Márquez, O. González-Pérez, S. Luquin, J. García-Estrada & C. Ramos-Remus. 2007. Deflazacort induced stronger immunosuppression than expected. *Clinical Rheumatology* **26**:935-940.
- González-Pérez, O.,** C. Ramos-Remus, J. García-Estrada & S. Luquin. 2001. Prednisone induces anxiety and glial cerebral changes in rats. *Journal of Rheumatology* **28**: 2529-2534.
- Harnnoi, T.,** P. Uparanukraw, P. Chaiwong & N. Morakote. 2005. Observation on exsheathment of *Gnathostoma spinigerum* larva and its penetration through the stomach wall of *Cyclops*. *Chiang Mai Medical Bulletin* **44** (2): 79-83.
- Hasegawa, H.,** T. Doi, A. Fujisaki & A. Miyata. Life history of *Spiroxys hanzaki* Hasegawa, Miyata, et Doi, 1998 (Nematoda: Gnathostomatidae). *Comparative Parasitology* **67**:224–229.
- Hernández-Ortiz, G.,** J. Nesme-Kuri & J. Flores-Castañón. 1982. Gnathostomiasis humana. Manifestaciones oculares. Presentación de un caso clínica. *Anales de la Sociedad Mexicana de Oftalmología* **56** (1): 65-73.
- Imai, J. I.** & H. Hasegawa. 2001. Molting of *Gnathostoma doloresi* (Nematoda: Gnathostomatoidea) in the definitive host. *Journal of Parasitology* **87** (1): 14-18.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI).** www.inegi.org.mx. Actualización 2009.

- Jacobs, S.,** A. L. Bootsma, P. W. Willems, P. R. Bär & J. H. Wokke. 1996. Prednisone can protect against exercise-induced muscle damage. *Journal of Neurology* **243** (5): 410-416.
- Kifune, T.,** R. Lamothe-Argumedo, L. García-Prieto, A. Ocegüera-Figueroa & V. León-Règagnon. 2004. *Gnathostoma binucleatum* (Spirurida: Gnathostomatidae) en peces dulceacuícolas de Tabasco, México. *Revista de Biología Tropical* **52** (2): 371-376.
- Kirkpatrick, C. E.,** J. B. Lok, M. H. Goldschmidt & S. L. Mellman. 1987. Gastric gnathostomiasis in a cat. *Journal of the American Veterinary and Medical Association* **190** (11): 1437-1439.
- Koga, M.,** H. Akahane, K. Ogata, R. Lamote-Argumedo, D. Osorio-Sarabia, L. García-Prieto & J. M. Martínez-Cruz. 1999. Adult *Gnathostoma* cf. *binucleatum* obtained from dogs experimentally infected with larvae as an etiological agent in Mexican gnathostomiasis: external morphology. *Journal of the Helminthological Society of Washington* **66** (1): 41-46.
- Le Thi Xuan & W. Rojekkittikhun.** 2000. A survey of infective larvae of *Gnathostoma* in eels sold in Ho Chi Minh City. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* **31** (1): 133-137.
- Le Thi Xuan, W. Rojekkittikhun, B. Punpoowong, Le Nhu Trang & Tran Vinh Hien.** 2002. Case report: intraocular gnathostomiasis in Vietnam. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* **33** (3): 485-489.
- Le-Van-Hoa,** Nguyen-Van-Ai & Ta-Van-Luyen. 1965. Gnathostomes et gnathostomose humaine au Vietnam. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* **58** (1): 236-244.
- Lee, D. L.** 1970. Moulting in nematodes: the formation of the adult cuticle during the final moult of *Nippostrongylus brasiliensis*. *Tissues and Cell* **2** (1): 139-153.
- Lee, D. L.** 2002. *Life cycles.* In: D. L. Lee (Ed.), *The biology of nematodes*. 1st ed. Taylor & Francis Inc., NY, USA, pp. 61-72.
- Lee, T. D. G. & D. Wakelin.** 1982. Cortisone-induced immunotolerance to nematode infection in CBA/Ca mice. I. Investigation of the defect in the protective response. *Immunology* **47** (2): 227-232.
- Maleewong, W.,** P. Loahabhan, C. Wongkham, P. Intapan, N. Morakote & C. Khamboonruang. 1992. Effects of albendazole on *Gnathostoma spinigerum* in mice. *Journal of Parasitology* **78** (1): 125-126.
- Maleewong, W.,** P. M. Intapan, J. Khempila, S. Wongwajana, C. Wongkham & N. Morakote. 1995. *Gnathostoma spinigerum*: growth and development of third-stage larvae *in vitro*. *Journal of Parasitology* **81** (5): 800-803.
- Maleewong, W.,** P. M. Intapan, K. Ieamviteevanich, C. Wongkham & N. Morakote. 1997. Growth and development of *Gnathostoma spinigerum* early third-stage larvae *in vitro*. *Journal of Helminthology* **71** (1): 69-71.
- Margolis, L.,** G.W. Esch, J.C: Holmes, A:M. Kuris & G.A: Schad. 1982. The use of ecological terms in Parasitology (Report of an *ad hoc* Committee of the American Society of Parasitologists): *Journal of Parasitology* **68** (1): 131-133.
- Markell, E.K.** 1958. The effect of cortisone treatment upon the longevity and productivity of *Trichinella spiralis*. *Journal of Infectious Diseases* **102** (2): 158-61.
- Martínez-Cruz, J. M.,** R. Bravo-Zamudio, A. Aranda-Patracá & R. Martínez-Marañón. 1989. La gnathostomiasis en México. *Salud Pública de México* **31** (4): 541-549.
- Mathies, A. W.** 1962. Certain aspects of the host-parasite relationship of *Aspicularis tetraptera*, a muse pinworm. III Effect of cortisone. *Journal of Parasitology* **48** (2):244-248.
- Medina-Vences, R. L.** 1988. *Estudio de la larva de tercer estadio de Gnathostoma sp. en peces dulceacuícolas de Temascal, Oaxaca, México.* Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México, 53 pp.

- Meeusen, E. N. T.** & A. Balic. 2000. Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? *Parasitology Today* **16** (2): 95-101.
- Mehlhorn, H.** 1988. *Parasitology in focus: facts and trends*. Springer-Verlag, Berlin, 924 pp.
- Miyazaki, I.** 1954. Studies on *Gnathostoma* occurring in Japan (Nematoda: Gnathostomidae). II.- Life history of *Gnathostoma* and morphological comparison of its larval forms. *Kyushu Memoirs of Medical Sciences* **5** (2):123-139.
- Miyazaki, I.** 1960. On the genus *Gnathostoma* and human gnathostomiasis, with special reference to Japan. *Experimental Parasitology* **9**: 338-370.
- Miyazaki, I.** 1966. *Gnathostoma* and gnathostomiasis in Japan. **In:** K Morishita, Y Koyima & H Matsubayashi (Eds.), *Progress in Medical Parasitology in Japan*, Meguro Parasitological Museum, Tokyo, Japan, pp. 529-586.
- Miyazaki, I.** & F. Dunn. 1965. *Gnathostoma malaysiae* sp. n. from rats on Tioman Island, Malaysia (Nematoda:Gnathostomidae). *Journal of Parasitology* **51** (3): 382-384.
- Morakote, N., W.** Thammasonthi, W. Maleewong & C. Khamboonruang. 1985. Short term maintenance of *Gnathostoma* larvae *in vitro* without losing infectivity. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* **16** (1): 124-125.
- Morand, S.** 1996. Life-history traits in parasitic nematodes: A comparative approach for the search of invariants. *Functional Ecology* **10** (2):210-218.
- Mosqueda-Cabrera, M. A.** 2003. *Caracterización y diferenciación sistemática de especies mexicanas del género Gnathostoma (Nematoda: Spirurida: Gnathostomatoidea) parásitas de mamíferos carnívoros de la parte baja de la Cuenca del Río Papaloapan, Oaxaca-Veracruz*. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM, 91 pp.
- Mosqueda-Cabrera, M. A., E.** Sánchez Miranda, L. Calderón & H. E. Ortiz Nájera. 2009. Finding advanced third-stage larvae of *Gnathostoma turgidum* Stossich, 1902 in Mexico from natural and experimental host and contributions to the life cycle description. *Parasitology Research* **104**: 1219-1225.
- Mosqueda-Cabrera, M. A., R. J.** Almeyda-Artigas, E. Sánchez-Miranda, L. Carranza-Calderón, E. Sánchez-Núñez. 2010. Description and development of the early third-stage larva of *Gnathostoma turgidum* Stossich, 1902 (Nematoda: Gnathostomatidae) and contributions to its life cycle. *Parasitology Research* **106**: 1321-1326.
- Mulcahy, G., S.** O'Neill, J. Fanning, E. McCarthy & M. Sekiya. 2005. Tissue migration by parasitic helminths —an immunoevasive strategy? *Trends in Parasitology* **21** (6):273-277.
- Nawada, R., R.** Amitani, E. Tanaka, A. Niimi, K. Sizuki, T. Murayama & F. Kuze. 1996. Murine model of invasive pulmonary aspergillosis following an earlier stage, noninvasive *Aspergillus* infection. *Journal of Clinical Microbiology* **34** (6): 1433-1439.
- Nishikubo, K.** 1963. Studies on experimental gnathostomiasis with special reference to host-parasite relationship in *Gnathostoma spinigerum*. II. Effect of cortisone on the development of *Gnathostoma spinigerum* in albino rats. *Endemic Diseases Bulletin of Nagasaki University* **5** (1): 43-50.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.** Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN EL 22 DE AGOSTO DE 2001
- Ollague, W., E.** Gómez & M. Briones. 1988a. Infección natural de peces de agua dulce con el tercer estado larvario de *Gnathostoma spinigerum* y su dinámica de transmisión al hombre. Primer reporte en Ecuador y América. *Medicina Cutánea Ibero Latino Americana* **16** (4): 291-294.
- Ollague, W., E.** Gómez & M. Briones. 1988b. Infección experimental de un gato doméstico adulto con el tercer estado larvario de *Gnathostoma spinigerum* procedente de un pez de agua dulce. *Medicina Cutánea Ibero Latino Americana* **16** (4): 295-297.

- Parker, J.** 1961. Effect of cortisone on the resistance of the guinea pig to infection with the rat nematode, *Nippostrongylus brasiliensis*. *Experimental Parasitology* **11**:380-390.
- Peláez, D.** & R. Pérez-Reyes, 1970. Gnathostomiasis humana en América. *Revista Latino-Americana de Microbiología* **12** (2): 83-91.
- Phillips, R. S.** & D. Wakelin. 1976. *Trichuris muris*: Effect of concurrent infections with rodent piroplasms on immune expulsion from mice. *Experimental Parasitology* **39** (1): 95-100.
- Prommas, C.** & S. Daengsvang. 1933. Preliminary report of a study on the life-cycle of *Gnathostoma spinigerum*. *Journal of Parasitology* **19**: 287-292.
- Quiroz, R. H.** 1984. *Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos*. Editorial Limusa, México, D. F., 876 pp.
- Ramos-Remus, C.,** R. E. González-Castañeda, O. González-Pérez, S. Luquin & J. García-Estrada. 2002. Prednisone induces cognitive dysfunction, neuronal degeneration, and reactive gliosis in rats. *Journal of Investigative Medicine* **50** (6): 458-464.
- Read, A. F.** & A. Skorpung. 1995. The evolution of tissue migration by parasitic nematode larvae. *Parasitology* **111** (3): 359-371.
- Rojekittikhun, W.** & S. Pubampen. 1998. Morphological variation and abnormality of cephalic hooklets of *Gnathostoma spinigerum* hepatic stage larvae from laboratory infected mice. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* **29** (1): 118-122.
- Rojekittikhun, W.,** S. Pubampen, A. Pojayon & P. Setasuban. 1989. Infectivity of advanced third-stage larvae of *Gnathostoma spinigerum* in mice. *Journal of Tropical Medicine and Parasitology* **12**: 29-30.
- Sánchez-Miranda, E.** 2001. *Contribuciones a los ciclos de vida natural y experimental de Gnathostoma turgidum Stossich. 1902 (Nematoda: Spirurida) —de tlacuaches mexicanos— y cultivo de su estadio larvario tercero temprano*. Informe final de servicio social para obtener el título de Biólogo, Depto. “El Hombre y su Ambiente”, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México D. F., 61 pp.
- Spain, D. M.,** N. Molomut & A. Haber. 1952. Studies of the cortisone effects on the inflammatory response. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **39** (3): 383-398.
- Sukhdeo, S. C.,** M. V. K. Sukhdeo, M. B. Black & R. C. Vrijenhoek. 1997. The evolution of tissue migration in parasitic nematodes (Nematoda: Strongylida) inferred from a protein-coding mitochondrial gene. *Biological Journal of the Linnean Society* **61**: 281-298.
- Torres, P.,** G. A. Prada & D. Márquez. Resistencia antihelmíntica en los nemátodos gastrointestinales del bovino. *Revista de Medicina Veterinaria* **13**: 59-76.
- Travassos, L. P.** 1925. Contribuições para o conhecimento da fauna helmintológica Brasileira. XVIII. Sobre as especies brasileiras do genero *Gnathostoma* Owen, 1836. *Sciencia Medica* **3** (8): 508-517.
- Vázquez Tsuji, O.,** T. Campos Rivera & A. Rondán Zárate. 2006. Gnatostomiasis humana: abordaje, diagnóstico y tratamiento. *Revista del Centro de Investigación, Universidad La Salle (México)* **7** (25): 65-76.
- VADEMECUM.** 2005. Información de Medicamentos y Principios Activos. www.vademecum.es.
- Wakelin, D.** & G. R. Selby. 1974. The Induction of Immunological Tolerance to the Parasitic Nematode *Trichuris muris* in Cortisone-Treated Mice. *Immunology* **26**: 1-10.
- Whitmire, C. E.** 1957. Effects of cortisone on experimental murine typhus. I Susceptibility of the Syrian hamster to murine typhus and the effect of cortisone. *Journal of Bacteriology* **74**: 417-424.
- Willis, H. H.** 1921. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. *Medical Journal of Australia* **8**: 375-376.

Wilson, D. E. & D. M. Reeder. 2005. *Mammal species of the world. A taxonomic and geographic reference*. 3rd ed. Vols. 1 & 2, John Hopkins University Press, Maryland, USA, 2142 pp.

Zwadlo-Klarwasser, G. & W. Schmutzler. 1998. The effects of the glucocorticoids prednisolone, deflazacort and beclomethasone-dipropionate on the RM 3/1 macrophage in human peripheral blood. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology* **11**: 227-231.

APÉNDICES

1

SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACION
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD, INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA
DIRECCIÓN GENERAL DE SALUD ANIMAL
DIRECCIÓN DE IMPORTACION, EXPORTACION, SERVICIOS Y CERTIFICACION PECUARIA



SECRETARÍA DE AGRICULTURA,
GANADERÍA, DESARROLLO RURAL,
PESCA Y ALIMENTACIÓN

SAGARPA

Oficio BOO.02.03.02.01.281/07

México, D.F. a 14 de febrero de 2007

DICTAMEN DE FUNCIONAMIENTO EN CUMPLIMIENTO CON LAS NORMAS OFICIALES MEXICANAS
APLICABLES A LOS BIOTERIOS

CON BASE EN LA VISITA DE VERIFICACION EFECTUADA Y CON FUNDAMENTO EN LOS ARRTRICULOS 1°, 3°, 18 Y 19 DE LA LEY FEDERAL DE SANIDAD ANIMAL SE EMITE EL PRESENTE DICTAMEN PARA LA EMPRESA:

NOMBRE: Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.
ACTIVIDAD: Mixto
MVZ RESPONSABLE: Yvonne Michelle Heuze de Icaza
REPRESENTANTE LEGAL: Rosa María Najera Najera
DOMICILIO: Calzada del Hueso No. 1100, Col. Villa Quietud
MUNICIPIO O DELEGACION: Coyoacán
LOCALIDAD: México, D.F. C.P. 04960
Tel. 54-83-70-73 FAX: 55-94-63-15

TODA VEZ QUE CUMPLE CON LO ESTABLECIDO EN LA NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-062-ZOO-1999 "ESPECIFICACIONES TÉCNICAS PARA LA PRODUCCIÓN, CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE LABORATORIO" Y DE NO HACERLO SE HARÁ ACREEDOR A LAS SANCIONES A QUE SE REFIERE EL ARTICULO 54 DE LA LEY FEDERAL DE SANIDAD ANIMAL.
EL PROPIETARIO O EL ADMINISTRADOR DE LA EMPRESA SERA EL RESPONSABLE DEL CUMPLIMIENTO DE LA CITADA NORMATIVIDAD Y ESTARA OBLIGADO A PROPORCIONAR LAS FACILIDADES NECESARIAS AL PERSONAL DE ESTA SECRETARIA PARA SU VERIFICACION.



ATENTAMENTE
EL DIRECTOR DE IMPORTACION, EXPORTACION,
SERVICIOS Y CERTIFICACION PECUARIA.

Octavio Carranza

MVZ OCTAVIO CARRANZA DE MENDOZA

DIRECCION DE IMPORTACION, EXPORTACION,
SERVICIOS Y CERTIFICACION PECUARIA

- c.c.p. MVZ José Angel del Valle Molina, Director General de Salud Animal.
- Ing. José Emilio Cabral, Subdelegado Agropecuario de la SAGARPA en el Distrito Federal.
- MVZ Elvira Guevara Revilla, Subdirectora de Aprobación y Certificación.
- MVZ Gabriela Bermúdez Luna, Jefe del Departamento de Unidades de Verificación.
- Vol. DIESCP.2933, 3477
- OCM*EGP*Gbl*em

C:/FTO-DICTAMEN-FUN.DOC

Av. Municipio Libre 377, Piso 7 ala A Col. Santa Cruz Atoyac, Del. Benito Juárez

FROM	Charles River Kingston RTE 209 Kingston, NY 12484	FROM
SHIP TO	UNIV AUTONOMA METROPOLITANA PROL CANAL DE MIRAMONTES 3855 COL EXHACIENDA SAN JUAN DIBS CP 14387 DF MEXICO	SHIP TO
USDA Number 14-R-013	Area: K72	
P.O.#: NO PD	Ship Date: 10/06/08	
CONTROL NO. 1566432	CONTENTS	
	50 BALB/C	BALB/CANNCRL
		NICE
		HALE

	Pos/Tested 18 Mo Sun		Pos/Tested 18 Mo Sun
SEROLOGY		MICROBIOLOGY	
SEND (ad)	0/0152	B. bronchiseptica (be)	0/0048
PUM (ad)	0/0152	C. rodentium (ae)	0/0048
MNU (ad)	0/0152	C. kutscheri (ae)	0/0048
MUN (ad)	0/0152	M. pulmonis (ae)	0/0048
MNV (ad)	0/0152	Salmonella spp. (ae)	0/0048
THEV(GDVII) (ad)	0/0152	S. moniliformis (af)	0/0008
REU (ad)	0/0152	H. hepaticus (ae)	0/0048
EDIM (ad)	0/0144	H. bilis (be)	0/0048
MPUL (ad)	0/0152	Helicobacter spp. (be)	0/0048
MAV (ae)	0/0056	K. pneumoniae (ae)	0/0048
POLY (ae)	0/0056	K. oxytoca (ae)	0/0048
K (ae)	0/0056	P. multocida (ae)	0/0048
MCMV (ae)	0/0056	P. pneumotropica (ae)	0/0048
MTLV (ae)	0/0056	P. aeruginosa (ae)	0/0048
LCHV (ae)	0/0056	Staph. aureus (ae)	18/0048
HANT (ae)	0/0056	S. pneumoniae (be)	0/0048
ECTEB (ae)	0/0056	Beta Strep. Grp B (ae)	0/0048
ECUM (ae)	0/0056	Beta Strep. Grp G (ae)	0/0048
CARG (ae)	0/0056	Beta Strep. spp. (ae)	0/0048
LDV (af)	0/0016	Tyzzar's Disease (ag)	0/0092
MNV (ad)	0/0048		
PATHOLOGY		PARASITOLOGY	
Gross Exam (eh)	0/0092	Ectoparasites (ae)	0/0048
		Helminths (ae)	0/0048
		Giardia sp. (be)	0/0044
		Spirochela sp. (be)	0/0044
		Other Protozoa (ae)	0/0044

Test Dates: SEROLOGY 9/23/08 MICROBIOLOGY 8/12/08
 PATHOLOGY 8/12/08 PARASITOLOGY 8/12/08

**** GENETIC MONITORING SECTION ****

Microsatellite Reference Profile for: BALB/C NICE

Chrono :	2	4	5	13	17	19
Locus :	MIT395	MIT254	MIT161	MIT95	MIT231	MIT91
Allele :	134	117	128	290	148	140

REMARKS:

These strains are not available commercially: BALB/CANNC and CENHEMIVU-

COLONY POLICY FOR POSITIVE RESULT: a = immediate termination; b = planned future recycle of the colony; c = no action.

TESTING SCHEDULE: d = screened every four weeks; e = screened quarterly; f = screened annually; g = screened quarterly by clinical exam; h = results do not include incidental or strain related findings; significant findings would result in immediate termination of the colony.

Data shown are representative of the colony; please contact Technical Assistance at 1-800-338-9680 for more information on any positive findings appearing in this report as well as assistance in interpreting them.

3

Euzet y Combes (1980) propusieron el concepto de “filtros” para simbolizar los mecanismos responsables de la formación del rango de hospederos. Por su parte, Combes (2001) los definió de la siguiente manera: un “filtro de encuentro” excluye todas las especies vivas donde el parásito no puede encontrarse por razones ecológicas o etológicas, mientras que un “filtro de compatibilidad” elimina las especies que no permiten la coexistencia con el parásito, por razones morfoanatómicas, metabólicas o inmunológicas. Los “filtros de encuentro” intervienen cada vez que un parásito cambia de hospedero, dependiendo del tipo del ciclo de vida y de los modos de transmisión. Los “filtros de compatibilidad” determinan el rango de hospederos usados por el parásito.

4

Digestión artificial

6 gr de Pepsina (1:10,000)

6 ml de HCl

1 L de Agua destilada

Estufa de Cultivo (1-4 horas a 37-40°C)

5

Método de concentración por flotación de Willis

Consiste en preparar el material fecal con solución saturada de NaCl. Los huevos de helmintos de peso específico menor que la solución saturada de NaCl tienden a subir y adherirse a una lámina colocada en contacto con la superficie del líquido (p. ej., porta objetos).

Reactivo: solución saturada de NaCl a una densidad de 1.18.

Técnica:

1. Tomar 1 gr aproximadamente de materia fecal.
2. Colocar la muestra en un recipiente adecuado de boca ancha y mezclar homogéneamente (eliminando elementos groseros) con la solución saturada de NaCl con la ayuda de un abatelenguas.
3. Tratar de llenar completamente el recipiente con la solución.
4. Cubrir con un porta objetos limpio, de manera que el líquido haga contacto con la lámina. Si es necesario, coloque más solución con ayuda de una piceta.
5. Esperar 20-25 minutos.
6. En ese lapso, los huevos de helmintos, cuyo peso específico es menor al de la solución, flotarán y quedarán adheridos a la cara del porta objetos en contacto con la mezcla.
7. Retirar el porta objetos e invertirlo rápidamente para evitar pérdida de material y cubrir con un cubre objetos.
8. Examinar al microscopio inmediatamente.

6

Solución de Locke

9.00 gr de NaCl
0.40 gr de KCl
0.20 gr CaCl₂
0.20 gr de NaHCO₃
1 L de Agua destilada

7

Agua de cultivo

Agua libre de cloro, mantenida días antes de su uso a 28°C, suministrándole oxígeno vía una piedra difusora conectada a través de una manguera a una bomba de aire “Elite” (modelo 802) para acuario.

8

Técnica a contraluz

Se monta un trozo de músculo entre dos placas de vidrio transparente y, ejerciendo ligera presión, se examina frente a una fuente luminosa (p. ej., un foco de 100 vatios).

9

Lactofenol de Amann

16.5 ml de Ácido láctico
20.0 gr de Fenol en cristales
32.0 ml de Glicerina neutra
20.0 ml de Agua destilada