



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIODIVERSIDAD
Y CONSERVACIÓN**

TESIS

**“Análisis taxonómico y molecular de la nematofauna parásita
del género *Incilius* (Anura:Bufonidae) de algunas localidades del
Estado de Hidalgo“**

Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias en Biodiversidad y Conservación

PRESENTA:

Biol. Marisol Magdalena Moreno Chávez

Director de Tesis: Dr. Jorge Falcón Ordaz

Codirectora: Dra. Norma Leticia Manríquez Morán

Mineral de la Reforma, Hgo., México

Agosto, 2024.



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

School of Engineering and Basic Sciences

Área Académica de Biología

Department of Biology

Mineral de la Reforma, Hgo., a 12 de agosto de 2024

Número de control: ICBI-AAB/523/2024

Asunto: Autorización de impresión.

MTRA.OJUKY DEL ROCIO ISLAS MALDONADO DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH

El Comité Tutorial del nombre del producto que indique el documento curricular del programa educativo de posgrado titulado **“Análisis taxonómico y molecular de la nematofauna parásita del género *Incilius* (Anura: Bufonidae) de algunas localidades del Estado de Hidalgo”**, realizado por la sustentante **Marisol Magdalena Moreno Chávez** con número de cuenta **472540** perteneciente al programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN**, una vez que ha revisado, analizado y evaluado el documento recepcional de acuerdo a lo estipulado en el Artículo 110 del Reglamento de Estudios de Posgrado, tiene a bien extender la presente:

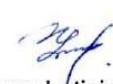
AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Por lo que el sustentante deberá cumplir los requisitos del Reglamento de Estudios de Posgrado y con lo establecido en el proceso de grado vigente.

Atentamente
“Amor, Orden y Progreso”

El Comité Tutorial


Dr. Jorge Falcón Ordaz
Vocal


Dra. Norma Leticia Manríquez Morán
Presidente


Dr. Pablo Octavio Aguilar
Secretario


M. en C. Luis García Prieto
Suplente



LFRP/CIAF

Ciudad del Conocimiento, Carretera Pachuca-Tulancingo Km. 4.5 Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México. C.P. 42184
Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 40063, 40064 y 40065
aab_icbi@uaeh.edu.mx, maritzal@uaeh.edu.mx



uaeh.edu.mx

“ La ciencia es un regalo que debemos tomar en
nuestras manos y utilizarla para el bien”

-Marie Curie

“ En algún lugar, algo increíble está esperando
a ser descubierto” - Carl Sagan

DEDICATORIA

A mi familia

A mi madre **Teresa Chávez** por ser el motor de mi vida. Con tu amor, paciencia y esfuerzo me has permitido llegar a cumplir este sueño. Gracias por no dejarme caer, por ser un ejemplo de resiliencia, por eso y más. Te amo.

A mi padre **Víctor Moreno** por ser mi ángel guardián. Desde arriba se que estas muy orgulloso. Gracias por tus sacrificio, esfuerzos y buenos momentos. Te amo por siempre.

A mis hermanos **Silvia, Cristina, Víctor** y **Ana** por su cariño y apoyo incondicional. Cada uno de ustedes es una pieza fundamental en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias en Biodiversidad y Conservación por brindarme la oportunidad de desarrollar el presente proyecto de investigación dentro de su programa de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por la beca con número 814785 otorgada para la realización de esta tesis.

Al **Dr. Jorge Falcón Ordaz**, por aceptarme como su alumna, brindarme su confianza, compartir sus conocimientos, consejos, revisiones y apoyarme en la culminación de este proyecto. Gracias por alentar y ser mi guía en el maravilloso camino de la taxonomía de nematodos.

A la **Dra. Norma Manríquez Morán** por ser parte de este proyecto, por su tiempo brindado a la hora de realizar el trabajo de laboratorio y correcciones, por sus enseñanzas, consejos y sobre todo por tener una infinita paciencia.

Al **Dr. Pablo Octavio Aguilar** por ser parte de este proyecto, su enseñanza y apoyo en resolver dudas al momento de realizar los análisis.

Al **M. en C. Luis García Prieto** por ser parte de este proyecto, por las sugerencias aportadas, la literatura compartida, por el préstamo de material depositado en la Colección Nacional de Helmintos, UNAM y por su tiempo en la revisión del escrito.

A la **M. en C. Berenit Mendoza Garfías** por el apoyo en la toma de las fotografías de microscopía electrónica de barrido.

A mi mejor amigo **Fernando** por brindarme su amistad y amor incondicional, por ser mi compañero de aventuras, las noches de consejos y todas aquellas veces que limpiaste mis lágrimas, diciendo que confiaban en mí y que lo lograría, te amo. P.D no dejes de enviarme canciones de Taylor, diciendo que esa describe lo que estamos pasando.

Al **Dr. Aguillón** y **Alexis** por compartir su conocimiento, sus consejos y sobre todo por su valiosa amistad.

A mis amigos, compañeros de posgrado y familia hidalguense: **Jesús, Cynthia, Yesua & Yoa**. Es difícil expresarles lo importante y todo lo que significan en mi vida, les agradezco todos esos momentos, experiencias y pláticas compartidas. Ustedes me abrieron las puertas de sus casas, me dieron de comer, soportaron mis inseguridades y bajones emocionales, compartieron su conocimiento, consejos, cariño y más, muchísimas gracias.

RESUMEN

Se han registrado de 1.5–2 millones de especies en el mundo y las estimaciones sobre la riqueza total se calculan en 8 millones. México ocupa el quinto lugar en diversidad de anfibios con 428 especies. En el estado de Hidalgo se han registrado 54 entre los que se encuentra el género *Incilius*. Los estudios de la nematofauna parásita de anfibios en el estado son escasos y no de una manera continua teniendo registros intermitentes. El objetivo de este trabajo fue conocer la nematofauna que se encuentra parasitando los anuros del género *Incilius* recolectados en tres municipios del estado de Hidalgo ampliando el conocimiento de los nematodos en México. Veinte ejemplares de *Incilius* sp. fueron recolectados durante los años 2015 y 2016, los organismos recuperados de los anfibios se revisaron e identificaron morfológicamente, obteniéndose también los parámetros de prevalencia, abundancia e intensidad de la infección. Con las medidas obtenidas de la revisión de los diferentes organismos se realizó un análisis multivariado aplicando pruebas de PERMANOVA de una vía y un análisis de coordenadas principales. Por otro lado, algunos de los nematodos obtenidos se sometieron a un análisis filogenético usando métodos de inferencia bayesiana y máxima verosimilitud. Como resultado se identificaron 10 taxones: ocho de ellos de la familia Cosmocercidae (dos del género *Aplectana* sp., un *Cosmocercoides* sp. y cinco Cosmocercidae gen. sp.), un *Rhabdias* sp. y un *Ochoterenella* sp. La especie que presentó la prevalencia, abundancia e intensidad de la infección más alta fue Cosmocercidae gen sp. 1, estableciéndose como el taxón más representativo, por lo contrario, los valores más bajos los obtuvo *Rhabdias* sp. Las pruebas de PERMANOVA arrojaron que las características morfológicas de longitud del esófago (LE), dirección de útero (DU), forma de la cola (FC), tipo de ala (TA), ubicación de la vulva (UV) y papilas en la vulva (PV) son significativas en las hembras de Cosmocercidae y el PcoA mostró la presencia de seis grupos formados por siete taxones. La reconstrucción filogenética basada en datos de las secuencias 18s + 28s mostró la posición de *Aplectana* sp. 2 y Cosmocercidae gen sp. 1 con respecto a otras especies de la familia Cosmocercidae. La divergencia genética entre las especies de Cosmocercidae entre las especies africanas, europeas, orientales y las de este estudio estuvo en porcentajes entre 11.85 y 24.01%.

Palabras claves: Anfibios; Parasitismo; Taxonomía integrativa; Multivariados.

ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Generalidades de los nematodos	2
1.2 Diversidad	3
1.3 Clasificación del phylum Nematoda	4
1.4 Generalidades de los hospederos (Amphibia)	5
1.4.1 Anfibios anuros del género <i>Incilius</i> en el estado de Hidalgo	6
II. ANTECEDENTES	9
2.1 Registro de nematodos parásitos del género <i>Incilius</i> en América	9
2.2 Estudios morfométricos aplicando multivariados en especies de <i>Cosmocercidae</i> que parasitan anuros	12
2.3 Estudios filogenéticos	13
III. OBJETIVOS	17
IV. JUSTIFICACIÓN	18
V. ÁREA DE ESTUDIO	19
VI. MÉTODOS	20
6.1 Material biológico y sitios de muestreo	20
6.2 Revisión de los hospederos	20
6.3 Análisis morfológico	21
6.4 Caracterización de la infección	22
6.5 Análisis morfométrico	23
6.5.1 Matriz	23
6.5.2 Análisis multivariado	24
6.6 Análisis molecular	25
6.6.1 Extracción de DNA	25
6.6.2 Amplificación y purificación del DNA	25
6.6.3 Secuenciación	26
6.6.4 Edición y alineamiento de secuencias	26
6.6.5 Distancias genéticas y generación de árboles filogenéticos	26
VII. RESULTADOS	27
7.1 Caracterizaciones morfológicas y comentarios taxonómicos	28

7.2	Caracterización de la infección	70
7.3	Análisis multivariado	72
7.4	Estudio molecular.....	74
7.4.1	Reconstrucción filogenética y distancias genéticas.....	74
VIII.	DISCUSIÓN.....	77
8.1	Nematofauna que parasitan al género <i>Incilius</i> en Hidalgo y sus parámetros ecológicos....	77
8.2	Variación entre las hembras de la familia Cosmocercidae.....	79
8.3	Análisis filogenético y distancia genética.....	81
IX.	CONCLUSIONES	85
X.	LITERATURA CITADA.....	86
XI.	ANEXOS	100

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Filogenia del phylum Nematoda obtenida con el método de máxima verosimilitud (Tomado de Smythe <i>et al.</i> , 2019).....	5
Figura 2. <i>Incilius marmoreus</i> (Tomada de CONABIO).....	7
Figura 3. <i>Incilius nebulifer</i> (Tomada de CONABIO).....	7
Figura 4. <i>Incilius occidentalis</i> (Tomada de CONABIO).....	8
Figura 5. <i>Incilius valliceps</i> (Tomada de CONABIO).....	8
Figura 6. Árbol filogenético de algunos representantes de la superfamilia Cosmocercioidea, donde la familia Cosmocercidae se ubica en el clado I (Tomado de Chen <i>et al.</i> 2021)	14
Figura 7. Árbol filogenético de la subfamilia Cosmocercinae (basado en 28S+ITS tomado de Harnoster <i>et al.</i> , 2022).....	14
Figura 8. Municipios de Eloxochitlán (rojo), Huehuetla (verde) y Metztitlán (azul) (tomada y modificada de Wikipedia).....	19
Figura 9. Ejemplar hembra de la familia Cosmocercidae que muestra los atributos: longitud total (LT), ancho del cuerpo (AM), longitud del esófago (LE), poro excretor a región anterior (PE-RA), anillo nervioso a región anterior (AN-RA), largo del bulbo (LB), ancho del bulbo (AB), longitud del huevo (LH), ancho del huevo (AH), dirección de las ramas uterinas (DU), forma de la cola (FC), tipo de ala (TA), papilas en la vulva (PV) y ubicación de la vulva (UV) usados para el análisis morfométrico (Ilustraciones tomadas y editadas de Falcón-Ordaz <i>et al.</i> , 2007).....	24
Figura 10. Micrografía de microscopio electrónico de barrido de un ejemplar hembra de <i>Aplectana</i> n.sp. 1, parásita de <i>Incilius valliceps</i> , de Metztitlán, Hidalgo, ejemplar completo.....	29
Figura 11. Micrografía de microscopio electrónico de barrido de ejemplares macho de <i>Aplectana</i> n.sp. 1, parásita de <i>Incilius valliceps</i> , de Metztitlán, Hidalgo, A) Región cefálica (A=anfidios, PC=papilas cefálicas, PS=papilas somáticas) Macho: B) Hilera de cerdas cuticulares en forma de brocha C) y D) Región caudal, mostrando las papilas genitales.	30
Figura 12. Ejemplar hembra de <i>Aplectana</i> n.sp. 1 A) Corte en la región media que evidencia la forma simple del ala lateral B) Huevo embrionado.....	30
Figura 13. Micrografía de microscopio electrónico de barrido de un ejemplar hembra de <i>Aplectana</i> n.sp. 1 de la región de la vulva con la presencia de un par de papilas.....	31
Figura 14. Micrografía de microscopio electrónico de barrido de un ejemplar hembra de <i>Aplectana</i> n.sp. 2, parásita de <i>Incilius valliceps</i> , ejemplar completo.....	33
Figura 15. Micrografía de microscopio electrónico de barrido de un ejemplar <i>Aplectana</i> n.sp. 2, donde se puede observar el poro excretor y tres labios en la región cefálica.....	33

Figura 16. Micrografía de microscopio electrónico de barrido de la región caudal de uno de los ejemplares machos de *Aplectana* n.sp. 2 A) Disposición del patrón papilar precloacal B) Disposición papilar anal, adanal y postcloacal..... 34

Figura 17. Fotografía de microscopio de luz A) Corte en la región media de uno de los ejemplares hembra de *Aplectana* n.sp. 2 donde se visualiza la presencia de ala lateral de forma tricúspide B) Huevo en forma elíptica no embrionado 34

Figura 18. Macho de *Cosmocercoides* sp. A) Vista completa B) Papila rosetada C) Región caudal mostrando la apertura anal y una espícula..... 46

Figura 19. Micrografía de microscopio electrónico de barrido de un ejemplar hembra de *Cosmocercidae* gen sp. 1 53

Figura 20. Micrografía de microscopio electrónico de barrido de la región cefálica de *Cosmocercidae* gen sp. 1 prevista con tres labios y la región caudal A) Región cefálica (A=anfidios, PC=papilas cefálicas, PS=papilas somáticas) B) Vista lateral del esófago retraído y poro excretor C) Vulva D) Cola en forma de filamento 53

Figura 21. Corte en la región media de uno de los ejemplares hembra de *Cosmocercidae* gen sp. 1 donde se visualiza la presencia de ala lateral de forma simple..... 55

Figura 22. Hembra de *Cosmocercidae* gen sp. 2 A) Abertura de la vulva se encuentra a la mitad de los ejemplares o un poco más abajo B) Corte en la región media donde se visualiza la presencia de ala lateral de forma simple 56

Figura 23. Hembra de *Cosmocercidae* gen sp. 3 A) Corte en la región media donde se visualiza la presencia de ala lateral de forma simple.57

Figura 24. Hembra de *Cosmocercidae* gen sp. 4 A) Corte en la región media donde se observa la presencia de ala lateral de forma simple..... 58

Figura 25. Hembra de *Cosmocercidae* gen sp. 5 A) Corte en la región media donde se observa la presencia de ala lateral, dorsal y ventral de forma simple.....59

Figura 26. Ejemplar hembra de *Rhabdias* sp.....63

Figura 27. Vista lateral de una de las hembras de *Ochoterenella* sp..... 66

Figura 28. Papilas céfalicas presentes en una hembra de *Ochoterenella* sp.....66

Figura 29. Región caudal de uno de los macho de *Ochoterenella* sp. donde se observa protuberancias pequeñas e irregulares, además de su disposición papilar 67

Figura 30. Análisis de Coordenadas principales a partir de distancia Gower considerando los atributos: longitud del esófago, dirección de las ramas uterinas, forma de la cola, tipo de ala, papilas en la vulva y ubicación de la vulva73

Figura 31. Árbol filogenético de especies de la familia Cosmocercidae parásitos de anfibios y reptiles. En las ramas, se muestran los valores de Probabilidad Posterior/ Bootstrap.....75

ÍNDICE DE CUADRO

Cuadro 1. Registro de los nematodos parásitos del género <i>Incilius</i> en Costa Rica (Burse y Brooks, 2010).....	10
Cuadro 2. Registro de los nematodos parásitos del género <i>Incilius</i> en México	11
Cuadro 3. Registro de trabajos de análisis multivariados en helmintos	12
Cuadro 4. Datos genéticos de algunos Cosmocercidos con los genes 18s, 28s, ITS y COI	15
Cuadro 5. Hospederos utilizados en el estudio y los sitios donde fueron recolectados	21
Cuadro 6. Registro nematofauna parásita del género <i>Incilius</i> en algunas localidades del estado de Hidalgo	27
Cuadro 7. Cuadro comparativo de las 66 especies que integran el género <i>Aplectana</i>	36
Cuadro 8. Cuadro comparativo de las 29 especies que integran el género <i>Cosmocercoides</i>	47
Cuadro 9. Cuadro comparativo de los caracteres morfológicos de los géneros de Cosmocercidae reportados en anuros de México	61
Cuadro 10. Caracteres morfológicos de los ejemplares hembra de la familia Cosmocercidae que parasitan el género <i>Incilius</i> en tres localidades del estado de Hidalgo.....	62
Cuadro 11. Cuadro comparativo de las hembras de <i>Ochoterenella</i> spp. que parasitan anuros en México.....	69
Cuadro 12. Cuadro comparativo de los machos de <i>Ochoterenella</i> spp. que parasitan anuros en México.....	69
Cuadro 13. Caracterización de la infección de los nematodos registrados en el género <i>Incilius</i> en tres localidades del estado de Hidalgo.....	71
Cuadro 14. Valores de F y p obtenidos de las pruebas de PERMANOVAS	72
Cuadro 15. Matriz de distancias promedio dentro (diagonal) y entre los grupos (por debajo de la diagonal) obtenidos en el análisis filogenético de la familia Cosmocercidae.....	76

I. INTRODUCCIÓN

La diversidad biológica se refiere a todas las formas de vida que se manifiestan en la Tierra. Esta es el resultado de millones de años de evolución, durante los cuales las diferentes formas de vida se han ido adaptando a las distintas condiciones ambientales del planeta.

Determinar la totalidad de la diversidad existente se ha convertido en un desafío para algunas áreas de la biología, ya que la identificación de las especies es parte fundamental de cualquier estudio ecológico y evolutivo (Bhadury *et al.*, 2006; Derycke *et al.*, 2008). Con el fin de alcanzar ese propósito se han desarrollado iniciativas científicas para describir, identificar y conocer sus relaciones evolutivas (Blaxter *et al.*, 2005).

Actualmente se tiene el registro de 1.5–2 millones de especies en el mundo y las estimaciones sobre la riqueza total se calculan en 8 millones. México es considerado uno de los 17 países con mayor diversidad de especies y de ecosistemas terrestres, costeros y marinos (Martínez-Meyer *et al.*, 2014). Por lo que resulta indispensable registrar y caracterizar el mayor número de especies posibles y conocer la mayor cantidad de información de estas.

Los métodos tradicionales para la delimitación de especies por sí solos son incapaces de lograr describir todos los aspectos de la biodiversidad, debido a la existencia de especies crípticas, especies morfológicamente idénticas que presentan una gran divergencia genética o aquellas que están cercanamente emparentadas, tornando el escenario aún más complejo. Por lo que el uso de análisis moleculares y la obtención de estos datos ha permitido solucionar algunos de estos problemas (Blaxter, 1998; De Ley y Bert, 2002; De Ley *et al.*, 2005).

En los últimos años se ha experimentado un declive en la diversidad sin precedentes, y una parte importante de las especies que se están perdiendo aún no han sido descritas (Lewis, 2006). Por ende, muchas especies corren el riesgo de desaparecer quedándose en el anonimato. En este sentido, los estudios parasitológicos son de gran importancia, no solo porque los parásitos forman parte inherente de la biodiversidad, sino también porque las interacciones que llevan a cabo con sus hospedadores implican dinámicas evolutivas y ecológicas muy complejas (Merino, 2002). Particularmente, la riqueza de especies del phylum Nematoda es una de las más grandes, después de los insectos, aunado a esto el conocimiento de estos está lejos de completarse. El propósito de este trabajo fue establecer el registro de los nematodos que parasitan anfibios anuros del género

Incilius en el estado de Hidalgo, con el fin de ampliar el conocimiento sobre la diversidad helmintológica en México.

1. Generalidades de los nematodos

Los nematodos son organismos blastocoelomados, vermiformes con cuerpos no segmentados y delgados, presentan forma redondeada, cubiertos por una cutícula laminar la cual puede estar estriada u ornamentada. Su tamaño puede variar desde algunos micrómetros hasta algunos metros. Estos gusanos tienen sistema digestivo, nervioso, excretor y reproductor, pero no presentan un sistema circulatorio ni respiratorio. Son gonocóricos, aunque existen algunos hermafroditas, en el caso de aquellos que presentan sexos separados el dimorfismo sexual es marcado, regularmente las hembras son de mayor tamaño, mientras que los machos son pequeños y tienen una forma curvada en la parte posterior (Lamothe-Argumedo y García-Prieto, 1988; Hickman *et al.*, 2009; Mille-Pagaza, 2003; Brusca *et al.*, 2022).

Las hembras usualmente presentan un par de ovarios largos, que gradualmente se convierten en oviductos y posteriormente convergen y se ensanchan para dar paso al útero abriendo en una vagina que se conecta a un gonoporo o vulva localizada en la región ventral del cuerpo (Lamothe-Argumedo y García-Prieto, 1988; Hickman *et al.*, 2009; Brusca *et al.*, 2022).

El sistema reproductivo de los machos consiste en uno o dos testículos tubulares, que se conectan al espermiducto, extendiéndose hasta las vesículas seminales que finalizan en el ducto eyaculador. Los machos de muchas especies poseen una o dos espículas, que son utilizadas para guiar el esperma hacia el gonoporo de la hembra durante la cópula. En la cópula el macho envuelve a la hembra con la región curvada de su cuerpo, inserta la(s) espícula(s) en el gonoporo para dirigir el esperma. La fertilización ocurre en el útero y los huevos fertilizados son depositados en el medio (Lamothe-Argumedo y García-Prieto, 1988; Brusca *et al.*, 2022). Este tipo de organismos pueden ser de vida libre o parásitos, los últimos se presentan en casi todos los grupos de plantas y animales ya sea invertebrados y/o vertebrados parasitando diferentes líquidos corporales y órganos, donde pueden causar algún daño (Hickman *et al.*, 2009).

Los nematodos parásitos poseen una enorme variabilidad de ciclos de vida, algunos simples y directos (monoxenos con un único hospedero definitivo) y otros complejos e indirectos (heteroxeno con uno o varios hospederos intermediarios); en otros casos el hospedero definitivo

también actúa como hospedero intermediario a lo que se conoce como autoheteroxeno. Algunas especies pueden presentar una fase larval de forma libre y otras deben migrar por diferentes órganos en el hospedero definitivo hasta alcanzar su localización final (Anderson, 1988).

Algunos autores consideran que no existen etapas larvales, más bien son solo organismos de menor tamaño, los cuales requieren de una serie de mudas por ecdisis para poder llegar a la forma adulta y otros más consideran la existencia de fases larvales. Se conocen cinco etapas del desarrollo sin incluir el huevo: cuatro estados larvales (L1, L2, L3, L4) y el estadio adulto (Chabaud, 1955).

El primero y segundo estadios larvarios son de vida libre, alimentándose de microorganismos. El segundo estadio larvario muda pero retiene la cutícula que rodea al tercer estadio larval. Este estadio, si bien es libre, no se alimenta y debe sobrevivir de sus reservas lipídicas y es generalmente la fase infectiva, dependiendo de la estrategia del ciclo de vida, puede penetrar la piel perdiendo la cutícula del segundo estadio que la protegía o ser consumido con el alimento (hospedero intermediario o paraténico) por un hospedero definitivo y dentro de este, debe desenquistarse, para lo que se necesita estímulos específicos. En algunas ocasiones el huevo puede quedar latente, en un estadio de resistencia en el ambiente hasta que sea ingerido por un hospedero apropiado para cerrar su ciclo de vida (Drago, 2017).

HUEVO → **L1/J1 + M1** → **L2/J2 + M2** → **L3/J3 + M3** → **L4/J4 + M4** → **ADULTO**

1.2 Diversidad

El filo Nematoda está integrado por 27,000 especies descritas aunque según algunas estimaciones podrían incluir más de 100 mil especies (Brusca *et al.*, 2022). La mayor parte de las descripciones corresponden a organismos parásitos de vertebrados, seguido de organismos de vida libre y algunas especies parásitas de invertebrados (Hugot *et al.*, 2001). En el caso particular de los nematodos parásitos de vertebrados, Carlson *et al.*, (2021) estimaron un total de 28,884 especies, de las cuales, un 30% se encuentran en mamíferos que es el grupo de hospederos mayormente estudiados.

En México, los nematodos constituyen el segundo grupo con mayor riqueza de especies en los vertebrados silvestres con un total de 464 especies registradas (García-Prieto *et al.*, 2014b).

1.3 Clasificación del phylum Nematoda

La clasificación tradicional dentro del phylum Nematoda se divide en dos clases: Aphasmidia (Adenophorea) (ausencia de fasmidios) y Phasmidia (Secernentea) (presencia de fasmidios) (Chitwood y Chitwood, 1950). Dicha división ha sido problemática debido a la falta de caracteres morfológicos fiables; sin embargo, esto se ha superado con el desarrollo de la filogenética molecular. Las relaciones dentro de Nematoda ha sido explorada durante casi 20 años (Blaxter *et al.*, 1998; Kampfer *et al.*, 1998), y los análisis exhaustivos de la de la diversidad del filo convergen ahora en una en una filogenia estable (Meldal *et al.*, 2007; Holterman *et al.*, 2009; Van Megen *et al.*, 2009; Bik *et al.*, 2010).

El análisis filogenético más reciente realizado con DNA ribosomal (18s), propone un arreglo en la clasificación del phylum en dos clases Enoplea y Chromadorida. La primera integrada por dos subclases, conformadas por organismos marinos (Enoplia) y parásitos de animales y plantas (Dorylaimia), mientras que Chromadorida, incluye a la subclase Chromadoria, constituida por parásitos de animales y plantas (Fig. 1) (Smythe *et al.*, 2019).

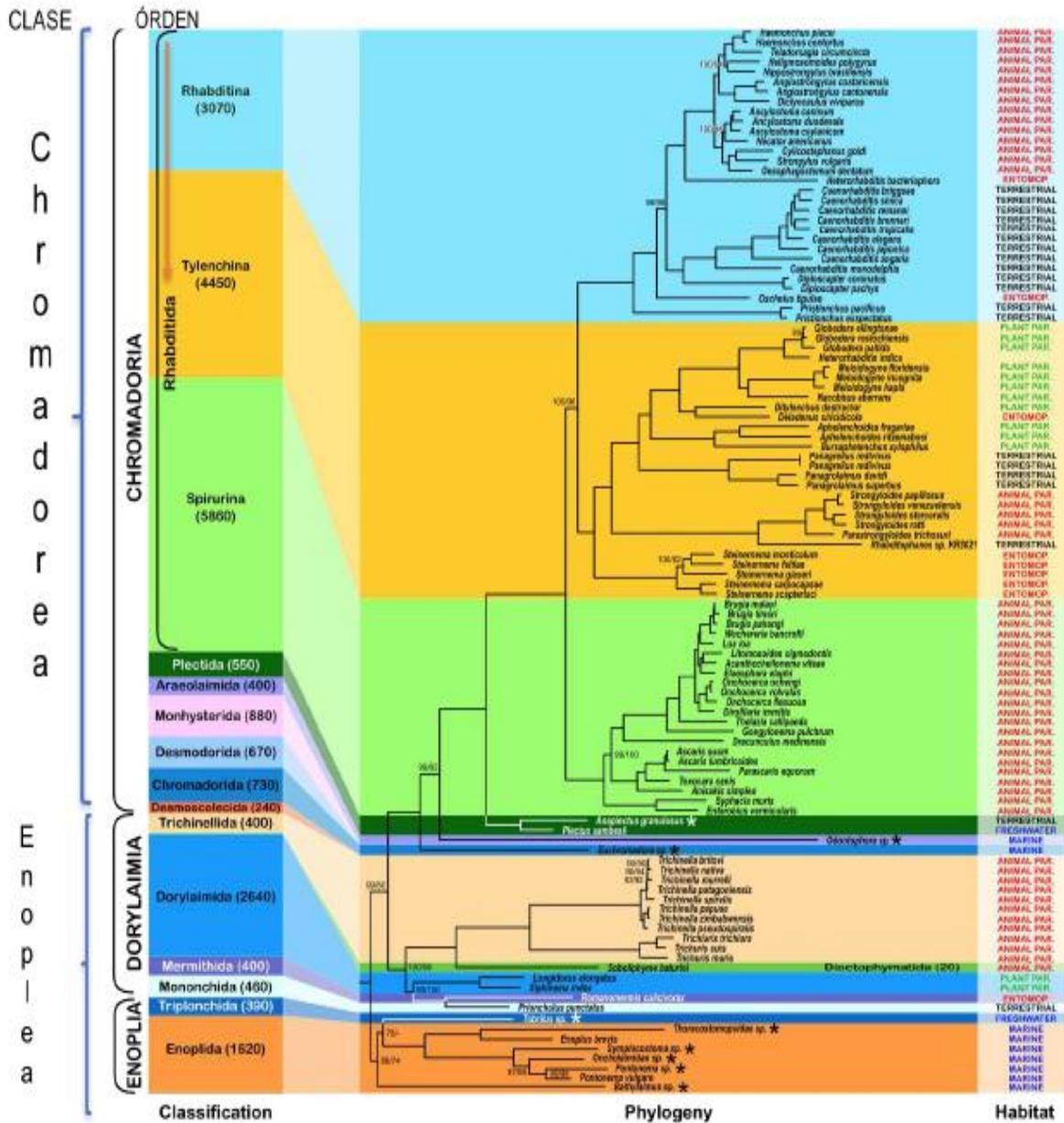


Figura 1. Filogenia del phylum Nematoda obtenida con el método de máxima verosimilitud (Tomado de Smythe *et al.*, 2019).

1.4 Generalidades de los hospederos (Amphibia)

Los anfibios son una clase de vertebrados que se divide en tres órdenes: Anura (ranas y sapos) con 7,691 especies, Urodela o Caudata (salamandras) con 823 y Gymnophiona o Apoda (cecilias) con 222 (Frost, 2024; Hickman *et al.*, 2009). Son tetrápodos, ectotérmicos, anamniotas,

cuyas formas corporales son variadas, su piel es húmeda, desnuda, vascularizada y prevista de multitud de glándulas, con corazón tricameral. Respiración por branquias, pulmones y/o piel, en algunas especies, las branquias externas de las formas larvarias pueden persistir a lo largo de toda la vida (depende del orden). Gonocóricos; con fecundación externa en ranas y sapos (Anura) e interna en salamandras (Caudata) y cecilias (Apoda), la mayoría presenta metamorfosis, huevos mesolecíticos con cubiertas membranosas gelatinosas. (Hickman *et al.*, 2009).

Los anfibios son un buen modelo para el estudio de las interacciones parásito-hospedero ya que ocupan una amplia variedad de hábitats, exhiben diferentes estrategias de historia y ciclos de vida (Aho, 1989; Pérez-Ponce de León *et al.*, 2002). Actualmente, los anfibios están pasando por un declive en sus poblaciones, por lo que los estudios para identificar las posibles causas de ese fenómeno son de suma importancia.

México es el quinto país en riqueza de anfibios, se han registrado 427 especies (Frost, 2024) y en el estado de Hidalgo se presentan de 53 a 54 especies (Lemos-Espinal y Smith, 2015; Ramírez-Bautista *et al.*, 2014), entre las cuales se encuentran cuatro del género *Incilius*.

1.4.1 Anfibios anuros del género *Incilius* en el estado de Hidalgo

El género *Incilius* se encuentra dentro de la familia Bufonidae, ampliamente distribuida en el mundo, habita desde el sur de Norteamérica hasta el noroeste de Sudamérica. Al igual que los géneros *Anaxyrus* y *Rhinella* presentan glándulas parotoides bien desarrolladas en posición dorsolateral a cada lado del cuello detrás de los ojos. Estas son en realidad un tubérculo agrandado, o varios tubérculos fusionados, los cuales albergan numerosas glándulas que secretan un veneno de diferentes grados de toxicidad, otros tubérculos granulares pequeños están esparcidos sobre el cuerpo y las extremidades. Todas las especies son terrestres y se desplazan a través de saltos pequeños (Lemos-Espinal, 2015).

En México se distribuyen 23 especies de *Incilius*, de las cuales, cuatro se distribuyen en el estado de Hidalgo: *I. marmoreus* (Wiegmann, 1833), *I. nebulifer* (Girard, 1854), *I. occidentalis* (Camerano, 1879) e *I. valliceps* (Wiegmann, 1833) (Frost, 2024).

***Incilius marmoratus* (Wiegmann, 1833)**

Es un sapo de tamaño pequeño, varía entre 55 y 75 mm. Presenta crestas craneanas bajas y poco conspicuas; glándula parotoide ovalada o subtriangular, plana, tan larga como ancha. El hocico es corto y truncado; tímpano es distinguible. Las verrugas dorsales son abundantes y granuladas. El dorso es de color marrón, marrón grisáceo o verdoso, con manchas irregulares pálidas y oscuras dispuestas en pares simétricos y paralelas a la línea vertebral (Figura 2) (Lemos-Espinal, 2015).



Figura 2. *Incilius marmoratus* (Tomada de CONABIO).

***Incilius nebulifer* (Girard, 1854)**

Es un sapo relativamente grande, alcanza una longitud hocico-cloaca (LHC) máxima de 125 mm, pero la mayoría de los individuos son de aproximadamente 75 mm. Puede ser identificado fácilmente por la presencia de crestas craneales grandes y filosas; glándula parotoide ovalada o triangular, de orillas rectas lateralmente, ligeramente dos veces más largas que anchas; ausencia de un tubérculo metatarsal interno agrandado y ennegrecido (Figura 3) (Lemos-Espinal, 2015).



Figura 3. *Incilius nebulifer* (Tomada de CONABIO).

***Incilius occidentalis* (Camerano, 1879)**

Es un sapo de tamaño moderado de 75 mm. Presenta una cresta interorbital bien desarrollada, glándulas parotoides en contacto con los párpados, ausencia de tubérculos metatarsales cornificados y ennegrecidos. Su coloración dorsal es amarillo-verdusco hasta marrón oscuro con un patrón reticulado de color oscuro que es menos denso a los largo de la línea vertebral y sobre la cabeza (Figura 4) (Lemos-Espinal, 2015).



Figura 4. *Incilius occidentalis* (Tomada de CONABIO).

***Incilius valliceps* (Wiegmann, 1833)**

Es un sapo talla media 73-100 mm LHC. Su cuerpo es robusto, ligeramente aplanado, con brazos cortos y patas traseras musculosas. Su piel es rugosa y cubierta de tubérculos. Los machos poseen un saco gular con el que cantan para llamar a las hembras (Figura 5) (Lemos-Espinal, 2015).



Figura 5. *Incilius valliceps* (Tomada de CONABIO).

II. ANTECEDENTES

El parasitismo representa la forma de vida más exitosa sobre nuestro planeta (Price, 1980). Los parásitos cumplen funciones importantes en el ambiente natural, ya que son reguladores poblacionales, descomponedores de materia orgánica, brindan información sobre la historia evolutiva e interacciones con sus hospederos, entre otras.

Los estudios en anfibios desde una perspectiva helmintológica son escasos, con menos del 15% de las especies examinadas a nivel nacional (García-Prieto, *et al.*, 2014a,b,c). Pérez-Ponce de León y colaboradores (2002) basándose en el registro de 1,246 helmintos en México, señalaron que 460 especies parasitan anfibios de los cuales el 10% son nematodos, además estimaron que, si se analizara toda la anfibiofauna de México en los siguientes años, podrían ser descritas aproximadamente 827 especies adicionales.

2.1 Registro de nematodos parásitos del género *Incilius* en América

Estudios sobre los nematodos que parasitan al género *Incilius* en el continente americano se han realizado únicamente en Costa Rica y México, en el primero se han reportado 11 especies pertenecientes a 8 familias (4 Cosmocercidae, 1 Ascaridae, 1 Cruzidae, 1 Heterakidae, 1 Molineidae, 1 Onchocercidae, 1 Physalopteridae y 1 Spiroceridae; Cuadro 1). En México, los estudios no han sido continuos en el género, solo existen registros de 19 especies en 7 familias (6 Cosmocercidae, 5 Rhabdiasidae, 4 Molineidae, 1 Kathalaniidae, 1 Onchocercidae, 1 Physalopteridae y 1 Spirocercidae; Cuadro 2).

Cuadro 1. Registro de los nematodos parásitos del género *Incilius* en Costa Rica (Burse y Brooks, 2010).

Especie del género <i>Incilius</i>	Nematodos	Familia	
	<i>Africana telfordi</i>	Heterakidae	
<i>Incilius coccifer</i>	<i>Aplectana incerta</i>	Cosmocercidae	
	<i>Aplectana itzocanensis</i>	Cosmocercidae	
	Ascaridae gen. sp.	Ascaridae	
	<i>Cosmocerca parva</i>	Cosmocercidae	
<i>Incilius conifera</i>	<i>Cosmocercoides variabilis</i>	Cosmocercidae	
	<i>Cosmocerca parva</i>	Cosmocercidae	
	<i>Cosmocercoides variabilis</i>	Cosmocercidae	
<i>Incilius luetkenii</i>	<i>Aplectana incerta</i>	Cosmocercidae	
	<i>Aplectana itzocanensis</i>	Cosmocercidae	
	Ascaridae gen. sp.	Ascaridae	
	<i>Cosmocerca parva</i>	Cosmocercidae	
	<i>Ochoterenella digiticauda</i>	Onchocercidae	
	<i>Oswaldocruzia costaricensis</i>	Molineidae	
	<i>Physaloptera</i> sp.	Physalopteridae	
	<i>Physocephalus</i> sp.	<u>Spirocercidae</u>	
	<i>Incilius valliceps</i>	<i>Aplectana incerta</i>	Cosmocercidae
		<i>Aplectana itzocanensis</i>	Cosmocercidae
<i>Cosmocerca parva</i>		Cosmocercidae	
<i>Cruzia empera</i>		Kathlaniidae	
<i>Ochoterenella digiticauda</i>		Onchocercidae	

Cuadro 2. Registro de los nematodos parásitos del género *Incilius* en México.

Especie del género <i>Incilius</i>	Nematodos	Familia	Estado/país	Referencia
<i>Incilius marmoreus</i>	<i>Aplectana</i> sp.	Cosmocercidae	Oaxaca	Trejo-Meléndez <i>et al.</i> , 2019.
	<i>Aplectana incerta</i>	Cosmocercidae	Jalisco	Galicia-Guerrero <i>et al.</i> , 2000.
	<i>Oswaldocruzia lescurei</i>	Molineidae	Oaxaca	Trejo-Meléndez <i>et al.</i> , 2019.
	<i>Oswaldocruzia</i> sp.	Molineidae	Oaxaca	Trejo-Meléndez <i>et al.</i> , 2019.
	<i>O. subauricularis</i>	Molineidae	Oaxaca	Trejo-Meléndez <i>et al.</i> , 2019.
	<i>Physocephalus</i> sp.	Spirocercidae	Jalisco	Galicia-Guerrero <i>et al.</i> , 2000.
	<i>Rhabdias fuelleborni</i>	Rhabdiasidae	Oaxaca	Trejo-Meléndez <i>et al.</i> , 2019.
	<i>R. pseudosphaerocephala</i>	Rhabdiasidae	Jalisco	Galicia-Guerrero <i>et al.</i> , 2000.
			Oaxaca	Trejo-Meléndez <i>et al.</i> , 2019.
<i>Incilius mazatlanensis</i>	<i>Aplectana itzocanensis</i>	Cosmocercidae	Sonora	Goldberg y Bursey, 2002.
	<i>Oswaldocruzia pipiens</i>	Molineidae	Sonora	Goldberg y Bursey, 2002.
	<i>Physaloptera</i> sp.	Physalopteridae	Sonora	Goldberg y Bursey, 2002.
	<i>Physocephalus</i> sp.	Spirocercidae	Sonora	Goldberg y Bursey, 2002.
	<i>Rhabdias americanus</i>	Rhabdiasidae	Sonora	Goldberg y Bursey, 2002.
<i>Incilius nebulifer</i>	<i>Aplectana itzocanensis</i>	Cosmocercidae	Querétaro	Galicia-Guerrero <i>et al.</i> , 2000.
	<i>Aplectana</i> sp.	Cosmocercidae	Nuevo León	Martínez-Villarreal, 1969.
	<i>Cosmocercoides</i> sp.	Cosmocercidae	Nuevo León	León-Règagnon <i>et al.</i> , 2005.
	<i>Rhabdias fuelleborni</i>	Rhabdiasidae	Querétaro	Galicia-Guerrero <i>et al.</i> , 2000.
<i>Incilius occidentalis</i>	<i>Rhabdias kuzmini</i>	Rhabdiasidae	Guerrero	Martínez-Salazar y León-Règagnon, 2007.
	<i>Aplectana itzocanensis</i>	Cosmocercidae	Yucatán	Espínola-Novelo y Guillén- Hernández, 2008.
	<i>Aplectana</i> sp.	Cosmocercidae	Veracruz Quintana Roo	Galicia-Guerrero <i>et al.</i> , 2000. Terán- Juárez, 2011.
<i>Incilius valliceps</i>	<i>Cosmocerca</i> sp.	Cosmocercidae	Veracruz	Guillén-Hernández, 1992.
	<i>Cruzia morleyi</i>	Kathlaniidae	Quintana Roo	Terán- Juárez, 2011.
	<i>Ochoterenella</i> sp.	Onchocercidae	Veracruz	Galicia-Guerrero <i>et al.</i> , 2000.
	<i>Oswaldocruzia</i> sp.	Molineidae	Veracruz Yucatán	Guillén-Hernández, 1992. Espínola-Novelo y Guillén- Hernández, 2008.
			Quintana Roo	Terán- Juárez, 2011.
	<i>Physocephalus</i> sp.	Spirocercidae	Quintana Roo	Terán- Juárez, 2011.
	<i>Raillietnema lynchi</i>	Cosmocercidae	Quintana Roo	Guillén-Hernández, 1992.
	<i>Rhabdias</i> sp.	Rhabdiasidae	Veracruz	Terán- Juárez, 2011.
	<i>Rhabdias fuelleborni</i>	Rhabdiasidae	Quintana Roo	Terán- Juárez, 2011.
			Quintana Roo	Espínola-Novelo y Guillén- Hernández, 2008.
	<i>Spirocerca</i> sp.	Spirocercidae	Yucatán Quintana Roo	Guillén- Hernández, 2008. Terán- Juárez, 2011.

2.2 Estudios morfométricos aplicando análisis multivariados en especies de Cosmocercidae que parasitan anuros

La mayoría de los estudios morfométricos que se han realizado con nematodos parásitos de vertebrados, se basan en la aplicación de análisis uni y multivariados para determinar variaciones intraespecíficas (en un hospedero o varios), además de usarse como evidencia para la delimitación de especies.

Dentro de la familia Cosmocercidae solo se han realizado análisis multivariados en las especies *Aplectana hamatospicula* y *A. hylambatis*. El estudio realizado *Gastrophryne olivacea* en Oklahoma, Estados Unidos, mostró que los ejemplares de *A. hamatospicula* son más pequeños en esta especie que en otras, sugiriendo variaciones debidas al hospedero (Vhora y Bolek, 2013). Por otra parte, se llevó a cabo un estudio en 401 ejemplares de *A. hylambatis* que se encontraban parasitando cinco hospederos distribuidos en siete localidades de Argentina con el objetivo de determinar las variaciones morfológicas. Con los datos obtenidos, se realizó un análisis de componentes principales y uno de discriminantes y los resultados mostraron que algunos de los caracteres eran variables según el hospedero, sin embargo, esa variación no era significativa (González *et al.*, 2019). Además, existen otros trabajos donde se han utilizado análisis multivariados en helmintos parásitos de anfibios con diferentes propósitos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Registro de trabajos de análisis multivariados en helmintos

Helmintos	Hospedero	País	Tipo de análisis	Referencia
Nematodos	Algunos vertebrados	Brasil	Análisis de discriminantes	Borba <i>et al.</i> , 2021.
Nematodos	Anfibios	Rusia	Comparación de medias	Kirillova <i>et al.</i> , 2021.
Nematodos	Anfibios	Argentina	Componentes principales (PCA) Análisis de discriminantes	González, Gómez y Hamann, 2019.
Nematodos	Anfibios	Estados Unidos	Comparación de medias	Vhora y Bolek, 2013.
Monogéneos	Anfibios	República del Congo	Componentes principales (PCA) Análisis de discriminantes	Tinsley y Jackson, 1998.
Trematodos	Anfibios	Canadá	Correlación lineal	Kennedy, 1980.

2.3 Estudios filogenéticos

Diversos estudios filogenéticos de integrantes de la familia Cosmocercidae, parásitos de anfibios, han sido realizados en el mundo con representantes de África, América, Asia y Europa. En América, los estudios que se han realizado son escasos, incluyendo solo cuatro especies de Sudamérica específicamente de Brasil. Se tiene información de 40 especies caracterizadas genéticamente con los genes ribosomales ITS, 18S y 28S, y el gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad 1 (COI) en la base de datos del GenBank (Cuadro 4). Algunas de estas secuencias han formado parte de filogenias con representantes de distintos órdenes, con el propósito de conocer la posición de nuevas especies, como por ejemplo la de *Cosmocercoides tonkinensis* (Tran *et al.*, 2015).

La filogenia más reciente de la superfamilia Cosmocercoidea se realizó con DNA ribosomal de los genes 18S y 28S, contó con representantes de las tres familias (Atractidae, Cosmocercidae y Kathlaniidae), siendo Cosmocercidae la familia de la que se incluyeron más especies. El análisis corroboró la monofilia de Cosmocercidae y la parafilia de Kathalaniidae (Fig. 6) (Chen *et al.*, 2021). También, Harnoster y colaboradores (2022) elaboraron una reconstrucción filogenética con 10 representantes de la subfamilia Cosmocercinae que parasitan anfibios en África, y Asia, y *Cruzia americana* como grupo externo, con el propósito de conocer la posición filogenética de tres nuevas especies africanas: *Cosmocerca daly*, *C. monicae* y *C. makhadoensis*, basada en los genes 28S e ITS (Fig. 7)

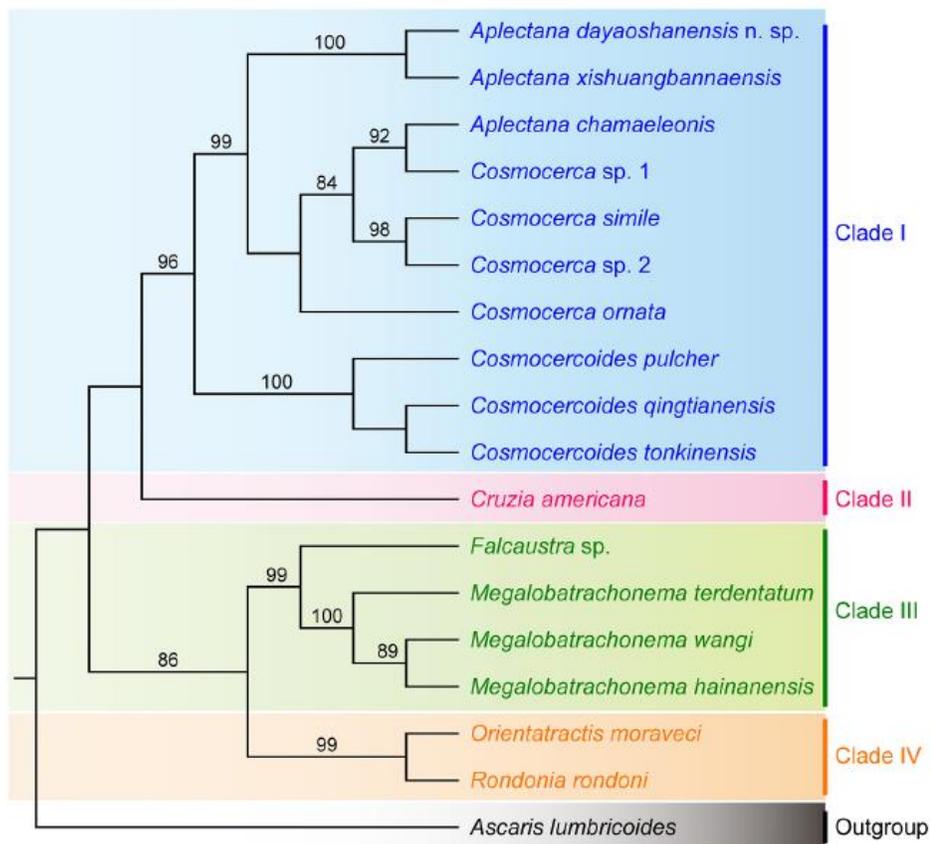


Figura 6. Árbol filogenético de algunos representantes de la superfamilia Cosmocercoidea, el clado I corresponde a la familia Cosmocercoidea (Tomado de Chen *et al.* 2021)

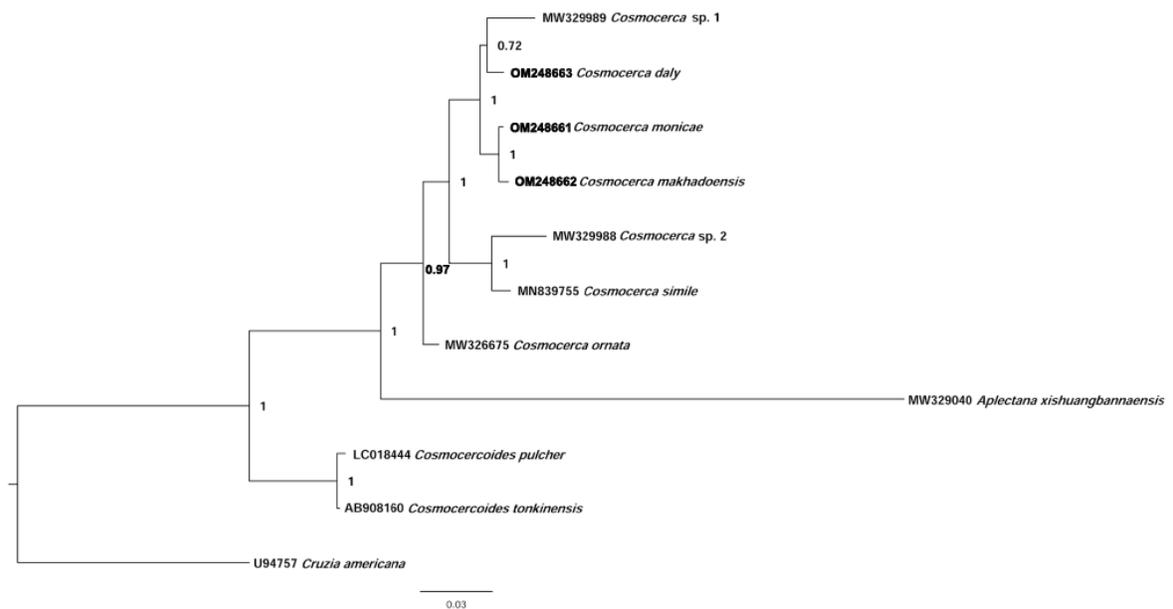


Figura 7. Árbol filogenético de la subfamilia Cosmocercoinae (basado en 28S+ITS tomado de Harnoster *et al.*, 2022).

Cuadro 4. Datos genéticos de algunos Cosmocercidos con los genes 18s, 28s, ITS y COI.

Especies	Hospederos	País	GenBank				Referencia
			18S	ITS	28S	COI	
<i>Aplectana dayaoshanensis</i>	<i>Hylarana spinulosa</i>	China	OK045516	OK045524	OK045530		Chen <i>et al.</i> (2021)
<i>A. chamaeleonis</i>	<i>Hyperolius kivuensis</i>	Alemania	OK045518	OK045527	OK045533		Chen <i>et al.</i> (2021a)
<i>A. xishuangbannaensis</i>	<i>Polypedates megacephalus</i>	China	MW329041		MW329038		Chen <i>et al.</i> (2021b)
<i>Cosmocerca</i> sp. 1	<i>Hoplobatrachus chinensis</i>	China	MW329987	OK489801	MW329989		Chen <i>et al.</i> (2021a)
<i>Cosmocerca</i> sp. 2	<i>Bufo melanostictus</i>	China	MW329990	MT108303	MW329988		Chen <i>et al.</i> (2020a; 2021a)
<i>C. albopunctata</i>	<i>Chiasmocleis albopunctata</i>	Brasil				OP153854	Alcantara <i>et al.</i> (2022)
<i>C. daly</i>	<i>Cacosternum boettgeri</i>	Sudáfrica			OM248663		Harnoster <i>et al.</i> , (2022)
<i>C. japonica</i>	<i>Rhacophorus schlegelii</i>	Japón				LC052757	Sato <i>et al.</i> (2015)
<i>C. makhadoensis</i>	<i>Phrynomantis bifasciatus</i>	Sudáfrica			OM248662		Harnoster <i>et al.</i> , (2022)
<i>C. monicae</i>	<i>Kassina senegalensis</i>	Sudáfrica			OM248661		Harnoster <i>et al.</i> , (2022)

Cuadro 4. Continuación

Especies	Hospederos	País	GenBank				Referencia
			18S	ITS	28S	COI	
<i>C. ornata</i>	<i>Hylarana spinulosa</i>	China	MW326676	MT108302	MW326675		Chen <i>et al.</i> (2021b)
<i>C. parva</i>	<i>Leptodactylus podicipinus</i>	Brasil				OP153857	Alcantara <i>et al.</i> (2022a)
<i>C. podicipinus</i>	<i>Leptodactylus latrans</i>	Brasil				OP153860	Alcantara <i>et al.</i> (2022a)
<i>C. simile</i>	<i>Bufo gargarizans</i>	China	MN839758	MN839761	MN833301		Chen <i>et al.</i> (2020a)
<i>Cosmocercoides qingtianensis</i>	<i>Bufo gargarizans</i>	China	MH178321	MH178311	MW325956	MH178303	Chen <i>et al.</i> (2018a; 2021b)
<i>C. pulcher</i>	<i>Bufo japonicus</i>	Japón	LC018444	MH178314	LC018444	MH178309	Tran <i>et al.</i> (2015)
<i>C. tonkinensis</i>	<i>Acanthosaura lepidogaster</i>	Vietnam	AB908160	AB908160	AB908160		Tran <i>et al.</i> (2015)
<i>C. wuyiensis</i>	<i>Amolops wuyiensis</i>	China		MK110871			Liu <i>et al.</i> (2019)
<i>Nemhelix bakeri</i>	-----	-----	HM627010				No publicado
<i>Raillietnema</i> sp.	-----	-----	DQ503461				Smythe <i>et al.</i> , (2006)

III. OBJETIVOS

Objetivo general

- Establecer el registro de la nematofauna que parasitan anuros del género *Incilius* recolectados en tres municipios del estado de Hidalgo, utilizando análisis morfológicos y moleculares.

Objetivos específicos

- Identificar taxonómicamente los nematodos recolectados de *Incilius* mediante la comparación con descripciones previas.
- Determinar los niveles de infección de los nematodos que parasitan a los *Incilius* recolectados en las diferentes localidades, con base en los parámetros ecológicos de prevalencia, abundancia e intensidad promedio.
- Comparar morfométricamente algunos de los ejemplares de nematodos obtenidos con la ayuda de un análisis estadístico multivariado.
- Realizar un análisis filogenético de algunos ejemplares de nematodos obtenidos, empleando las secuencias parciales de los genes 18s y 28s.
- Calcular las distancias genéticas de algunos nematodos obtenidos, empleando las secuencias parciales de los genes 18s y 28s.

IV. JUSTIFICACIÓN

A pesar de la gran riqueza de especies de anfibios en México (428) (Frost, 2024), el conocimiento sobre su helmintofauna es limitado, con solo 106 especies de helmintos (4 acantocéfalos, 4 monogéneos, 7 cestodos, 42 trematodos y 49 nematodos) reportadas por García-Prieto y colaboradores (2014a,b,c). Para el estado de Hidalgo, solo se tienen tres trabajos relacionados con helmintos parásitos de anfibios, dos en *Lithobates spectabilis* (Hillis y Frost, 1985) y uno en *Ambystoma velasci* (Dugès, 1888) (Pulido-Flores *et al.*, 2009; Alemán-Muñoz *et al.*, 2013; Falcón-Ordaz *et al.*, 2014). El presente trabajo es el primer estudio nematodológico en Hidalgo y uno de los 10 estudios helmintológicos en el género *Incilius* que han sido realizados en el país en los estados de Guerrero, Jalisco, Nuevo León, Oaxaca, Querétaro, Quintana Roo, Sonora, Yucatán y Veracruz (Martínez-Villarreal, 1969; Guillén-Hernández, 1992; Galicia-Guerrero *et al.*, 2000; Goldberg y Bursey, 2002; León-Règagnon *et al.*, 2005; Martínez-Salazar y León-Règagnon, 2007; Espínola-Novelo y Guillén-Hernández, 2008; Terán-Juárez, 2011; Trejo-Meléndez *et al.*, 2019), lo que permitirá cubrir parcialmente el vacío de información sobre este grupo de parásitos. Los nematodos pueden brindar información muy valiosa como indicadores de la calidad ambiental, ya que tienen un papel importante en la historia evolutiva de sus hospederos (Rodríguez-Diego *et al.*, 2009; Rico-Hernández, 2011; Falcón-Ordaz *et al.*, 2012; Monks *et al.*, 2013; Sarasquete *et al.*, 2013). Por último, resulta imprescindible registrar la mayor cantidad de especies de parásitos con el objetivo de comprender los procesos ecológicos y evolutivos en los que se involucran y generar herramientas complementarias con el fin de conservar tanto a los parásitos como a sus hospederos (Pérez-Ponce de León y García-Prieto, 2001).

V. ÁREA DE ESTUDIO

La recolección de los anfibios se llevó a cabo en los municipios de Eloxochitlán, Huehuetla y Metztlán que son tres de los 84 municipios que conforman el estado de Hidalgo. Dichos municipios se encuentran ubicados dentro de la provincia de la Sierra Madre Oriental; dentro de la subprovincia Carso Huasteco (Figura 8).

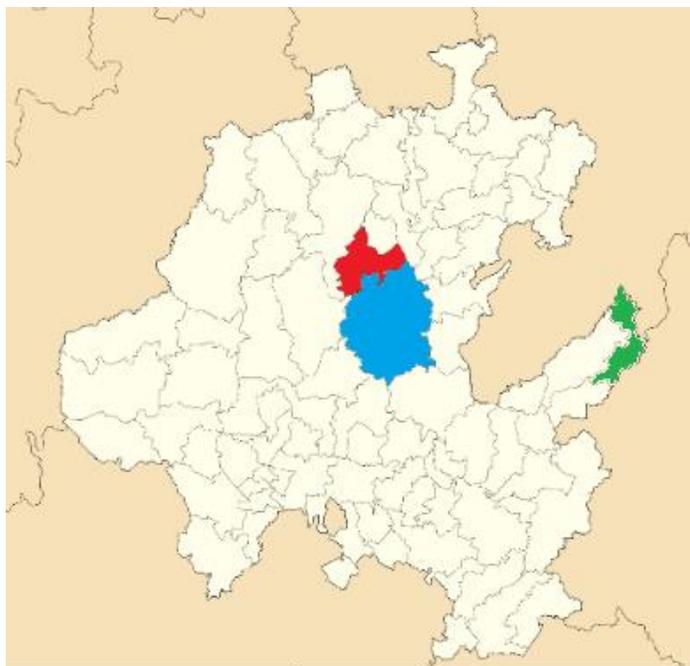


Figura 8. Municipios de Eloxochitlán (rojo), Huehuetla (verde) y Metztlán (azul) (tomada y modificada de Wikipedia).

Clima

El municipio de Eloxochitlán presenta un clima seco semicálido, templado subhúmedo con lluvias en verano. Tiene una temperatura media anual de 17°C y una precipitación pluvial de 1075 milímetros cúbicos por año (INEGI, 2020).

En Huehuetla el clima es semicálido húmedo y templado húmedo con lluvias todo el año. Con temperaturas anuales entre 16-26°C, y una precipitación pluvial de 900-2600 milímetros cúbicos por año (INEGI, 2020).

En Metztitlán el clima es seco semicálido y templado subhúmedo con lluvias en verano. Registra una temperatura anual de 20.2°C, y una precipitación pluvial de 437 milímetros por año (INEGI, 2020).

Hidrología

Los municipios de Eloxochitlán y Metztitlán se encuentran dentro de la región hidrológica del Pánuco; en las cuencas del río Moctezuma; dentro de las subcuencas de río Metztitlán, río Amajac y río Los Hules (CONAGUA, 2015).

En el caso de Huehuetla se encuentra en región hidrológica de Tuxpan–Nautla; en la cuenca del río Tuxpan; dentro de la subcuenca de río Pantepec y río Vinazco (CONAGUA, 2015).

VI. MÉTODOS

6.1 Material biológico y sitios de muestreo

El presente estudio se realizó con material recolectado durante los años 2015 y 2016, en los municipios de Eloxochitlán (San Juan Amajac), Huehuetla (Río Blanco) y Metztitlán (Jilotla, Santa Mónica, Acalome y San Cristóbal) del estado de Hidalgo (Cuadro 5). Los anfibios fueron recolectados de noche, de forma manual y transportados en bolsas de plástico al laboratorio.

6.2 Revisión de los hospederos

Los sapos fueron sacrificados con una sobredosis intraperitoneal de pentobarbital sódico. Para su revisión, a cada organismo se le realizó una incisión en la zona ventral, en la línea media del cuerpo y bajo el microscopio estereoscópico, se examinaron la cavidad corporal, mesenterio, tejido muscular y órganos internos (corazón, estómago, hígado, intestino, pulmones, riñones y vejiga). Los órganos se colocaron en cajas Petri con solución salina al 0.65% y con la ayuda de pinzas de disección se desgarraron para recolectar a los helmintos.

Los nematodos fueron manipulados con pinceles y colocados en ácido acético glacial durante un minuto para su fijación, posteriormente se transfirieron a frascos pequeños de vidrio

con alcohol al 70% para su almacenamiento. Estos organismos fueron utilizados en el estudio morfológico y morfométrico, mientras que los organismos que se utilizaron en el análisis molecular una vez recolectados se colocaron directamente en frascos viales con alcohol absoluto y se refrigeraron.

Cuadro 5. Hospederos utilizados en el estudio y los sitios donde fueron recolectados.

Hospederos	Localidad, Municipio	No. de muestras
<i>Incilius valliceps</i>	Jilotla, Metztitlán	1
<i>Incilius valliceps</i>	San Cristóbal, Metztitlán	2
<i>Incilius occidentalis</i>	Santa Monica, Metztitlán	1
<i>Incilius valliceps</i>	Acalome, Metztitlán	5
<i>Incilius</i> sp.	Metztitlán	1
<i>Incilius valliceps</i>	Juan Amajac, Eloxochitlán	3
<i>Incilius</i> sp.	Río Blanco, Huehuetla	7

6.3 Análisis morfológico

Los ejemplares se aclararon en preparaciones semipermanentes con una mezcla de glicerina con alcohol al 70%. Las preparaciones fueron observadas para obtener los caracteres morfológicos con la ayuda del microscopio óptico. Además, se tomaron fotografías de cada uno de los individuos analizados, a través de una cámara Zeiss Axiocam Erc5s adaptada al microscopio óptico Zeiss AXIO Lab. 01. Las medidas corporales para cada especie fueron obtenidas con un ocular micrométrico.

Las fotografías de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) fueron realizadas en el área de microscopía del Laboratorio de Microscopía y Fotografía de la Biodiversidad perteneciente al Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). La preparación de estos consistió en la deshidratación de los nematodos en una serie de alcoholes graduales (tomando los que se mantienen en alcohol al 70%) hasta llegar a alcohol absoluto, posteriormente las muestras fueron secadas a punto crítico con CO₂ y recubiertas con una mezcla de oro-paladio

para su observación (Falcón-Ordaz *et al.*, 2014).

Para la identificación a nivel específico de los organismos, se utilizaron claves dicotómicas (Chabaud, 1974; Anderson *et al.*, 2009) y literatura especializada.

6.4 Caracterización de la infección

La caracterización de la infección se realizó con base en los parámetros ecológicos de prevalencia, abundancia promedio e intensidad promedio propuestos por Bush *et al.*, (1997). Dicha información permite evaluar los porcentajes de infección en los hospederos además de aportarnos informes sobre las poblaciones de parásitos.

La prevalencia se define como el número de individuos de una especie de hospedero infectado con una especie particular de parásito entre el total de hospederos examinados, expresado en porcentaje.

$$\text{Prevalencia (\%)} = \frac{\# \text{ hospederos infectados}}{\# \text{ hospederos examinados}} \times 100$$

La abundancia promedio es el número total de individuos de una especie de parásito en particular en una muestra de una especie de hospedero, dividida entre el número total de hospederos de la especie que se está estudiando (incluyendo hospederos infectados o no infectados).

$$\text{Abundancia promedio} = \frac{\# \text{ de parásitos de una especie}}{\# \text{ total de hospederos examinados}}$$

La intensidad promedio se define como el número total de parásitos de una especie en particular, dividido entre el número de hospederos infectados.

$$\text{Intensidad promedio} = \frac{\# \text{ total de parásitos de una especie}}{\# \text{ de hospederos infectados}}$$

6.5 Análisis morfométrico

6.5.1 Matriz

Se analizaron 70 ejemplares adultos (10 por cada taxón) identificados como *Cosmocercidae* gen sp. 1, 2, 4, *A. incerta*, *A. itzocanensis* (estos tomados como referencia), *Aplectana* sp. 1 y 2, de los cuales se midieron nueve atributos de importancia taxonómica: longitud total (LT), ancho del cuerpo (AM), longitud del esófago (LE), poro excretor a región anterior (PE-RA), anillo nervioso a región anterior (AN-RA), largo del bulbo (LB), ancho del bulbo (AB), longitud del huevo (LH), ancho del huevo (AH) (Fig. 9) y cinco caracteres cualitativos: dirección de las ramas uterinas (DU), forma de la cola (FC), tipo de ala (TA), papilas en la vulva (PV) y ubicación de la vulva (UV). Todas las medidas se expresaron en milímetros (mm) y a los caracteres cualitativos se les dio el valor de 1 o 2 según sea el caso (PV: ausencia 1, presencia 2; DU: prodélfas 1, anfidélfas 2; FC: cónica 1, filamento 2; TA: simple 1, tricúspide 2 y UV: ecuatorial 1, postecuatorial 2). De cada uno de los caracteres cuantitativos, se obtuvo la media y la desviación estándar .

Como la matriz estaba compuesta por un conjunto de datos sin un factor común que les permitiera correlacionarse, se procedió a la ortogonalización, transformándola en una segunda matriz con la fórmula $z = [(x-\mu)/\sigma]$, donde μ es el valor de la media y σ es la desviación estándar de cada rasgo, lo que reforzaría la confianza en los análisis posteriores (Anexos 1).

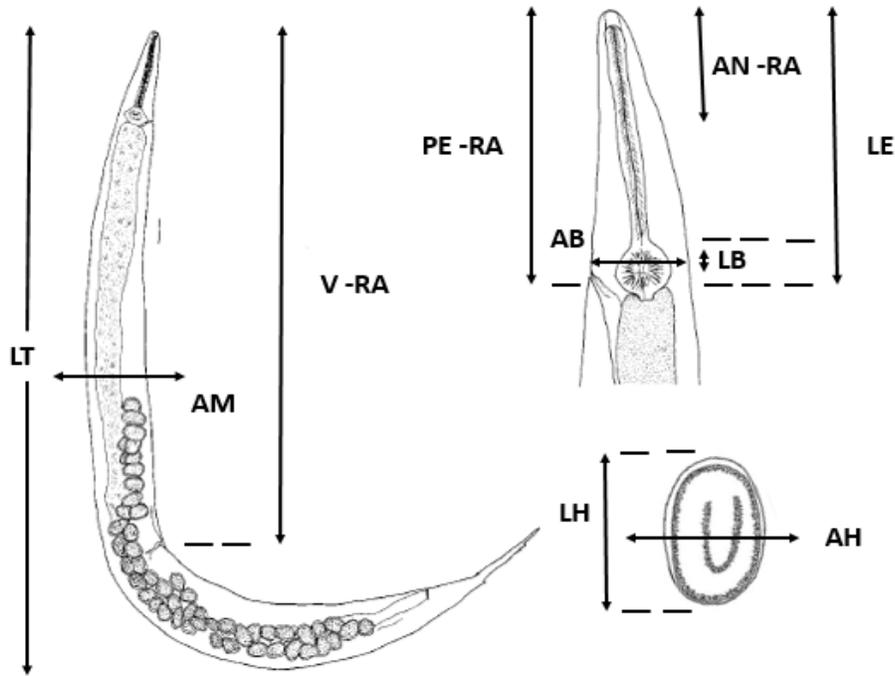


Figura 9. Ejemplar hembra de la familia Cosmocercidae que muestra los atributos: longitud total (LT), ancho del cuerpo (AM), longitud del esófago (LE), poro excretor a región anterior (PE-RA), anillo nervioso a región anterior (AN-RA), largo del bulbo (LB), ancho del bulbo (AB), longitud del huevo (LH), ancho del huevo (AH), dirección de las ramas uterinas (DU), forma de la cola (FC), tipo de ala (TA), papilas en la vulva (PV) y ubicación de la vulva (UV) usados para el análisis morfométrico (Ilustraciones tomadas y editadas de Falcón-Ordaz *et al.*, 2007).

6.5.2 Análisis multivariado

Para realizar todos los análisis, los datos de la matriz ortogonalizada fueron sometidos a una prueba de multinormalidad de Mardia, la cual considera la simetría (cantidad de datos por arriba y por debajo de la media) y la curtosis (la forma en que se distribuyen los datos bajo una curva de normalidad) lo anterior para corroborar la distribución de los datos (Mardia, 1970), posteriormente se procedió a realizar un análisis de varianza multivariado permutacional (PERMANOVA de una vía) con los datos de todos los atributos y después se llevaron a cabo pruebas sucesivas, eliminando cada atributo y después reemplazándolo con el eliminado previamente (el número de PERMANOVAS depende del número de atributos); con lo cual se disminuye la dimensionalidad de la base y se obtiene el modelo mínimo para garantizar la diferencia entre las especies. El valor de corte (Alpha) fue corregido de acuerdo con el criterio de Bonferroni (Zar, 1999). Los valores de

atributos identificados como significativos se utilizaran para establecer los intervalos de exclusión entre especies, finalmente se realizó un Análisis de Coordenadas Principales (ACoP) para graficar los scores considerando las distancias Gower, esto debido a que la matriz estaba conformada con diferentes tipos variables (cualitativas y cuantitativas). Todos los análisis se realizaron con el programa PAST 4.2 (Hammer *et al*, 2001) (Anexo 2).

6.6 Análisis molecular

6.6.1 Extracción de DNA

Se extrajo el DNA genómico de los ejemplares *Aplectana* sp. 2 y Cosmocercidae gen sp. 1 provenientes de una localidades de Eloxochitlán y dos de Metztlán usando el kit Tissue/Insect DNA miniPrep de Zymo Research (Anexo 3), utilizando las recomendaciones del fabricante. Las muestras del DNA obtenidas se mantuvieron en congelación a -20°C.

6.6.2 Amplificación y purificación del DNA

Se llevó a cabo la amplificación parcial de los genes 18s y 28s, mediante los primers Nem_18s_F (5'-CGCGAATRGCTCATTACAACAGC-3') y Nem_18s_R (5'-GGGCGGTATCTGATCGCC-3') para generar un fragmento de aproximadamente 900 pb del gen 18s (Floyd *et al.*, 2005), y 28s-F (5'-AGCGGAGGAAAAGAACTAA-3') y 28s-R (5'-ATCCGTGTTTCAAGACGGG-3'), para obtener un fragmento de aproximadamente 740 pb del gen 28S (Nadler y Hudspeth, 1998). La PCR tuvo un volumen final de 25 µl que comprendió: 3 µl de DNA, 0.2 µl de cada primer, 1 µl de dNTP, 1.8 µl de buffer, 1.5 µl MgC₂, 0.15 µl Taq polimerasa y 17.15 µl de H₂O, bajo las condiciones siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, 38 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30s, alineamiento de primers a 45–48°C durante 30s, extensión a 72°C por 60s, y una elongación final a 72° C durante 7 minutos. Todas las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo en un termociclador de la marca Applied Biosystems modelo Proflex. Los productos de la PCR se mantuvieron en refrigeración a -4°C y posteriormente, fueron purificados por medio del método de polyethylen glycol (PEG) (Anexo 4).

6.6.3 Secuenciación

Los productos de PCR fueron enviados al Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud en el Instituto de Biología, UNAM para llevar a cabo la secuenciación Sanger (Anexo 5).

6.6.4 Edición y alineamiento de secuencias

Las secuencias obtenidas (18s y 28s) se utilizaron como referencia, para llevar a cabo la recuperación de secuencias de especies de la familia Cosmoceridae a través del programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997), en la base de datos de GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (Cuadro 4). Posteriormente, las secuencias fueron alineadas mediante el programa Muscle implementado en Mega X y editadas en el mismo programa (Kumar *et al.*, 2018). Finalmente, las secuencias de ambos genes fueron concatenadas en el programa Mesquite.

6.6.5 Distancias genéticas y generación de árboles filogenéticos

La matriz generada se compone de 21 secuencias y 1582 pares de bases (18s 1-857 pb y 28s 858-1582 pb). Dicha matriz, fue utilizada para obtener el modelo evolutivo de mejor ajuste a los datos en el programa MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) para cada uno de los genes: Kimura+distribución Gamma (K2+G) para 18s y Hasagawa, Kishino y Yano+distribución Gamma (HKY+G) para 28s. Dichos modelos fueron utilizados para obtener las distancias genéticas corregidas, en el programa MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) y obtener los árboles filogenéticos mediante inferencia bayesiana y máxima verosimilitud. El análisis bayesiano fue realizado en el programa MrBayes v3.2.7 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001), empleando dos análisis independientes, cuatro cadenas de Markov Montecarlo y 30 millones de generaciones. El muestreo de los árboles se llevó a cabo cada 1000 generaciones, eliminando el 25% de las topologías generadas al inicio del análisis. El análisis de máxima verosimilitud se llevó a cabo en el programa iQTree (Nguyen *et al.*, 2015), empleando el modelo evolutivo TNe+G4, para el gen 18s y TIM3+F+G4 para 28s, para evaluar el soporte de las ramas se utilizó el método de Bootstrap ultrápido con 1000 pseudoréplicas.

VII. RESULTADOS

Se recolectaron 20 sapos del género *Incilius*, de los cuales se obtuvieron 10 taxones de nematodos: ocho de ellos pertenecientes a la familia Cosmocercidae (dos del género *Aplectana* sp., un *Cosmocercoides* sp. y cinco Cosmocercidae gen. sp.), uno *Rhabdias* sp. y un *Ochoterenella* sp. en las distintas localidades (Cuadro 6).

Cuadro 6. Registro nematofauna parásita del género *Incilius* en algunas localidades del estado de Hidalgo.

Nematodos	Localidades						
	Jilotla, Metztitlán	San Cristóbal, Metztitlán	Santa Mónica, Metztitlán	Acalome, Metztitlán	Metztitlán	San Juan Amajac, Eloxochitlán	Río Blanco , Huehuetla
<i>Aplectana</i> sp. 1	X						
<i>Aplectana</i> sp. 2		X		X			
<i>Cosmocercoides</i> sp.							X
Cosmocercidae gen. sp. 1		X	X	X	X	X	
Cosmocercidae gen. sp. 2				X			
Cosmocercidae gen. sp. 3							X
Cosmocercidae gen. sp. 4							X
Cosmocercidae gen. sp. 5							X
<i>Rhabdias</i> sp.							X
<i>Ochoterenella</i> sp.						X	X

7.1 Caracterizaciones morfológicas y comentarios taxonómicos

Nematoda Cobb, 1932

Chromadorea Inglis, 1983

Spirurida Railliet, 1915

Cosmocercidae Railliet, 1916

***Aplectana* Railliet and Henry, 1916**

***Aplectana* n.sp. 1 (Fig. 10)**

Descripción: Nematodos blancos, pequeños y delgados; machos más pequeños que las hembras. Ala lateral presente en ambos sexos. Boca con tres labios; labio dorsal con dos papilas y cada labio ventrolateral con una papila y un gran anfidio (Fig.11A). Esófago largo con un bulbo esofágico redondeado. Poro excretor anterior al bulbo. Anillo nervioso ubicado aproximadamente a la mitad de la longitud del esófago en las hembras. Macho con 11+1 pares de papilas caudales totales. Espículas del mismo tamaño y gubernáculo.

Macho: (Basado en 16 ejemplares). Longitud total del cuerpo 2.11 ± 0.10 (1.90-2.3); ancho a la mitad del cuerpo 0.09 ± 0.003 (0.1-0.13). Largo del esófago incluyendo el bulbo 0.41 ± 0.01 (0.38-0.45). Bulbo esofágico 0.07 ± 0.006 (0.05-0.10) de largo, 0.07 ± 0.006 (0.06-0.10) de ancho. Distancia del poro excretor a la región anterior 0.32 ± 0.013 (0.3-0.35). No se observó el anillo nervioso. Ala lateral en forma simple, iniciando en el primer tercio de la región cefálica y finalizando a la altura del ano. Espículas de igual tamaño con una longitud de 0.19 ± 0.02 (0.15-0.22). Gubernáculo 0.10 ± 0.006 (0.10-0.12) de largo. Pequeña hilera de cerdas cuticulares en forma de brocha en el ano (Fig. 11B). Cinco pares de papilas preecloacales, tres pares y una impar de mayor tamaño sobre la apertura anal (tres papilas de lado derecho y tres del izquierdo de la papila impar), un par adanal y dos pares postcloacales (5:3+1:1:2) (Fig. C, D). Cola cónica.

Hembra: (Basado en 15 ejemplares). Longitud total del cuerpo 2.8 ± 0.19 (2.4-3.1); ancho a la mitad del cuerpo 0.10 ± 0.01 (0.1-0.15). Largo del esófago incluyendo el bulbo esofágico 0.49 ± 0.01 (0.40-0.55). Bulbo esofágico 0.09 ± 0.009 (0.05-0.10) de largo, 0.08 ± 0.009 (0.06-0.10) de ancho. Distancia del poro excretor a la región anterior 0.36 ± 0.02 (0.30-0.40). Anillo nervioso a 0.23 ± 0.01 (0.2-0.25) de la región anterior. Presencia de ala lateral de forma simple iniciando en el primer tercio de la región cefálica hasta el ano (Fig.10, 12A). Vulva post-ecuatorial, situada a

1.83±0.12 (1.60-2) del extremo anterior con un par de papilas en la parte anterior de esta (Fig.13). Tiene un arreglo prodélfico de las ramas uterinas. De 7 a 44 huevos embrionados, 0.14±0.04 (0.11-0.26) de largo y 0.09±0.03 (0.07-0.17) de ancho (Fig.12B). Cola cónica 0.17±0.01 (0.15-0.22) de largo.

Hospedero: *Incilius valliceps*

Sitio de infección: Intestino

Localidad: Jilotla, Metztitlán.

Coordenadas: 20° 32'58"N 98° 44' 51"W

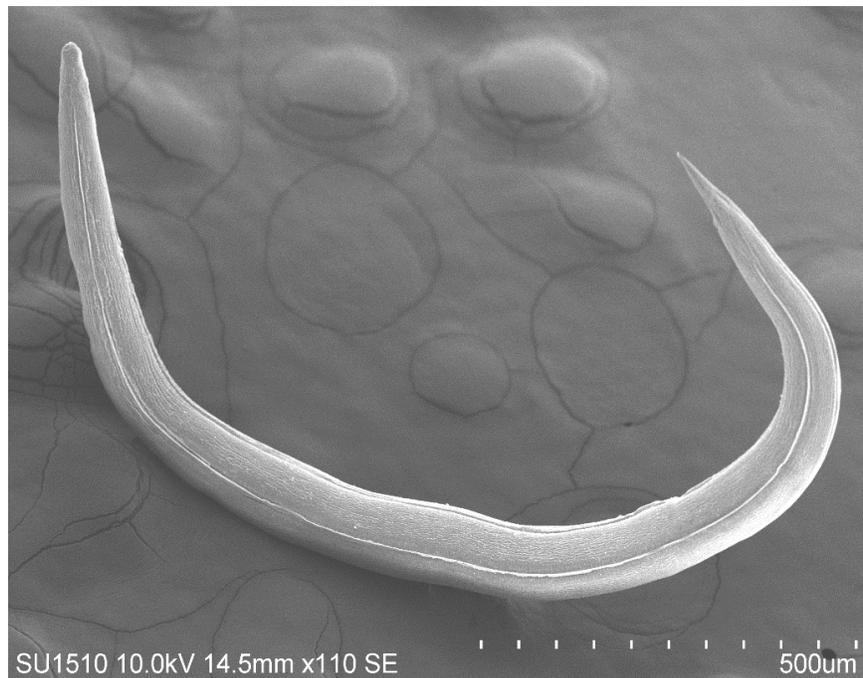


Figura 10. Micrografía de microscopio electrónico de barrido de un ejemplar hembra de *Aplectana* n.sp. 1, parásita de *Incilius valliceps*, de Metztitlán, Hidalgo, ejemplar completo.

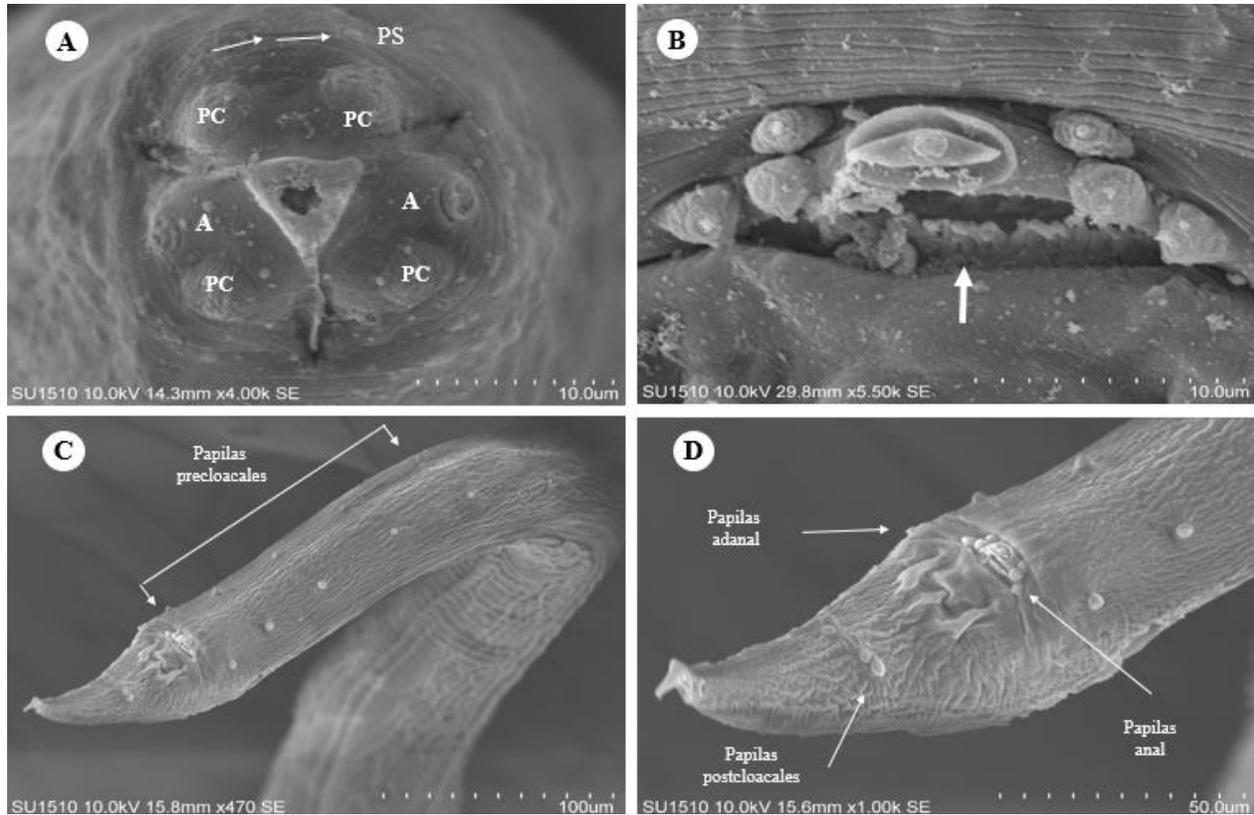


Figura 11. Micrografía de microscopio electrónico de barrido de ejemplares macho de *Aplectana* n.sp. 1, parásita de *Incilius valliceps*, de Metztitlán, Hidalgo, A) Región cefálica (A=anfidios, PC=papilas cefálicas, PS=papilas somáticas) Macho: B) Hilera de cerdas cuticulares en forma de brocha C) y D) Región caudal, mostrando las papilas genitales.

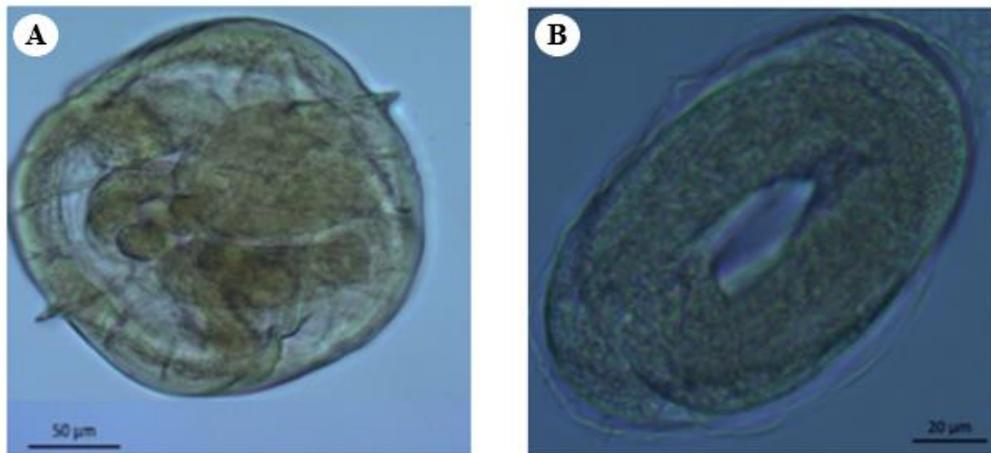


Figura 12. Ejemplar hembra de *Aplectana* n.sp. 1 A) Corte en la región media que evidencia la forma simple del ala lateral B) Huevo embrionado.

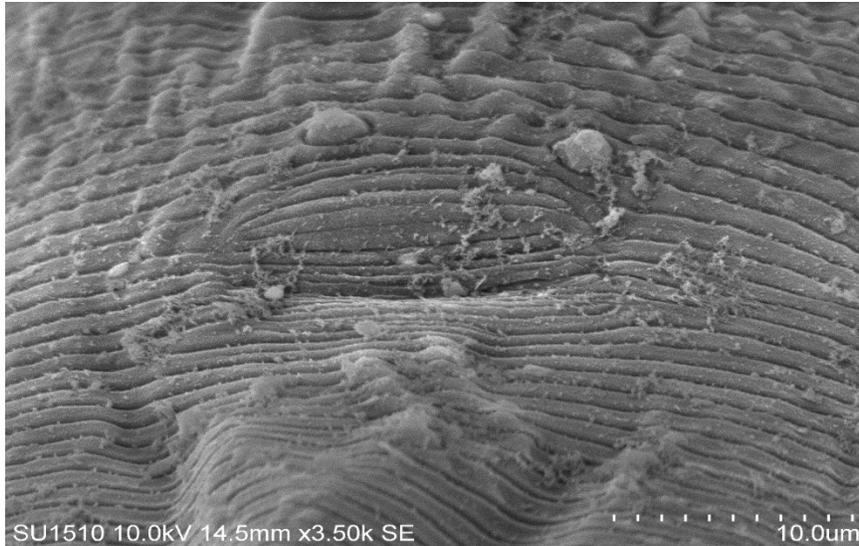


Figura 13. Micrografía de microscopio electrónico de barrido de un ejemplar hembra de *Aplectana* n.sp. 1 de la región de la vulva con la presencia de un par de papilas.

Comentarios taxonómicos

Los ejemplares identificados como *Aplectana* n.sp. 1 fueron asignados a dicho género por presentar alas laterales, machos sin papilas rosetadas ni plectanas en la región caudal, hembras con numerosos huevos de cáscara fina y prodélfas.

El género *Aplectana* está integrada por 66 especies, que parasitan anfibios y reptiles (Hodda, 2022; Ramallo *et al.*, 2023; Santos *et al.*, 2023). Se distribuyen a lo largo de nueve regiones biogeográficas con seis especies en la Afrotropical, una en la Australiana, dos en la Madagascar, cinco en la Neártica, 30 en la Neotropical, tres en la Oceánica, ocho en la Oriental, cuatro en la Paleártica y ocho en la Sino-Japonesa (Miranda, 1924; Travassos, 1925, 1926, 1931; Baylis, 1929; Caballero, 1933; Walton, 1940; Lent y Freitas, 1948; Silva, 1955; Chabaud y Brygoo, 1958; Le Van Hoa, 1962; Gomes y Motta, 1967; Barus y Coy Otero, 1969; Vicente y Santos, 1970; Fabio, 1971; Araujo, 1976; Islam *et al.*, 1979; Wang, 1980; Baker, 1980, 1981, 1985; Baker y Vaucher, 1986; Moravec y Sey, 1986; Adamson y Baccam, 1988; Baker y Green, 1988; Puga y Torres, 1997; Bursey y Goldberg, 2007; Ramallo *et al.*, 2007, 2008; Bursey *et al.*, 2006, 2011, 2018; Falcón-Ordaz *et al.*, 2014; Sou *et al.*, 2014, 2018; Sou y Nandi, 2015; Amorim *et al.*, 2017; Piñeiro-Gomez *et al.*, 2017; Matos-Vieira *et al.*, 2020; Sou y Banerjee, 2020; Chen *et al.*, 2021).

Aplectana n.sp. 1 se diferencia del total de especies del género, en la presencia de un par de papilas preovulares en las hembras. Sin embargo, los ejemplares estudiados son similares a *A.*

chamaeleonis, *A. courdurieri*, *A. itzocanensis*, *A. incerta*, *A. hylambatis* y *A. linstowi* en la presencia de una hilera de cerdas en forma de brocha ubicada en el ano y en la disposición del arreglo papilar ubicado sobre la abertura del ano siendo de tres pares con una impar de mayor tamaño (3+1); no obstante, difiere de todas las anteriores por tener un gubernáculo de mayor tamaño (0.05-0.09 vs 0.10-0.12) y un arreglo papilar postcloacal con un menor número de pares de papilas (2 vs 3-6) (Cuadro 7).

***Aplectana* n.sp. 2** (Fig. 14)

Descripción: Nematodos blancos; machos más pequeños que las hembras. Esófago largo con un bulbo redondeado. Poro excretor anterior al bulbo esofágico. Ala lateral presente en ambos sexos. Anillo nervioso ubicado aproximadamente a la mitad de la longitud del esófago. Macho con 13+1 pares de papilas caudales totales. Espículas aladas del mismo tamaño y gubernáculo.

Macho: (Basado en 20 ejemplares). Longitud total del cuerpo 4.1 ± 0.31 (3.5-4.62); ancho en cuerpo medio 0.18 ± 0.01 (0.15-0.2). Largo del esófago 0.55 ± 0.03 (0.52-0.60). Bulbo esofágico 0.09 ± 0.004 (0.08-0.10) de largo, 0.09 ± 0.006 (0.08-0.10) de ancho. Distancia del poro excretor 0.49 ± 0.03 (0.4-0.54) (Fig.15) y anillo nervioso 0.28 ± 0.03 (0.25-0.34) a región anterior, respectivamente. Ala lateral iniciando en el primer tercio de la región cefálica finalizando hasta después del ano. Espículas alada de igual tamaño 0.29 ± 0.02 (0.25-0.32). Gubernáculo 0.12 ± 0.01 (0.10-0.135). Hilera de cerdas cuticulares en forma de brocha en el ano (Fig. 16B). Siete pares de papilas precloacales, tres pares y una impar de mayor tamaño sobre la apertura anal (tres papilas de lado derecho y tres del izquierdo de la papila impar), dos pares adanales y dos pares postcloacales (7:3+1:2:2) (Fig. 16A,B) . Cola cónica.

Hembra: (Basado en 32 ejemplares). Longitud total del cuerpo 4.12 ± 1.26 (2.6-6.2); ancho en cuerpo medio 0.24 ± 0.03 (0.1-0.30). Largo del esófago 0.45 ± 0.16 (0.25-0.70). Bulbo esofágico 0.09 ± 0.01 (0.07-0.12) de largo, 0.09 ± 0.012 (0.08-0.12) de ancho. Distancia del poro excretor 0.41 ± 0.18 (0.20-0.60) y anillo nervioso 0.18 ± 0.02 (0.15-0.23), respectivamente. Presencia de ala lateral de forma tricuspide (Fig.17A), iniciando en el primer tercio de la región cefálica y finalizando después del ano. Vulva post-ecuatorial, situada a 2.34 ± 1.06 (1.3-4) del extremo anterior. Prodélficas. Huevos numerosos de forma elíptica (Fig.17B) 0.23 ± 0.05 (0.19-0.26) de largo y 0.16 ± 0.05 (0.12-0.3) de ancho. Cola cónica 1.23 ± 4.53 (0.20-0.25) de largo.

Hospedero: *Incilius valliceps*

Sitio de infección: Intestino

Localidad: San Cristóbal, Metztitlán (20° 38' 20" N 98° 49'44" W)

Acalome, Metztitlán (20° 28 ' 02" N 98° 40' 18" W)

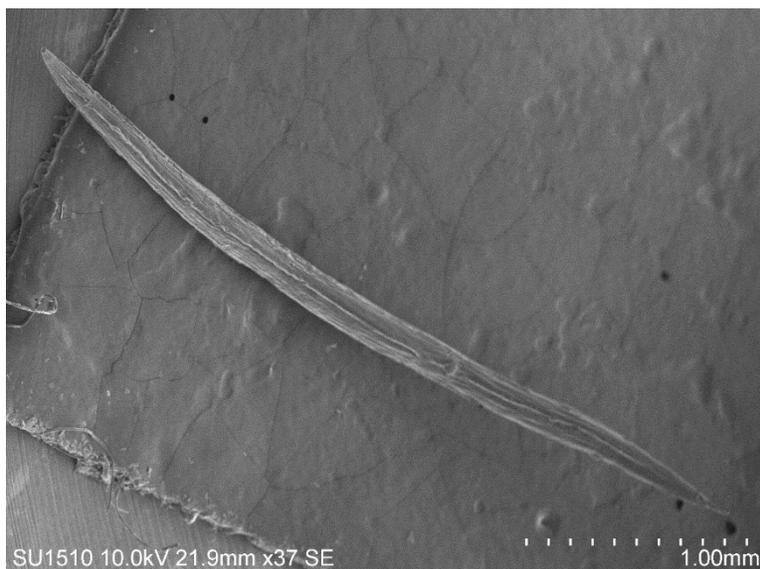


Figura 14. Micrografía de microscopio electrónico de barrido de un ejemplar hembra de *Aplectana* n.sp. 2, parásita de *Incilius vallicep*, ejemplar completo.



Figura 15. Micrografía de microscopio electrónico de barrido de un ejemplar *Aplectana* n.sp. 2, donde se puede observar el poro excretor y tres labios en la región cefálica.

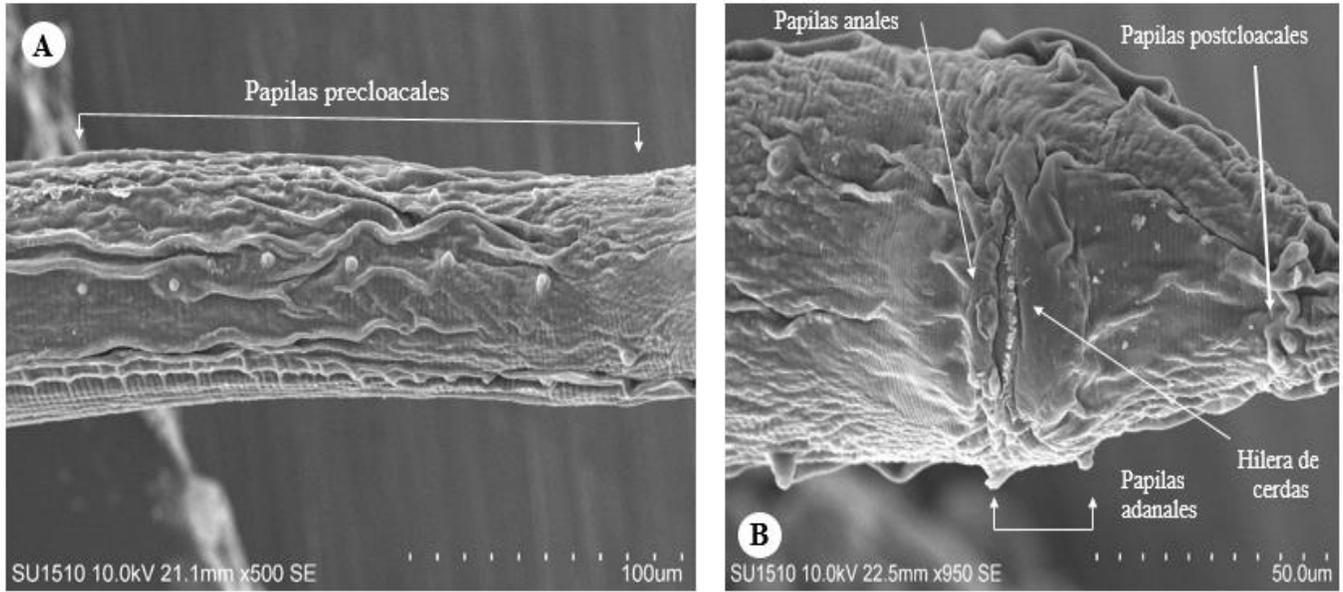


Figura 16. Micrografía de microscopio electrónico de barrido de la región caudal de uno de los ejemplares machos de *Aplectana n.sp. 2* A) Disposición del patrón papilar precloacal B) Disposición papilar anal, adanal y postcloacal.

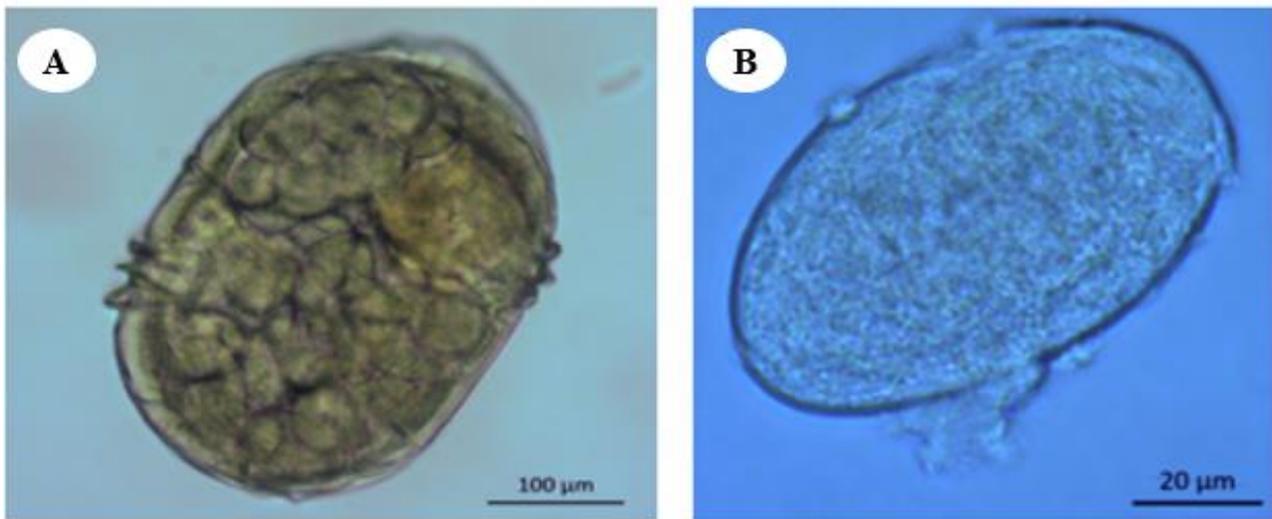


Figura 17. Fotografía de microscopio de luz A) Corte en la región media de uno de los ejemplares hembra de *Aplectana n.sp. 2* donde se visualiza la presencia de ala lateral de forma tricúspide B) Huevo en forma elíptica no embrionado

Comentario taxonómico

Los ejemplares estudiados se asignaron al género *Aplectana* por la presencia de alas laterales, los machos no exhiben papilas caudales rosetadas ni plectanas y las hembras son prodélficas.

Aplectana n.sp. 2 es similar a *Aplectana* n.sp. 1, *A. brumpti*, *A. brygooi*, *A. chamaeleonis*, *A. courdurieri*, *A. itzocanensis*, *A. incerta*, *A. hylambatis*, *A. leesi*, *A. linstowi*, *A. membranosa* y *A. nananae* en la disposición del arreglo papilar ubicado sobre la abertura del ano siendo de tres pares con una papila impar de mayor tamaño (3+1); sin embargo difiere de *A. brumpti*, *A. brygooi*, *A. courdurieri*, *A. leesi*, *A. membranosa* y *A. nananae* por la presencia de una hilera de cerdas en forma de brocha ubicada en el ano. De igual modo, se distingue de *A. chamaeleonis*, *A. itzocanensis*, *A. incerta*, *A. hylambatis* y *A. linstowi* con base en el arreglo papilar de la región adanal y postcloacal (1:4-8 vs 2:2) respectivamente, las dimensiones de las espículas (0.13-0.28 vs 0.25-0.32) y por tener el gubernáculo de mayor tamaño (0.053-0.10 vs 0.10-0.12) que las especies mencionadas (Cuadro 7).

Aplectana n.sp. 1 y *Aplectana* n.sp. 2 son similares en la disposición del arreglo papilar ubicadas sobre la abertura del ano, siendo tres pares y una impar de mayor tamaño (3+1), en el arreglo de dos pares de papilas postcloacales y en la presencia de una hilera de cerdas en forma de brocha, pero se distinguen en la forma del tipo de ala siendo simple en *Aplectana* n.sp. 1 y tricúspide en *Aplectana* n.sp. 2, en el tamaño de las espículas (0.15-0.22 vs 0.25-0.32) las cuales son de mayor tamaño en *Aplectana* n.sp. 2. Además difieren por la ausencia de papilas preevulvares.

Cuadro 7. Cuadro comparativo de las 66 especies que integran el género *Aplectana*.

Especies de <i>Aplectana</i>	Caracteres morfológicos					Referencia
	Longitud Total		Espícula	Gubernáculo	Papilas caudales pre: anal:ad:post anal	
	Hembra	Macho				
<i>Aplectana</i> n.sp. 1	2.4 -3.1	1.9 -2.3	0.15 - 0.22	0.10 -0.12	5:3+1:1: 2	Estudio actual
<i>Aplectana</i> n.sp. 2	2.6 -6.2	3.5 - 4.62	0.25-0.32	0.10-0.135	7:3+1:2:2	Estudio actual
<i>A. acuminata</i> (Schrank,1788)	-----	4 - 4.8	0.295-383	0.089 - 0.118	Variables (numerosas)	Travassos, 1931
<i>A. adaechevarriae</i> Ramallo, Bursey y Goldberg, 2008	3.4-5.2	2.2-3.5	0.25 - 0.31	0.1	8:0:1:6	Ramallo, Bursey y Goldberg, 2008
<i>A. akhrami</i> Islam <i>et al.</i> 1979	3.0-3.6	1.8-3.4	0.15-0.18	Ausente	8:0:0:6	Islam <i>et al.</i> 1979
<i>A. albae</i> Adamson y Baccam, 1988	2.9-4.3	1.9-3.8	0.05-0.06	0.041 - 0.049	6-7+1:1:5	Adamson y Baccam 1988
<i>A. artigasi</i> Puga y Torres,1997	3.8-6	3 -4	0.32 - 0.36	Ausente	14:1:1:10-14	Puga y Torres ,1997
<i>A. brumpti</i> Travassos, 1931	2.9 - 3.4	2.5	0.205	0.077	9: 3+1:1:3	Travassos, 1931
<i>A. brygooi</i> Baker, 1980	2.5-3.8	1.4-3.0	0.249	0.051	5:3+1+0:3-4	Baker, 1980
<i>A. capensis</i> Baker, 1981	2.5-9.6	2.7-4.1	0.20-0.23	0.035-0.040	numerosas	Baker, 1981

* Pre: antes del ano; Anal: sobre el ano; Ad: adanal (laterales al ano); Post: después del ano.

Cuadro 7. Continuación.

Especies de <i>Aplectana</i>	Caracteres morfológicos					Referencia
	Longitud Total		Espícula	Gubernáculo	Papilas caudales pre: anal:ad:post anal	
	Hembra	Macho				
<i>A. chamaeleonis</i> Travassos, 1931	5.6-6.7	2.6-3.86	0.19-0.21	0.05-0.085	5- 9: 3+1:2:4	Travassos, 1931
<i>A. chilensis</i> Lent and Freiras, 1948	3.25 -3.40	2.27- 2.69	0.025 -0.032	Ausente	12:0:0:6	Lent y Freiras, 1948
<i>A. courdurieri</i> Chabaud y Brygoo, 1958	6.8-12.2	4.5	0.36	0.05	5:3+1:1:6	Chabaud y Brygoo, 1958
<i>A. crossodactyli</i> Baker, 1980	3.4-5.3	2.8-3.7	0.13 - 0.14	Ausente	25:1:0:5	Vicente y Santos, 1970
<i>A. crucifer</i> Travassos, 1925	4.2	3.5	0.33	Ausente	5:1:1:4	Travassos, 1925
<i>A. dayaoshanensis</i> Chen <i>et al.</i> , 2021	3.39-4.75	3.11-3.54	0.158- 0.208	Ausente	5-4:1+1:0:6	Chen <i>et al.</i> , 2021
<i>A. degraaffi</i> Baker, 1981	3.8-5.1	3.6-4.6	0.17-0.21	0.060-0.078	7- 9:0:0:6	Baker, 1981
<i>A. delirae</i> Fabio, 1971	3.8-4.6	4.0-4.1	-	Ausente	Variable	Fabio, 1971

* **Pre:** antes del ano; **Anal:** sobre el ano; **Ad:** adanal (laterales al ano); **Post:** después del ano.

Cuadro 7. Continuación

Especies de <i>Aplectana</i>	Caracteres morfológicos					Referencia
	Longitud Total		Espícula	Gubernáculo	Papilas caudales pre: anal: ad:post anal	
	Hembra	Macho				
<i>A. dubrajpuri</i> Sou y Nandi, 2015	1.4–1.5	1.1–1.2	0.14–0.16	Ausente	3:2+1:0:14	Sou y Nandi, 2015
<i>A. duttaphryni</i> Sou <i>et al.</i> 2014	3.45–3.57	2.31–2.45	0.222–0.230 y 0.235–0.240	0.015–0.017	3:1:1:11	Sou <i>et al.</i> , 2014
<i>A. elenae</i> Baker y Vaucher, 1986	2.1–3.6	1.5–2.6	0.097–0.11	0.028–0.043	8:1:1:5	Baker y Vaucher, 1986
<i>A. fujianae</i> Bursey <i>et al.</i> 2011	3.3	3.1	0.3	0.068	1:0:0:6	Wang, 1980
<i>A. haianensis</i> Bursey <i>et al.</i> 2018	6.58–9.15	5.76–7.04	0.268–0.306	0.077–0.102	8:0:1:2	Bursey <i>et al.</i> , 2018
<i>A. hamatospicula</i> Walton, 1940	3.4–4.2	2.1–3.0	0.23–0.24	0.070–0.072	4:1:0:7	Walton, 1940
<i>A. herediaensis</i> Bursey <i>et al.</i> , 2006	2.9–3.3	2.3–2.8	0.067–0.079	0.043–0.052	9:0:0:3	Bursey <i>et al.</i> , 2006

* Pre: antes del ano; Anal: sobre el ano; Ad: adanal (laterales al ano); Post: después del ano.

Cuadro 7. Continuación.

Especies de <i>Aplectana</i>	Caracteres morfológicos					Referencia
	Longitud Total		Espícula	Gubernáculo	Papilas caudales pre: anal: ad:post anal	
	Hembra	Macho				
<i>A. hoplobatrachus</i> Sou et al. 2018	2.27–4.50	1.10–1.62	0.16–0.21	Ausente	4:0:1-2:10	Sou et al., 2018
<i>A. hylae</i> Wang, 1980	2.9–3.2	1.6–2.0	0.18–0.19	0.056–0.060	0:0:3	Wang, 1980
<i>A. hylambatis</i> Travassos, 1931	5.3 – 6	4 - 4.2	0.24 - 0.28	0.09 - 0.10	4-6:3+1:1:6	Baylis, 1927
<i>A. incerta</i> Baker, 1985	2.68-3.88	2.34-2.53	0.135 - 0.143	0.052- 0.063	7: 3+1:1:6	Baker, 1985
<i>A. itzocanensis</i> Baker, 1985	3.50-6.92	2.55-3.70	0.172 - 0.203	0.067 - 0.08	7: 3+1:1:6	Baker, 1985
<i>A. krausi</i> Bursey y Goldberg 2007	2.56 -3.65	2.18 -2.94	0.159 - 0.183	0.076 - 0.098	5:0:1: 5	Bursey y Goldberg 2007
<i>A. leesi</i> Hristovki et al. 1975	6.7–12.2	4.4–5.5	0.21 –0.24	0.053–0.072	4:3+1:1:3	Baker, 1980
<i>A. linstowi</i> Yorke et al. 1926	3.6–4.5	2.5–2.9	0.17 –0.20	0.053–0.055	7 - 9:3+1:1:8	Baker, 1980

* **Pre:** antes del ano; **Anal:** sobre el ano; **Ad:** adanal (laterales al ano); **Post:** después del ano.

Cuadro 7. Continuación.

Especies de <i>Aplectana</i>	Caracteres morfológicos					Referencia
	Longitud Total		Espícula	Gubernáculo	Papilas caudales pre: anal: ad:post anal	
	Hembra	Macho				
<i>A. lopesi</i> Silva, 1955	10.2–11.1	3.3	0.15	0.034	18:0:3:7	Silva, 1955
<i>A. lynae</i> Kennedy, 1978	4.71-7.19	3.95-6.31	0.275-0.385	0.1 10-0.132	10:0:1:8	Kennedy, 1978
<i>A. macintoshii</i> Travassos, 1931	2.4–6.7	1.2–2.6	0.13–0.32	0.022–0.090	Variables	Baker, 1980
<i>A. membranosa</i> Miranda, 1924	2-4–3.5	2.0–2.5	0.22 - 0.23	0.071- 0.080	5:3+1+2+4	Miranda, 1924
<i>A. meridionales</i> Lent y Freiras, 1948	3.42– 3.97	2.3–2.58	0.130 - 0.136	Ausente	7:0:2:5	Lent y Freiras, 1948
<i>A. mexicana</i> Caballero, 1933	2.75-3	2.5	0.2	0.056	3:0:2:3	Caballero, 1933
<i>A. micropenis</i> Travassos, 1925	-----	2.5	0.06	0.01	4:0:0:1	Travassos, 1925
<i>A. minaensis</i> Matos-Vieira <i>et al.</i> 2020	2.7–3.98	2.25–3.38	0.40 –0.60 y 0.41 – 0.60	Presente	4+1:0:2:6	Matos-Vieira <i>et al.</i> 2020

* Pre: antes del ano; Anal: sobre el ano; Ad: adanal (laterales al ano); Post: después del ano.

Cuadro 7. Continuación.

Especies de <i>Aplectana</i>	Caracteres morfológicos					Referencia
	Longitud Total		Espícula	Gubernáculo	Papilas caudales pre: anal: ad:post anal	
	Hembra	Macho				
<i>A. nananae</i> Ramallo <i>et al.</i> , 2023.	2.88-3.73	2.42-3	0.06-0.07	0.04	5: 3+1:2:2	Ramallo <i>et al.</i> , 2023.
<i>A. nebulosa</i> Piñeiro-Gómez <i>et al</i> 2017	2.9-5.8	2.2-3.5	0.085 - 0.125	0.037 - 0.062	6:2+1:1:5	Piñeiro-Gómez <i>et al.</i> , 2017
<i>A. nordestina</i> Darciane <i>et al.</i> , 2017	1.55 - 3.33	2.1 -2.9	0.066- 0.094 y 0.071- 0.103	0.037 - 0.057	4:2:1:4	Darciane <i>et al.</i> , 2017
<i>A. novaeguineae</i> Bursey <i>et al.</i> 2011	1.92-3.01	1.66-2.43	0.408- 0.485	0.073- 0.104	5:1:0:4	Bursey <i>et al.</i> , 2011
<i>A. novaezelandiae</i> Baker y Green,1988	1.8-3.5	1.7-2.0	0.10- 0.12	0.025-0.030	Variable	Baker y Green,1988
<i>A. papillifera</i> Baker, 1980	5.9-8.5	4.4-5.2	0.4	Ausente	10+1:0:1:8	Araujo, 1976/77
<i>A. paraelenae</i> Baker y Vaucher,1986	2.4-3.6	2.1	0.22	0.053	3+1:0:2:6	Baker y Vaucher,1986
<i>A. paucipapillosa</i> Wang, 1980	2.8-4.2	2.4-2.5	0.12-0.12	0.07	3:0:0:4	Wang, 1980

* **Pre:** antes del ano; **Anal:** sobre el ano; **Ad:** adanal (laterales al ano); **Post:** después del ano.

Cuadro 7. Continuación.

Especies de <i>Aplectana</i>	Caracteres morfológicos					Referencia
	Longitud Total		Espícula	Gubernáculo	Papilas caudales pre: anal: ad:post anal	
	Hembra	Macho				
<i>A. pella</i> Santos, Borges y Melo, 2023	2.3-4.3	2.3-2.9	0.10-0.11	Ausente	2:0:1:5+1	Santos <i>et al.</i> , 2023
<i>A. praeputialis</i> Le Van Hoa, 1962	6.2	2.3	----	0.09	5:0:0:12	Le Van Hoa, 1962
<i>A. pusilla</i> Miranda, 1924	2.6	2	0.11	0.049	0:0:0:1	Miranda, 1924
<i>A. raillieti</i> Travassos, 1925	5.7	2.1	0.23	0.032	8:1:0:5	Travassos, 1925
<i>A. ranae</i> Baker, 1980	3.8	2.5	0.16	0.025	6:0:2:2-3	Walton, 1931
<i>A. rysavyi</i> Barus <i>et al.</i> 1969	4.4-5.3	3.4	0.72	0.11	7:0:2:4	Moravec y Sey, 1986
<i>A. samarensis</i> Bursey <i>et al.</i> , 2018	3.07-4.16	2.56-3.39	0.158-0.220	0.049-0.067	4:0:1:4	Bursey <i>et al.</i> , 2018
<i>A. sriniketanensis</i> Sue and Banerjee, 2020	5.01 - 5.10	1.45 -1.52	0.18 -0.20	Ausente	5:0:2:13	Sue y Banerjee, 2020

* **Pre:** antes del ano; **Anal:** sobre el ano; **Ad:** adanal (laterales al ano); **Post:** después del ano.

Cuadro 7. Continuación.

Especies de <i>Aplectana</i>	Caracteres morfológicos					Referencia
	Longitud Total		Espícula	Gubernáculo	Papilas caudales pre: anal: ad:post anal	
	Hembra	Macho				
<i>A. tarija</i> Ramallo, Bursey y Goldberg, 2007	4.7–5.8	3.11	0.12	Ausente	1:0:0:3+1	Ramallo <i>et al.</i> , 2007
<i>A. travassosi</i> Baker, 1980	2.9–3.1	2.8–3.2	0.23 – 0.32	0.070 –0.080	5: 1-2+1:4	Gomes y Motta, 1967
<i>A. tucumanensis</i> Ramallo <i>et al.</i> 2008	3.0–4.5	2.1–3.0	0.1	0.04	9:0:1:6	Ramallo <i>et al.</i> 2008
<i>A. uaehi</i> Falcón-Ordaz <i>et al.</i> , 2014	10.5–30	8.9–24.4	0.32 – 0.52	0.12 –0.15	2:0:2:6	Falcón-Ordaz <i>et al.</i> , 2014
<i>A. vellardi</i> Travassos, 1926	3.8 - 4.9	3.4 - 3.7	0.19 - 0.21	0.012	9:0:0:9	Travassos, 1926
<i>A. vercammeni</i> Le Van Hoa, 1962	8	2.3	0.24 –0.25	Ausente	8:0:0:12	Le Van Hoa, 1962
<i>A. xishuangbannaensis</i> Chen <i>et al.</i> , 2021	3.54–3.86	2.32–2.72	0.139– 0.178	Ausente	6: 1:3:4	Chen <i>et al.</i> , 2021

* Pre: antes del ano; Anal: sobre el ano; Ad: adanal (laterales al ano); Post: después del ano.

Cuadro 7. Continuación.

Especies de <i>Aplectana</i>	Caracteres morfológicos					Referencia
	Longitud Total		Espícula	Gubernáculo	Papilas caudales pre: anal: ad:post anal	
	Hembra	Macho				
<i>A. zweifeli</i> Moravec y Sey, 1986	2.2–3.6	1.7–2.2	0.45	0.096–0.10	7–9:1+1:0:9	Moravec y Sey, 1986

* **Pre:** antes del ano; **Anal:** sobre el ano; **Ad:** adanal (laterales al ano); **Post:** después del ano.

***Cosmocercoides* Wilkie, 1930**

***Cosmocercoides* sp. (Fig. 18A)**

Descripción: basado en un macho y una hembra. Cuerpo fusiforme, de tamaño pequeño y robusto. Macho más pequeño que la hembra. Poro excretor anterior al bulbo esofágico. Ala lateral presente en ambos sexos. Hembras con la vulva ubicada preecuatorialmente. Machos con papilas rosetadas en la región caudal.

Macho: Longitud total del cuerpo 2.75; ancho en mitad del cuerpo 0.3. Largo del esófago 0.44. Bulbo esofágico 0.1 de largo y 0.1 de ancho. Distancia del poro excretor y anillo nervioso a región anterior 0.33 y 0.14, respectivamente. Presencia de ala desde el primer tercio de la región cefálica hasta el ano. Espículas del mismo tamaño 0.175 (Fig. 18C). Gubernáculo 0.2. Disposición de las papilas en región caudal: 13 pares preanales (los primero ocho pares se encuentran separados con las siguientes distancias: del 1-2 par (0.125), 2-3 (0.09), 3-4 (0.05), 4-5 (0.045), 5-6 (0.035), 6-7 (0.03) y 7-8 (0.02) y tres pares postcloacales (13:0:3). Cada roseta se compone de 14 prominencias alrededor de una papila central (Fig. 18B,C). Cola corta, 0.08.

Hembra: Longitud total del cuerpo 3.75; ancho en la mitad del cuerpo 0.28. Largo del esófago 0.35. Bulbo esofágico 0.1 de largo y 0.08 de ancho. Poro excretor a región anterior 0.26. Anillo nervioso no observado. Presencia de ala lateral iniciando en el primer tercio de la región cefálica hasta el ano. Vulva preecuatorial a 0.9 del extremo anterior. Anfidélfica. Huevos numerosos de, 0.1 de largo por 0.07 de ancho. Cola corta, 0.1.

Hospedero: *Incilius* sp.

Sitio de infección: Intestino

Localidad: Río Blanco, Huehuetla (20° 24'42"N 98° 05' 09"W)

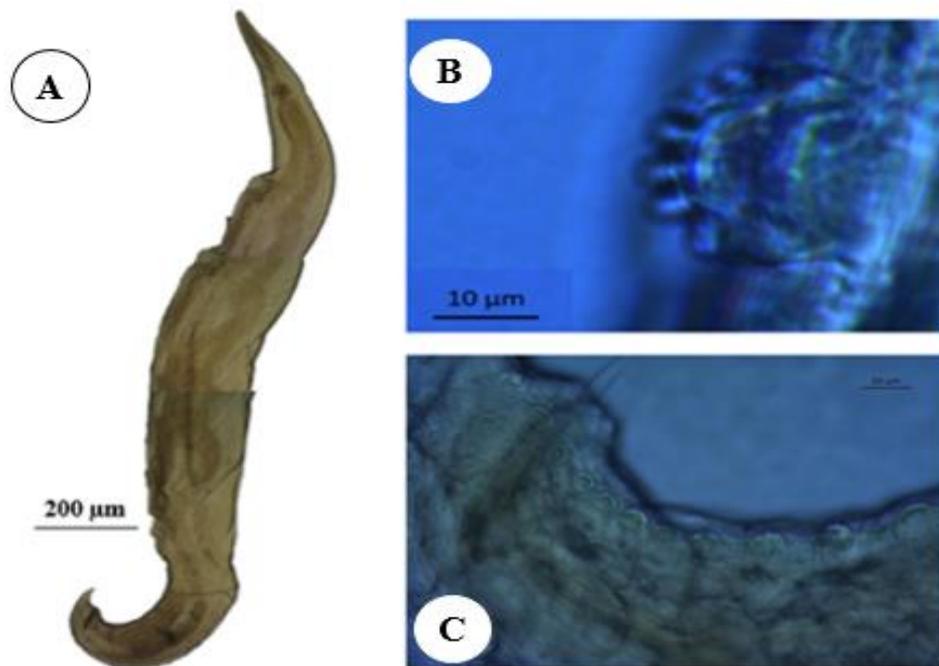


Figura 18. Macho de *Cosmocercoides* sp. A) Vista completa B) Papila rosetada C) Región caudal mostrando la apertura anal y una espícula.

Comentarios taxonómicos

Los ejemplares identificados como *Cosmocercoides* sp. fueron asignados a dicho género por la presencia de papilas rosetadas en la región caudal y ausencia de plectanas, hembras con numerosos huevos y útero anfidélfico.

El género *Cosmocercoides* está integrado aproximadamente por 29 especies; se distribuyen a lo largo de cinco regiones biogeográficas con 3 en la Neártica, 5 en la Neotropical, 9 en la Oriental, 2 en la Paleártica y 10 en la Sino-Japonesa (Burseý *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2018 ; Liu *et al.*, 2019; Draghi *et al.*, 2020; Ferreira-Dos Anjos *et al.*, 2021; Rabelo *et al.*, 2023). Suelen parasitar anfibios y reptiles pero ocasionalmente se detectan en caracoles terrestres y babosas (Vanderburgh y Anderson, 1986).

Cosmocercoides sp. es similar a *C. bufonis*, *C. kiliwai*, *C. malayensis*, *C. multipapillata*, *C. nainitalensis*, *C. pulcher*, *C. qingtianensis*, *C. rickae*, *C. tibetanum*, *C. tonkinensis*, *C. tridens* y *C. variabilis* en el rango del arreglo de las papilas precloacales (13 vs 13-22), no obstante, difieren de

las especies anteriores en la disposición de las papilas adanales, estando ausente en nuestros ejemplares y con 1-2 pares en todas las anteriores, además de eso presenta un gubernáculo de mayor tamaño (0.20 vs 0.03–0.18)(Cuadro 8). *Cosmocercoides* sp. es un nuevo registro del hospedero y localidad, así como una posible nueva especie, sin embargo falta material para poder confirmar lo anterior.

Cuadro 8. Cuadro comparativo de las 29 especies que integran el género *Cosmocercoides*.

Especies de <i>Cosmocercoides</i>	Caracteres morfológicos						Referencia
	Longitud Total		Espícula	Gubernáculo	Papilas rosetadas Pre:Ad:Post anal	Ala lateral	
	Hembra	Macho					
<i>Cosmocercoides</i> sp.	3.75	2.75	0.175	0.2	13:0:3	Presente	Presente estudio
<i>C. amapari</i> Rabelo <i>et al.</i> , 2023	8.3–10.4	2.3–2.8	0.114– 0.126	Ausente	9-10:0:0	Presente	Rabelo <i>et al.</i> , 2023.
<i>C. barodensis</i> Rao, 1979	-	2.1	De: 0.24 Iz: 0.23	0.06	8:0:2	Presente	Rao, 1979.
<i>C. bufonis</i> Karve, 1943	4.6 - 4.92	5.15 - 6.3	0.19 - 0.26	0.12 – 0.14	9-13:1:3	Presente	Karve, 1943.
<i>C. dukae</i> (Holl, 1928) Travassos, 1931.	-	2.6	0.29	0.102	11:0:1	-	Holl, 1928.
<i>C. himalayanus</i> Rizvi y Bursey, 2014	6.43–7.70	4.56–6.77	0.242 - 0.260	0.142 - 0.158	12:1:2	Presente	Rizvi y Bursey, 2014.
<i>C. karnatakaensis</i> Rizvi, 2009.	2.3–3.2	1.2–1.6	0.245–0.265	0.031–0.042	8:5:12	Ausente	Rizvi, 2009.

* Pre: antes del ano; Ad: adanal (laterales al ano); Post: después del ano.

Cuadro 8. Continuación.

Especies de <i>Cosmocercoides</i>	Caracteres morfológicos						Referencia
	Longitud Total		Espícula	Gubernáculo	Papilas rosetadas Pre:Ad:Post anal	Ala lateral	
	Hembra	Macho					
<i>C. kiliwai</i> Martínez-Salazar <i>et al.</i> , 2013,	3.87–5.71	3.05–4.81	0.36 - 0.43	0.13 - 0.15	16-20:2:1	Presente	Martínez-Salazar <i>et al.</i> , 2013.
<i>C. kumaoni</i> Arya, 1991.	-	2.0-3.0	De: 0.1 Iz:0.16	Ausente	12:1:5	Presente	Arya, 1991.
<i>C. latrans</i> Draghi, Drago y Lunaschi, 2020.	2.63-4.59	1.48-2.68	0.095 - 0.154	Ausente	3-4:0:0	Presente	Draghi <i>et al.</i> , 2020.
<i>C. lanceolaltu</i> Rao, 1979.	-	1.4	0.21	0.076	5:1:1	Presente	Rao, 1979.
<i>C. lilloi</i> Ramallo, Bursey y Goldberg, 2007.	5.23–6.40	2.02	0.1	Ausente	1:0:4	Ausente	Ramallo <i>et al.</i> , 2007.
<i>C. malayensis</i> Bursey, Goldberg y Grismer, 2015.	4.22–5.20	3.14–3.84	0.146 - 0.159	0.079 - 0.104	13:1:3	Presente	Bursey <i>et al.</i> , 2015.
<i>C. microhylae</i> (Wang, Zhao y Chen, 1978) Baker, 1987.	-	2.2	0.14	Ausente	10:0:0	Presente	Wang <i>et al.</i> , 1978.

* **Pre:** antes del ano; **Ad:** adanal (laterales al ano); **Post:** después del ano.

Cuadro 8. Continuación.

Especies de <i>Cosmocercoides</i>	Caracteres morfológicos						Referencia
	Longitud Total		Espícula	Gubernáculo	Papilas rosetadas Pre:Ad:Post anal	Ala lateral	
	Hembra	Macho					
<i>C. multipapillata</i> Khera, 1958.	-	5.8-6.4	0.20 - 0.24	0.13 - 0.14	11-14:1:4	Presente	Khera, 1958.
<i>C. nainitalensis</i> Arya, 1979.	-	4.9-5.5	De: 0.13 Iz: 0.151	0.1 - 0.12	13-16:1:6	Presente	Arya, 1979.
<i>C. oligodentis</i> Wang <i>et al.</i> , 1981.	-	2.6	0.112	0.045	8:0:0	Presente	Wang <i>et al.</i> , 1981
<i>C. pulcher</i> Wilkie, 1930.	-	6.9	0.247	0.143	14-15: 2:1	Ausente	Wilkie, 1930.
<i>C. qingtianensis</i> Chen <i>et al.</i> , 2018.	8.20 - 10.8	6.30 - 8.00	0.272 - 0.340	0.126 - 0.175	12-14:0:1	Presente	Chen <i>et al.</i> , 2018.
<i>C. ranae</i> Wang <i>et al.</i> , 1981.	-	2.4	0.192	0.105	10:0:0	Presente	Wang <i>et al.</i> , 1981.
<i>C. rickae</i> Ogden, 1966.	3.56 - 4.94	3.07	0.168	0.121	14:1:3	Presente	Ogden, 1966.

* Pre: antes del ano; Ad: adanal (laterales al ano); Post: después del ano.

Cuadro 8. Continuación.

Especies de <i>Cosmocercoides</i>	Caracteres morfológicos						Referencia
	Longitud Total		Espícula	Gubernáculo	Papilas rosetadas Pre:Ad:Post anal	Ala lateral	
	Hembra	Macho					
<i>C. sauria</i> Ávila, Strussmann y da Silva, 2010.	4.7–6	1.3	0.103	0.096	4:0:0	Presente	Ávila <i>et al.</i> , 2010.
<i>C. skrjabini</i> (Ivanitsky, 1940) Skrjabin y Shikhobalova, 1951.	-	-	0.212	0.21	8:0:0	Presente	Ivanitsky, 1940.
<i>C. speleomantis</i>	-	1.8–2.3	-	0.081 - 0.088	4:0:0	Presente	Ricci, 1987
<i>C. tibetanum</i> (Baylis, 1927) Baker, 1980.	-	4.5–5.0	0.58	0.188	22:0:1	Ausente	Baylis, 1927.
<i>C. tonkinensis</i> Tran, Sato y Van Luc, 2015.	5.28–5.50	4.2–5.1	0.222–0.256	0.113–0.122	12-13:1:3	Presente	Tran <i>et al.</i> , 2015.
<i>C. tridens</i> Wilkie, 1930.	4.01- 6.42	2.7–4.9	0.27 – 0.53	0.096 – 0. 146	11-15:0:3	Presente	Hasegawa, 1989.

* Pre: antes del ano; Ad: adanal (laterales al ano); Post: después del ano.

Cuadro 8. Continuación.

Especies de <i>Cosmoceroides</i>	Caracteres morfológicos						Referencia
	Longitud Total		Espícula	Gubernáculo	Papilas rosetadas Pre:Ad:Post anal	Ala lateral	
	Hembra	Macho					
<i>C. variabilis</i> (Harwood, 1930) Travassos, 1931.	-	2.2–5.0	0.25 – 0.42	0.11– 0.16	12-18:0: 1:3	Presente	Harwood, 1930.
<i>C. wuyiensis</i> Liu <i>et al.</i> ,2019.	3.34 - 4.37	1.94 - 3.22	De: 0.15-0.16 Iz: 0.18 - 0.20	0.054 - 0.10	9-12:0:1:3	Presente	Liu <i>et al.</i> ,2019.

* Pre: antes del ano; Ad: adanal (laterales al ano); Post: después del ano.

Cosmocercidae gen. sp. 1 (Fig. 19)

Descripción: Nematodos blancos, pequeños y robustos. Boca con tres labios; labio dorsal con dos papilas, cada labio ventrolateral con una papila y un gran anfidio (Fig. 20A). Poro excretor a nivel o ligeramente anterior al bulbo esofágico. Presencia de ala lateral iniciando en el primer tercio del esófago hasta el ano. Prodélfas, vulva localizada ecuatorialmente o ligeramente post-euatorial. Huevos ovalados y en varios estados del desarrollo. Cola cónica en su inicio, estrechándose formando un filamento.

Hembras: (38 ejemplares). Longitud total del cuerpo 2.49 ± 0.40 (1.1-3.25); ancho en cuerpo medio 0.17 ± 0.02 (0.12-0.20). Largo del esófago 0.30 ± 0.03 (0.23-0.38), en algunos organismos se encontraba retraído (Fig. 20B). Bulbo esofágico 0.07 ± 0.01 (0.06-0.10) de largo, 0.08 ± 0.01 (0.06-0.10) de ancho. Poro excretor y anillo nervioso (difícil de observar) 0.23 ± 0.03 (0.20-0.30) y 0.14 ± 0.01 (0.12-0.17) a región anterior, respectivamente. Presencia de ala lateral de forma simple, iniciando en primer tercio de la región cefálica hasta el ano (Fig. 21). Vulva post-euatorial, situada 1.29 ± 0.24 (0.90-1.84) de la región anterior (Fig. 20C). Prodélfica. Huevos en varios estados de desarrollo, 0.19 ± 0.01 (0.16-0.22) de largo y 0.12 ± 0.01 (0.1-0.15) de ancho. Cola cónica al comienzo y continúa estrechándose hasta formar un filamento (Fig. 20D).

Hospedero: *Incilius* sp., *I. occidentales* e *I. valliceps*

Sitio de infección: Intestino

Localidad: San Juan Amajac, Eloxochitlán (20° 43' 04" N 98° 57' 00" W)

Acalome, Metztitlán (20° 28 ' 02" N 98° 40' 18" W)

San Cristóbal, Metztitlán (20° 38' 20" N 98° 49' 44" W)

Santa Mónica, Metztitlán (20° 27' 37" N 98° 40' 17" W)

Metztitlán, Metztitlán (20° 28 ' 02" N 98° 40' 18" W)

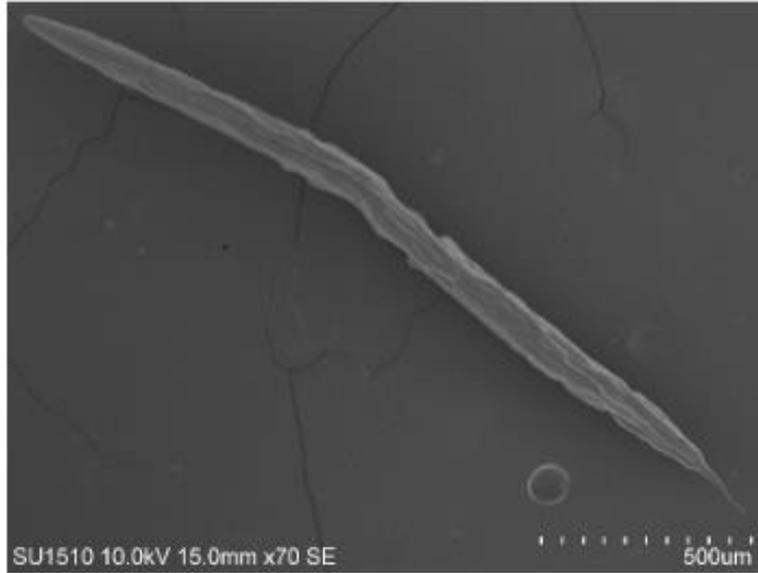


Figura 19. Micrografía de microscopio electrónico de barrido de un ejemplar hembra de *Cosmocercidae* gen sp. 1

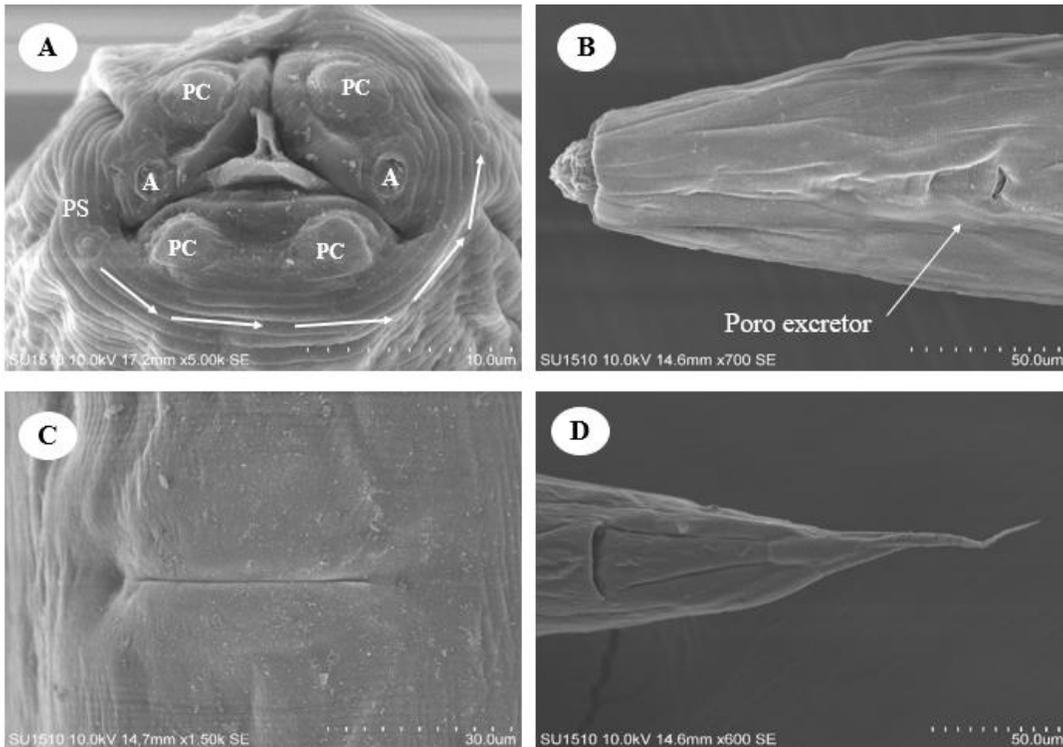


Figura 20. Micrografía de microscopio electrónico de barrido de la región cefálica de *Cosmocercidae* gen sp. 1 prevista con tres labios y la región caudal. A) Región cefálica (A=anfidos, PC=papilas cefálicas, PS=papilas somáticas) B) Vista lateral del esófago retraído y poro excretor C) Vulva D) Cola en forma de filamento.

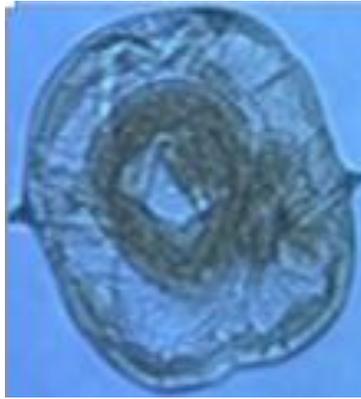


Figura 21. Corte en la región media de uno de los ejemplares hembra de *Cosmocercidae* gen sp. 1 donde se visualiza la presencia de ala lateral de forma simple.

***Cosmocercidae* gen. sp. 2 (Fig. 22)**

Descripción: Nematodos blancos, pequeños y robustos. Poro excretor anterior al bulbo esofágico. Presencia de ala lateral iniciando en el primer tercio de la región cefálica y finalizando al nivel del ano; en un corte a nivel medio del cuerpo se observa el ala con una forma simple y de tamaño pequeño. Anfidélfica, vulva ecuatorial o ligeramente post-ecuatorial. Pocos huevos, no embrionados, de forma ovalada. Cola larga en forma de filamento

Hembra: (20 ejemplares). Longitud total de 2.74 ± 0.16 (2.4-3) y un ancho máximo de 0.15 ± 0.01 (0.15-0.20). Presencia de ala lateral de forma simple iniciando en primer tercio de la región cefálica hasta el ano (Fig.22B). El esófago mide en total 0.33 ± 0.012 (0.3–0.35) de longitud; se puede observar en algunos ejemplares retraído o extendido. Bulbo esofágico 0.07 ± 0.01 (0.07) de largo, 0.088 ± 0.01 (0.08-0.1) de ancho. Poro excretor y anillo nervioso a la región anterior 0.26 ± 0.013 (0.25-0.29) y 0.17 ± 0.021 (0.15-0.20), respectivamente. Vulva ecuatorial o ligeramente post-ecuatorial, situada a 1.43 ± 0.08 (1.3-1.58) de la región anterior (Fig.22A). Anfidélficas. De 4 a 11 huevos, no embrionados, de forma ovalada, 0.19 ± 0.016 (0.16-0.22) de largo y 0.14 ± 0.028 (0.12-0.16) de ancho. Cola larga en forma de filamento.

Hospedero: *I. valliceps*

Sitio de infección: Intestino

Localidad: Acalome, Metztlán (20° 24'42"N 98° 05' 09"W)

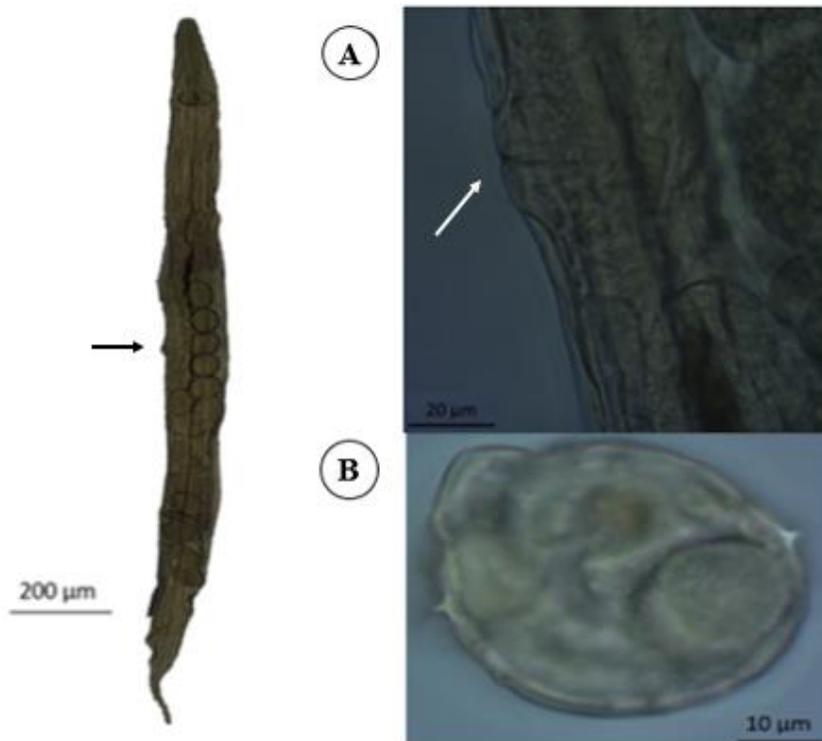


Figura 22. Hembra de Cosmocercidae gen sp. 2 A) Abertura de la vulva se encuentra a la mitad de los ejemplares o un poco más abajo B) Corte en la región media donde se visualiza la presencia de ala lateral de forma simple

Cosmocercidae gen sp. 3 (Fig. 23)

Descripción: Nematodos pequeños y robustos. Poro excretor anterior al bulbo esofágico. Presencia de ala lateral iniciando en el primer tercio de la región cefálica y finalizando al nivel del ano, en un corte a nivel medio del cuerpo se observa el ala con una forma simple y de tamaño pequeño. Anfidélfica, vulva preecuatorial. Huevos numerosos, no embrionados de forma ovalada. Cola larga y afilada (Fig 22).

Hembras: (Dos ejemplares). Nematodos fusiformes, pequeños y robustos con una longitud total de 4.13 ± 0.01 (4.12-4.15) y un ancho máximo de 0.33 ± 0.04 (0.3-0.37). Presencia de ala lateral de forma simple iniciando en primer tercio de la región cefálica hasta el ano (Fig. 23A). El esófago largo mide en total 0.49 ± 0.007 (0.49-0.50) de longitud. Bulbo esofágico 0.1 de largo y 0.1 de ancho. Distancia del poro excretor y anillo nervioso a la región anterior 0.32 ± 0.03 (0.3-0.35) y 0.22 ± 0.03 (0.2-0.25), respectivamente. Vulva preecuatorial, situada 1.72 ± 0.04 (1.69-1.75) al extremo anterior. Anfidélficas. Huevos numerosos, no embrionados, de forma ovalada de 0.10 ± 0.01 (0.1-0.11) de largo y 0.08 ± 0.007 (0.075-0.085) de ancho. Cola larga y afinada.

Hospedero: *Incilius* sp.

Sitio de infección: Intestino

Localidad: Río Blanco, Huehuetla (20° 24'42"N 98° 05' 09"W)

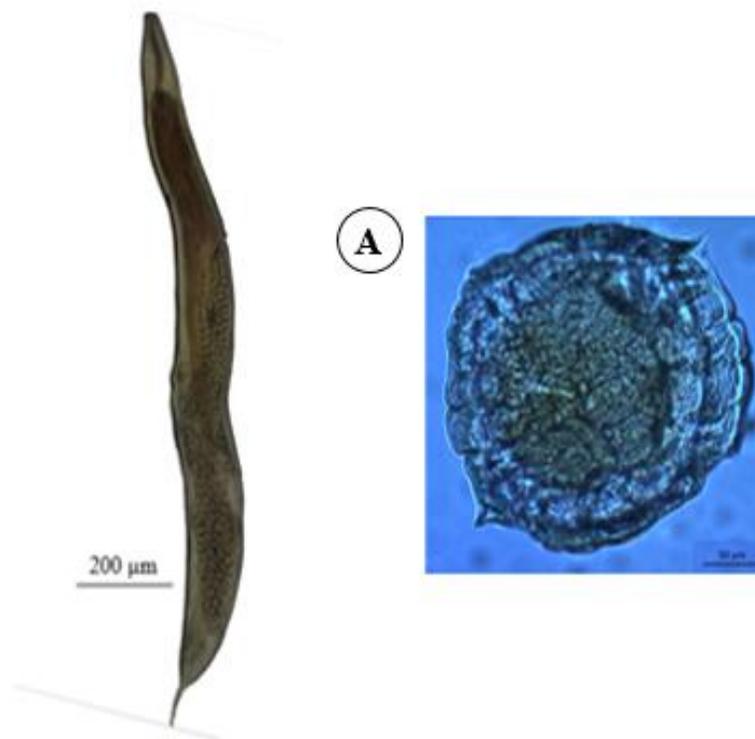


Figura 23. Hembra de Cosmocercidae gen sp. 3 A) Corte en la región media donde se visualiza la presencia de ala lateral de forma simple.

Cosmocercidae gen. sp. 4 (Fig. 24)

Descripción: Nematodos blancos, pequeños y robustos. Poro excretor anterior al bulbo esofágico. Presencia de ala lateral iniciando en el primer tercio de la región cefálica y finalizando ligeramente posterior al ano, en un corte a nivel medio del cuerpo se observa el ala con una forma simple. Prodélfas, vulva ligeramente preecuatorial o ecuatorial. Huevos ovalados. Cola larga y afinada.

Hembras: (20 ejemplares). Nematodos fusiformes, con una longitud total de 3.07 ± 0.55 (2.6-5) y un ancho en cuerpo medio 0.20 ± 0.03 (0.15-0.30). Largo del esófago 0.3 ± 0.02 (0.28-0.4), en algunos organismos la región cefálica se encontraba retraída. Bulbo esofágico 0.07 ± 0.012 (0.06-0.10) de largo y 0.08 ± 0.007 (0.08-0.10) de ancho. Distancia del poro excretor y el anillo nervioso a la región anterior es de 0.22 ± 0.042 (0.16-0.33) y 0.15 ± 0.03 (0.12-0.20) respectivamente. Presencia de ala lateral de forma simple, iniciando en primer tercio de la región cefálica, para finalizar ligeramente posterior al ano (Fig. 24A). Vulva ligeramente preecuatorial o ecuatorial, situada a 1.56 ± 0.30 (1.20-2.35) de la región anterior. Prodélficas. Huevos embrionados 0.15 ± 0.04 (0.08-0.24) de largo y 0.10 ± 0.03 (0.05-0.16) de ancho. Cola larga y afinada.

Hospedero: *Incilius* sp.

Sitio de infección: Intestino

Localidad: Río Blanco, Huehuetla (20° 24'42"N 98° 05' 09"W)

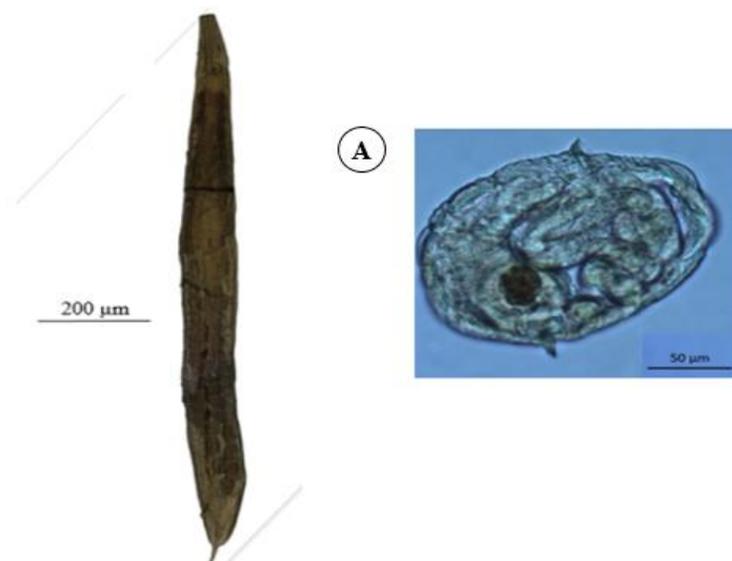


Figura 24. Hembra de Cosmocercidae gen sp. 4 A) Corte en la región media donde se observa la presencia de ala lateral de forma simple.

Cosmocercidae gen. sp. 5 (Fig. 25)

Descripción: Nematodos blancos y robustos. Poro excretor anterior al bulbo esofágico. Presencia de ala lateral, ventral y dorsal, en un corte a nivel medio del cuerpo se observa el ala con una forma simple. Vulva ligeramente preecuatorial o ecuatorial. Huevos ovalados. Cola larga y en forma de filamento .

Hembras: (Dos ejemplares). Nematodos fusiformes, con una longitud total de 3.83 ± 0.22 (3.6-4), ancho en cuerpo medio de 0.27 ± 0.03 (0.25-0.3). Largo del esófago de 0.51 ± 0.04 (0.48-0.55). Bulbo esofágico de 0.11 ± 0.01 (0.1-0.12) de largo y 0.1 ± 0.007 (0.1-0.11) de ancho. Poro excretor a 0.36 ± 0.12 (0.28-0.45) de la región anterior. Anillo nervioso no observado. Presencia de ala lateral, ventral y dorsal, de forma simple, no se observó inicio y ni su final (Fig.25A). Vulva ligeramente preecuatorial o ecuatorial, situada a 1.78 ± 0.02 (1.77-1.8) de la región anterior. Aproximadamente 41-45 huevos de forma ovalada de 0.11 ± 0.003 (0.11) de largo 0.085 ± 0.007 (0.08-0.09) de ancho. Disposición de las ramas uterinas no observada. Cola en forma de filamento

Hospedero: *Incilius* sp.

Sitio de infección: Intestino

Localidad: Río Blanco, Huehuetla (20° 24'42"N 98° 05' 09"W)

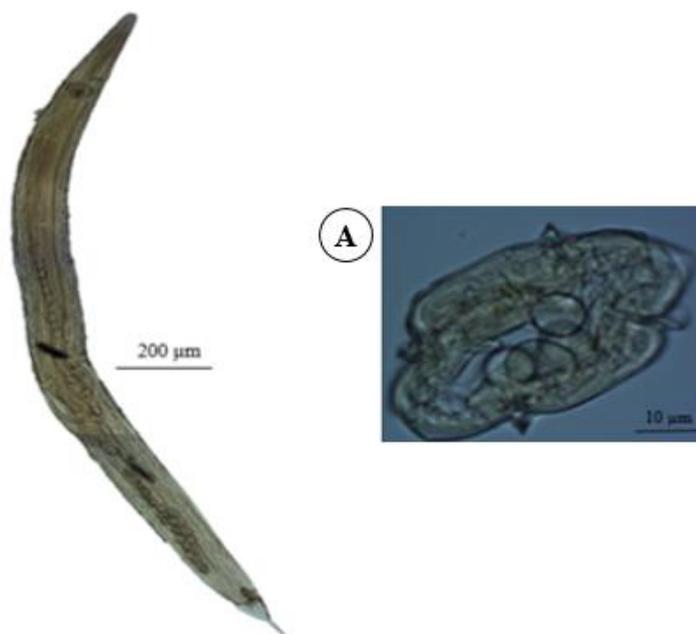


Figura 25. Hembra de Cosmocercidae gen sp. 5 A) Corte en la región media donde se observa la presencia de ala lateral, dorsal y ventral de forma simple

Comentarios Taxonómicos

Los ejemplares recolectados se asignaron a la familia Cosmocercidae por la morfología de la región cefálica, provista de tres labios. El esófago se divide en tres regiones, una faringe pequeña, corpus esofágico y bulbo (Chabaud, 1974). La familia está integrada por tres subfamilias: Austraplectaninae, Cosmocercinae y Maxvachoniinae (Hodda, 2022). Los ejemplares recolectados se asignaron a Cosmocercinae, por la ubicación de la vulva posterior al esófago, así como la ausencia de filamentos en los huevos. Los ejemplares se diferencian de la subfamilia Maxvachoniinae por la posición de la vulva (al nivel del esófago o posterior a éste); por otro lado, la subfamilia Austraplectaninae es la menos estudiada agrupando un género con dos especies que parasitan anfibios australianos; los machos presentan en su región caudal papilas pedunculares y hembras con úteros opistodélfos mientras que los organismos de este estudio, los presentan prodélficos y anfidélficos (Chabaud, 1974; Hodda, 2022; Ni, Barton y Li, 2023).

La subfamilia Cosmocercinae está integrada por 22 géneros y 228 especies: *Aplectana* Railliet & Henry, 1916 (65 especies), *Blanusia* Zapatero, Castano, Fernandez, Lopez, Martinez & Martin Rueda, 1991 (1), *Cosmocerca* Diesing, 1861 (43), *Cosmocercella* Steiner, 1924 (10), *Cosmocercoides* Wilkie, 1930 (34), *Dentinema* Moravec, Chara & Shinn, 2004 (1), *Ibrahimia* Khalil, 1932 (1), *Maracaya* Diaz-Ungria, 1964 (5), *Nemhelix* Morand & Petter, 1986 (3), *Neocosmocercella* Baker & Vaucher, 1983 (5), *Neoprotozoophaga* Biswas & Chakravarty, 1963 (2), *Neosomatiana* Anwar-ul-Islam, Farooq & Khanum, 1979 (1), *Neoxysomatium* Ballesteros-Márquez, 1945 (7), *Oxysomatium* Railliet & Henry, 1916 (15), *Palaeocosmocerca* Poinar, 2011 (2), *Paradollfusnema* Baker, 1982 (1), *Paraleptonema* Wang, 1980 (1), *Paraplesiohedruris* Bursey, Goldberg & Kraus, 2012 (2), *Parasomatium* Anwar ul-Islam, Farooq & Khanum, 1979 (1), *Pseudaplectana* Yamaguti, 1961 (1), *Raillietnema* Travassos, 1927 (18) y *Schrankiana* Strand, 1942 (9) (Hodda, 2022).

En México se han registrado cinco géneros que infectan anuros: *Aplectana*, *Cosmocerca*, *Cosmocercoides*, *Cosmocercella* y *Raillietnema* (Paredes-León *et al.*, 2008). La identificación a nivel especie para los miembros de dicha familia se basa generalmente en la morfología de la región caudal del macho (Baker, 1987; Martínez y Maggenti, 1989; Bursey *et al.* 2011). Debido a que entre los ejemplares de este estudio solo se recolectaron hembras (Cuadro 10) y considerando algunas características morfológicas (dirección del útero, número y tamaño de huevos),

Cosmocercidae gen sp. 1 y 4 podrían pertenecer a *Aplectana* o *Cosmocerca*, Cosmocercidae gen sp. 2 a *Cosmocercella* o *Raillietnema*, Cosmocercidae gen sp. 3 a *Cosmocercoides* y en caso de Cosmocercidae gen sp. 5, no fue posible llegar a ninguna deducción dado que no se observaron todas sus características (Cuadro 9).

Cuadro 9. Cuadro comparativo de los caracteres morfológicos de los géneros de Cosmocercidae reportados en anuros de México.

Caracteres y estados de carácter	Géneros				
	<i>Aplectana</i>	<i>Cosmocerca</i>	<i>Cosmocercoides</i>	<i>Cosmocercella</i>	<i>Raillietnema</i>
Dirección de útero					
• Prodélfico					
• Anfidélfico	Prodélfico	Prodélfico	Anfidélfico	Anfidélfico	Anfidélfico
• Opistodélfico					
No. de huevos	>25	>25	>25	<10	<10
• >25					
• <10					
Tamaño de los huevos	<100 µm	<100 µm	<100 µm	>100 µm	>100 µm
• >100 µm					
• <100 µm					

Cuadro 10. Caracteres morfológicos de los ejemplares hembra de la familia Cosmocercidae que parasitan el género *Incilius* en tres localidades del estado de Hidalgo.

Nematodos	Caracteres morfológicos						
	Longitud total (mm)	Ubicación de la vulva	Ala	Tamaño de huevos (mm)	Número de huevos	Dirección de úteros	Forma de la cola
<i>Aplectana</i> sp. 1	2.4 -3.1	Postecuatorial	Presente	0.14 x 0.09	7 a 44	Prodélfica	Cónica
<i>Aplectana</i> sp. 2	2.6 -6.2	Postecuatorial	Presente	0.23 x 0.16	Numerosos	Prodélfica	Cónica
<i>Cosmocercoides</i> sp.	3.75	Precuatorial	Presente	0.1 x 0.07	Numerosos	Anfidélfica	Filamento
Cosmocercidae gen. sp. 1	1.1-3.25	Postecuatorial	Presente	0.22 x 0.15	Numerosos	Prodélfica	Filamento
Cosmocercidae gen. sp. 2	2.4 – 3	Ecuatorial	Presente	0.19 x 0.14	4 -11	Anfidélfica	Filamento
Cosmocercidae gen. sp. 3	4.15	Precuatorial	Presente	0.1 x 0.07	Numerosos	Anfidélfica	Filamento
Cosmocercidae gen. sp. 4	2.6 – 5	Ecuatorial	Presente	0.15 x 0.1	20 -30	Prodélfica	Filamento
Cosmocercidae gen. sp. 5	3.6 – 4	Postecuatorial	Presente	0.11 x 0.08	41-45	No observado	Filamento

Rhabditida Railliet, 1915

Rhabdiasidae Railliet, 1916

***Rhabdias* Stiles y Hassall, 1905**

***Rhabdias* sp. (Fig. 26)**

Descripción: Nematodo robusto. Ancho máximo del cuerpo a media longitud. Cápsula bucal pequeña. Anillo nervioso en la parte media del esófago. Intestino recto de color marrón y negro, este último en la parte posterior. Vulva situada antes de la mitad del cuerpo. El útero se encuentra lleno de huevos con forma ovalada. Cola corta de forma cónica.

Hembra: (Un ejemplar). Longitud total de 9.75 y 0.38 de ancho medio. En la región anterior se encuentra la cápsula bucal. El esófago tiene una longitud de 0.34. Poro excretor no observado. Anillo nervioso en la parte media del esófago a 0.17 a región anterior. El intestino es recto y presenta una coloración oscura característica. Vulva preecuatorial a 4.5 del extremo anterior. El útero se encuentra lleno de huevos con forma ovalada de 0.17 de largo y 0.09 de ancho. Cola corta de forma cónica con punta afilada.

Hospedero: *Incilius* sp.

Sitio de infección: Pulmones

Localidad: Río Blanco, Huehuetla (20° 24'42"N 98° 05' 09"W)



Figura 26. Ejemplar hembra de *Rhabdias* sp.

Comentario taxonómico

La familia Rhabdiasidae se encuentra integrada por siete géneros de distribución cosmopolita (*Rhabdias*, *Pneumonema*, *Acanthorhabdias*, *Entomelas*, *Kurilonema*, *Neoentomelas*, *Chabirenia* y *Serpentirhabdias*) siendo parásitos pulmonares de anfibios y reptiles (Baker, 1978; Martínez-Salazar, 2008). El género *Rhabdias* fue propuesto por Stiles & Hassal (1905) e incluye actualmente alrededor de 82 especies (Hodda, 2022), 17 de las cuales se han registrado en región neártica y neotropical (Kuzmin *et al.*, 2016) y 10 en México (León-Règagnon *et al.*, 2005; Martínez-Salazar y León-Règagnon, 2007; Paredes-León, 2008; Martínez-Salazar *et al.*, 2013).

La identificación entre las especies de este género es compleja, por la ausencia de machos, además de la similitud morfológica entre especies, el escaso conocimiento sobre su especificidad hospedatoria y su distribución geográfica (Kuzmin *et al.*, 2003). Sin embargo, existen caracteres que son ampliamente usados como la forma y disposición de los labios o pseudolabios, la forma del esófago, la presencia o ausencia de corpus esofágico inflado, posición del anillo nervioso, o la posición de la vulva, la forma de la cola o la región anterior del cuerpo y cobertura cuticular a lo largo del cuerpo (Martínez Salazar, 2008). El ejemplar revisado en este estudio se incluyó en el género *Rhabdias* debido a la forma del esófago, la cápsula bucal y el intestino recto.

En *Incilius* se han reportado tres especies de dicho género: *R. americanus*, *R. fuelleborni* y *R. kuzmini*. *Rhabdias* sp. es similar a *R. americanus*, *R. fuelleborni* y *R. kuzmini* al presentar una cola de forma cónica, sin embargo difiere de todas las anteriores en la longitud total ya que el ejemplar de este estudio es más pequeño (9.75 vs 10-19.19), en la longitud del esófago que es menor (0.34 vs 0.43-0.87) y en la ubicación de la vulva que es preecuatorial y es ecuatorial en los otros (Kuzmin, 2013). Este es un nuevo registro para el hospedero y para el estado. Sin embargo, al contar solo con un ejemplar no se puede identificar a nivel especie.

Onchocercidae Leiper, 1911

***Ochoterenella* Caballero, 1944**

***Ochoterenella* sp. (Fig. 27)**

Descripción: Nematodos blancos, filiformes. Boca con dos papilas cefálicas (Fig. 28). Las hembras son de mayor tamaño que los machos. El cuerpo en ambos sexos se atenúa gradualmente en las extremidades, la región más ancha del cuerpo se localiza en la unión esófago-intestino. Presencia de estructuras cuticulares en forma bacilar distribuidas en bandas transversales a lo largo del ejemplar. El esófago está dividido en una región muscular anterior y una glandular posterior de mayor tamaño. En las hembras la vulva está ubicada antes de la unión esófago-intestino, sin protruir.

Machos: (un ejemplar y dos pedazos). Cuerpo filiforme con una longitud total 27-34; anchura a la nivel medio del cuerpo 0.24-0.36; ancho a nivel del anillo nervioso 0.10-0.15; ancho a nivel de la unión del esófago muscular-glandular 0.10-0.18. Longitud total del esófago (muscular + glandular) 1.44-1.66. Distancia del anillo nervioso al extremo anterior 0.2-0.24. Papilas caudales sésiles y mamiliformes; cuatro pares. Presencia de una placa cuticularizada ubicada antes de las papilas, difícil de observar. Espículas cortas, la izquierda es ligeramente de mayor tamaño 0.2 ± 0.07 (0.020-0.025) de largo que la derecha 0.22 ± 0.03 (0.015-0.025). Las bandas cuticulares no observadas. Protuberancias en la región posterior de forma redonda e irregularmente organizadas (Fig. 29).

Hembras: (13 ejemplares). Cuerpo filiforme con una longitud total de 42.9 ± 6.7 (33-55); ancho al nivel de anillo nervioso 0.2 ± 0.016 (0.15-0.20); ancho a nivel de la unión esófago muscular-glandular 0.22 ± 0.020 (0.15-0.21); ancho a nivel de la unión esófago-intestino 0.42 ± 0.090 (0.40-0.55); ancho a nivel medio 0.66 ± 0.12 (0.4-0.7). Longitud total del esófago (muscular + glandular) 1.58 ± 0.21 (1.16-1.9). Anillo nervioso localizado a 0.23 ± 0.03 (0.10-0.24) del extremo anterior. Vulva ubicada antes de la unión esófago-intestino, sin protruir y difícil de observar, a una distancia de 1.04 ± 0.16 (0.92-1.16) de la región anterior. Útero enrollado en la porción glandular del esófago y se extiende hasta cerca del final del cuerpo. No se observó el ano. Las bandas cuticulares al nivel de la cola poco visibles 0.003 ± 0.001 (0.0017 -0.0068) de largo, 0.0025 ± 0.005 (0.020-0.43) en la región posterior; a partir de la mitad del cuerpo hacia la región anterior las bandas se hacen más grandes 0.0120 ± 0.001 (0.009-0.013) y bien desarrolladas.

Hospedero: *Incilius* sp. e *I. valliceps*

Sitio de infección: Cavidad corporal

Localidad: San Juan Amajac, Eloxochitlán (20° 43' 04" N 98° 57' 00" W)

Río Blanco, Huehuetla. (20° 24'42"N 98° 05' 09"W)

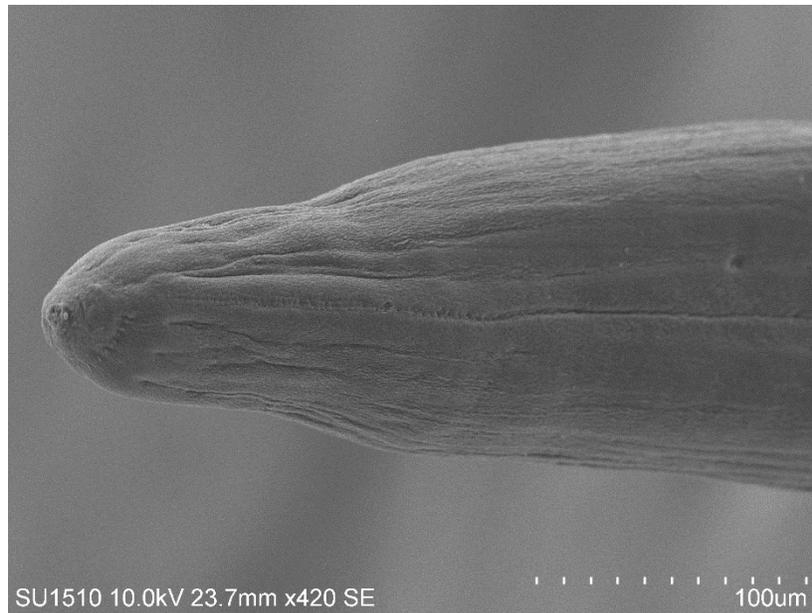


Figura 27. Vista lateral de una de las hembras de *Ochoterrella* sp.

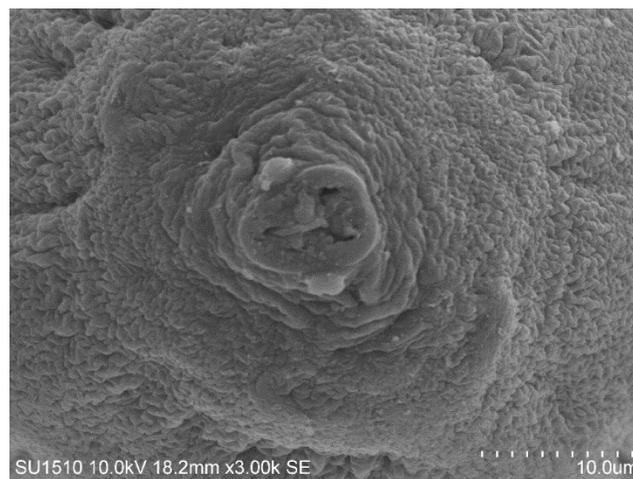


Figura 28. Papilas céfalicas presentes en una hembra de *Ochoterrella* sp.

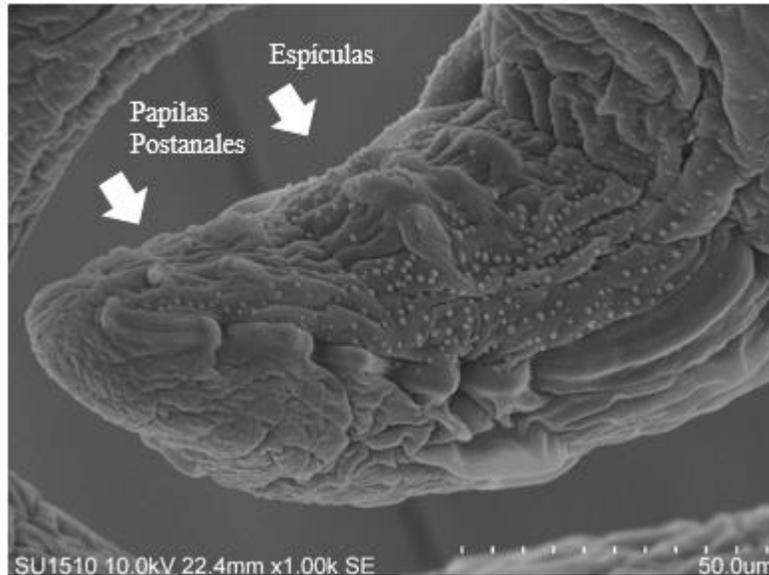


Figura 29. Región caudal de uno de los macho de *Ochoterenella* sp. donde se observa protuberancias pequeñas e irregulares, además de su disposición papilar

Comentarios Taxonómicos

La familia Onchocercidae está integrada por 5 subfamilias, 91 géneros y 737 especies (Hodda,2022), una de las subfamilias es Oswaldofilariinae que incluye la tribu Waltonellinae que abarca parásitos de la cavidad corporal de anuros, principalmente de las familias Bufonidae, Leptodactylidae, Racophoridae y Ranidae; esta tribu se compone por cuatro géneros: *Foleyellides* Caballero, 1935, *Madochotera* Bain & Brunhes, 1968, *Ochoterenella* Caballero, 1944 y *Paramadochotera* Esslinger, 1986. Los ejemplares recolectados se asignaron a tribu Waltonellinae y al género *Ochoterenella* por la presencia de estructuras cuticulares en forma bacilar en hembras y machos, la cuales están distribuidas en bandas transversales a lo largo del cuerpo, así como la ubicación de la vulva antes de la unión del esófago-intestino.

Existe un grado de similitud morfológica entre las especies de este género lo que provoca controversia en el momento de la identificación, por lo que las principales diferencias entre ellas radica en el tamaño de las estructuras cuticulares y en la disposición de la vulva (protuida o no) (Esslinger,1986). Se tiene registro de 16 especies en este género (Hodda, 2022) de las cuales 11 parasitan anuros en la Región Neotropical y solo seis de ellas se han registrado en anuros de México (*O. caballeroi*, *O. chiapensis*, *O. digiticauda*, *O. figueroai*, *O. lamothei* y *O. nanolarvata*,) (Esslinger, 1986, 1987, 1988) (Cuadro 11). Cabe destacar que la mayoría de las descripciones de

Esslinger solo toman en cuenta a las hembras (*O. chiapensis*, *O. caballeroi*, *O. lamothei* y *O. nanolarvata*), con excepción de *O. digiticauda* y *O. figueroai*.

Las hembras de *Ochoterenella* sp. son similares a *O. caballeroi*, *O. chiapensis*, *O. digiticauda*, *O. figueroai*, *O. lamonthei* y *O. nanolarvata*, al presentar la abertura de la vulva a 2/3 del esófago. Sin embargo, los ejemplares de este estudio, muestran una vulva sin protruir, lo que difiere a *O. digiticauda*, *O. chiapensis* y *O. figueroai* en las cuales es visiblemente protuida.

Ochoterenella sp. difiere de *O. caballeroi*, *O. lamonthei* y *O. nanolarvata* por tener un esófago de menor tamaño (1724- 2653 vs 1160-1900) y una anchura del cuerpo más amplio (416-594 vs 400-700), respectivamente. Por otro lado pueden diferenciarse de los machos de *O. digiticauda* y *O. figueroai* por tener una longitud del cuerpo de mayor tamaño (16.5-27 vs 27-34) y unas espículas más grandes (tanto izquierda como derecha) (I: 167-243 vs 200-250) (D: 119-147 vs 150-250), respectivamente (Cuadro 12). Sin embargo, otras estructuras como las placas cuticulares y las bandas transversales no pudieron ser comparadas, debido a los escasos ejemplares (un ejemplar completo y dos pedazos), además del mal estado del materia, lo que fue una limitante para describir la variación de los ejemplares e impidió la identificación a nivel especie.

Cuadro 11. Cuadro comparativo de las hembras de *Ochoterenella* spp. que parasitan anuros en México.

Especies de <i>Ochoterenella</i>	Longitud total	Ancho del cuerpo	Longitud del Esófago	Vulva	Posición de la vulva	Vulva saliente	Referencia
Presente estudio	33 -55	400- 700	1160-1900	920 -1160	Esófago	No	Este estudio
<i>O. digiticauda</i>	44-57	564-673	1486-2474	1020-1782	Esófago	Si	Caballero, 1944.
<i>O. caballeroi</i>	44 – 49	416 – 436	1832 – 1931	1104 – 1406	Esófago	No	Esslinger, 1987.
<i>O. nanolarvata</i>	38.8-47.9	485-594	1724-2316	1197-1960	Esófago	No	Esslinger, 1987.
<i>O. chiapensis</i>	37.7-57.6	376-624	1753-2624	881-2099	Esófago	Si	Esslinger, 1988.
<i>O. figueroai</i>	58-71	564-702	2811-3980	1683-2574	Esófago	Si	Esslinger, 1988.
<i>O. lamothei</i>	47-57	446-594	2149-2653	1554-2277	Esófago	No	Esslinger, 1988.

Cuadro 12. Cuadro comparativo de los machos de *Ochoterenella* spp. que parasitan anuros en México.

Especies de <i>Ochoterenella</i>	Longitud total	Ancho del cuerpo	Longitud del esófago	Espícula		Papilas caudales		Referencias
				D	I	Pre	Post	
Presente estudio	27 – 34	240 – 360	1440 – 1660	150-250	200 -250	1	1+1+1	Este estudio
<i>O. digiticauda</i>	16.5 – 24.1	267 – 366	1287 – 1832	119-146	167-240	1	1+1+1	Esslinger, 1986.
<i>O. figueroai</i>	22 – 27	276 – 376	1796 – 2604	120-147	178-243	1	1+1+1	Esslinger, 1988.

7.2 Caracterización de la infección

El número de individuos recolectados para los diferentes taxones corresponde en primer lugar a *Cosmocercidae* gen. sp. 1, seguido de *Aplectana* n.sp. 2, *Ochoterenella* sp., *Cosmocercidae* gen sp. 4, *Aplectana* n.sp. 1, *Cosmocercidae* gen sp. 2, 3, 5, *Cosmocercoides* sp. y *Rhabdias* sp.

En los municipios muestreados, la prevalencia (40%), la abundancia (49.7) e la intensidad (124.25) más altas fueron encontradas en Metztlán por *Cosmocercidae* gen sp. 1. En Huehuetla, la prevalencia más alta fue de 14.28% para los taxones *Cosmocercoides* sp., *Cosmocercidae* gen sp. 2, 3, 4, 5, *Rhabdias* sp. y *Ochoterenella* sp., mientras que la abundancia mayor fue de 7.14 y la intensidad 105 para *Cosmocercidae* gen sp. 4. *Rhabdias* sp. presentó la abundancia e intensidad más baja de los tres municipios con 0.14 y 1, respectivamente. En Eloxochitlán, la prevalencia más alta (33.33%) fue presentada por 2 especies: *Ochoterenella* sp. y *Cosmocercidae* gen sp. 1; así mismo este último taxón presentó la abundancia (17.33) e intensidad (52) mayor.

En general, la prevalencia (25%), la abundancia (27.45) y la intensidad (109.8) más altas fue fueron para *Cosmocercidae* gen sp. 1; por el contrario, la prevalencia más baja se registró en varios taxones *Aplectana* n.sp. 1, *Cosmocercoides* sp. *Cosmocercidae* gen sp. 3,4,5 y *Rhabdias* sp. (5%). La abundancia e intensidad menor fue para *Rhabdias* sp. con 0.05 y 1 respectivamente (Cuadro 13).

Cuadro 13. Caracterización de la infección de los nematodos registrados en el género *Incilius* en tres localidades del estado de Hidalgo.

Taxas	Municipios									
	Número de Individuos	Eloxochitlán			Huehuetla			Metztitlán		
		P	A	I	P	A	I	P	A	I
<i>Aplectana</i> n.sp. 1	26							10%	2.6	26
<i>Aplectana</i> n.sp. 2	76							20%	7.6	38
<i>Cosmocercoides</i> sp.	2				14.28%	0.28	2			
<i>Cosmocercidae</i> gen. sp. 1	497 (M) 52(E)	33.33%	17.33	52				40%	49.7	124.25
<i>Cosmocercidae</i> gen. sp. 2	5				14.28%	0.71	5			
<i>Cosmocercidae</i> gen. sp. 3	2				14.28%	0.28	2			
<i>Cosmocercidae</i> gen. sp. 4	50				14.28%	7.14	50			
<i>Cosmocercidae</i> gen. sp. 5	2				14.28%	0.28	2			
<i>Rhabdias</i> sp.	1				14.28%	0.14	1			
<i>Ochoterenella</i> sp.	38 (E) 17 (RB)	33.33%	12.66	38	14.28%	2.42	17			

*A= Abundancia I= Intensidad P= Prevalencia

7.3 Análisis multivariado

La prueba de Mardia a la que se sometieron los datos estandarizados no presentaron una distribución normal, con valores de **M**: 111.3 , **p**: 3.95E-73, **Kurtosis**: 282.1 y **Esfericidad**: 680; se ajustó a un modelo omnibus de Doornik y Hansen (**Ep**: 815.2 y una **p**: 4.02E-152).

La PERMANOVA general arrojó un valor de F: 151.7 con una p: 0.0001. Los valores de F y p que se obtuvieron con distintas PERMANOVAS, mostrando diferencias significativas cuando se excluían las variables de longitud de esófago (LE), papilas en la vulva (PV), dirección de ramas uterinas (DU), tipo de ala (TA), ubicación de la vulva (UV) y forma de la cola (FC), siendo los que presentaron una F con un valor menor al de la prueba general (Cuadro 14).

Cuadro 14. Valores de F y p obtenidos de las pruebas de PERMANOVAS.

Atributos	F	P
Total (todos los atributos)	151.7	0.0001
Longitud del Esófago (LE)	148.2	0.0001
Papilas en la Vulva (PV)	134.3	0.0001
Dirección de las ramas uterinas (DU)	131.7	0.0001
Tipo de Ala (TA)	128.8	0.0001
Ubicación de la Vulva (UV)	118.1	0.0001
Forma de la Cola (FC)	110.9	0.0001
Número de Huevos (NH)	161.1	0.0001
Ancho de1 Huevo (AH)	166.2	0.0001
Longitud de Huevo (LH)	164	0.0001
Anillo Nervioso (AN)	164.8	0.0001
Poros Excretor (PE)	156.4	0.0001
Longitud del Bulbo (LB)	187.6	0.0001
Ancho del Bulbo (AB)	174.6	0.0001
Ancho Medio (AM)	178	0.0001
Longitud Total	178.8	0.0001

El análisis de coordenadas principales (PcoA) mostró divergencias significativas en cinco grupos, ubicando a Cosmocercidae gen sp. 1, 2 y 4 en el cuadrante 1 eje X y *Aplectana* n.sp. 1 y 2 en el cuadrante cuatro y dos respectivamente. Por otra parte, *A. incerta* y *A. itzocanensis* formaron un solo grupo (Figura 30).

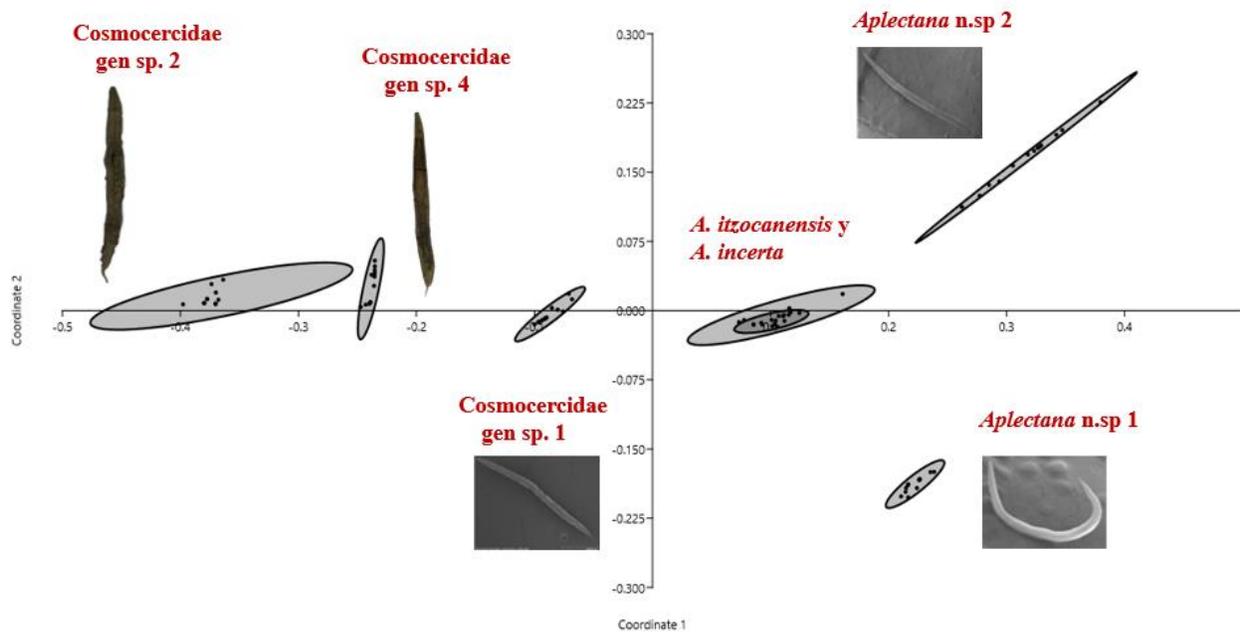


Figura 30. Análisis de coordenadas principales a partir de distancia Gower considerando los atributos: longitud del esófago, dirección de las ramas uterinas, forma de la cola, tipo de ala, papilas en la vulva y ubicación de la vulva.

7.4 Estudio molecular

7.4.1 Reconstrucción filogenética y distancias genéticas

El análisis filogenético y el cálculo de las distancias genéticas se realizó a partir de una matriz de 1582 pb, resultado de la combinación de 857 pb del gen 18s y 725 pb del gen 28s. La matriz se conformó con 21 secuencias, dos de ellas de *Aplectana* n.sp. 2 y dos de Cosmocercidae gen sp. 1 que se describen en este estudio y parasitan a *Incilius valliceps*. Mientras que las secuencias restantes fueron obtenidas en genbank y corresponden a taxones del género *Aplectana*, *Cosmocerca* y *Cosmocercoides* que integran la familia Cosmocercidae. Las secuencias de *Falcaustra* sp. y *Cruzia americana* se utilizaron como grupos externos.

El análisis filogenético realizado con los métodos de inferencia bayesiana y máxima verosimilitud, dieron como resultado árboles con la misma topología, en la que se observan cuatro grupos (Figura 31).

El grupo I (PP=1, BT=94) está integrado por las tres especies del género *Cosmocercoides* y una del género *Cosmocerca* incluidas en este estudio, *C. pulcher*, *C. qingtianensis*, *C. tonkinensis* y *Cosmocerca longicauda* que parasitan anfibios, moluscos y reptiles en Asia. Es el grupo basal dentro de la familia Cosmocercidae y hermano del resto de las especies consideradas en el estudio.

El grupo II (PP=1, BT=100) está conformado por *Aplectana* n.sp. 2 de las localidades de Acalome y San Cristóbal, taxón identificado en este estudio, que presenta una relación de grupos hermanos con el clado que forman los grupos III y IV, integrado por varias especies de *Cosmocerca* y *Aplectana*.

El grupo III (PP=1, BT=100) está formado por dos especies de *Aplectana*, *A. dayaoshanensis* y *A. xishuangbannaensis*, parásitos de anfibios en China y es el grupo hermano del clado IV.

En el grupo IV se encuentran varias especies del género *Cosmocerca* (*Cosmocerca* sp. 1 y 2, *C. ornata*, *C. goroensis*, *C. simile*, *C. daly*, *C. monicae* y *C. makhadoensis*) parásitos de anuros de Asia y África, además de una especie del género *Aplectana* (*A. chamaeleonis*) parásito de anfibios y peces de África y Alemania, y Cosmocercidae gen sp. 1, taxón identificado en este estudio.

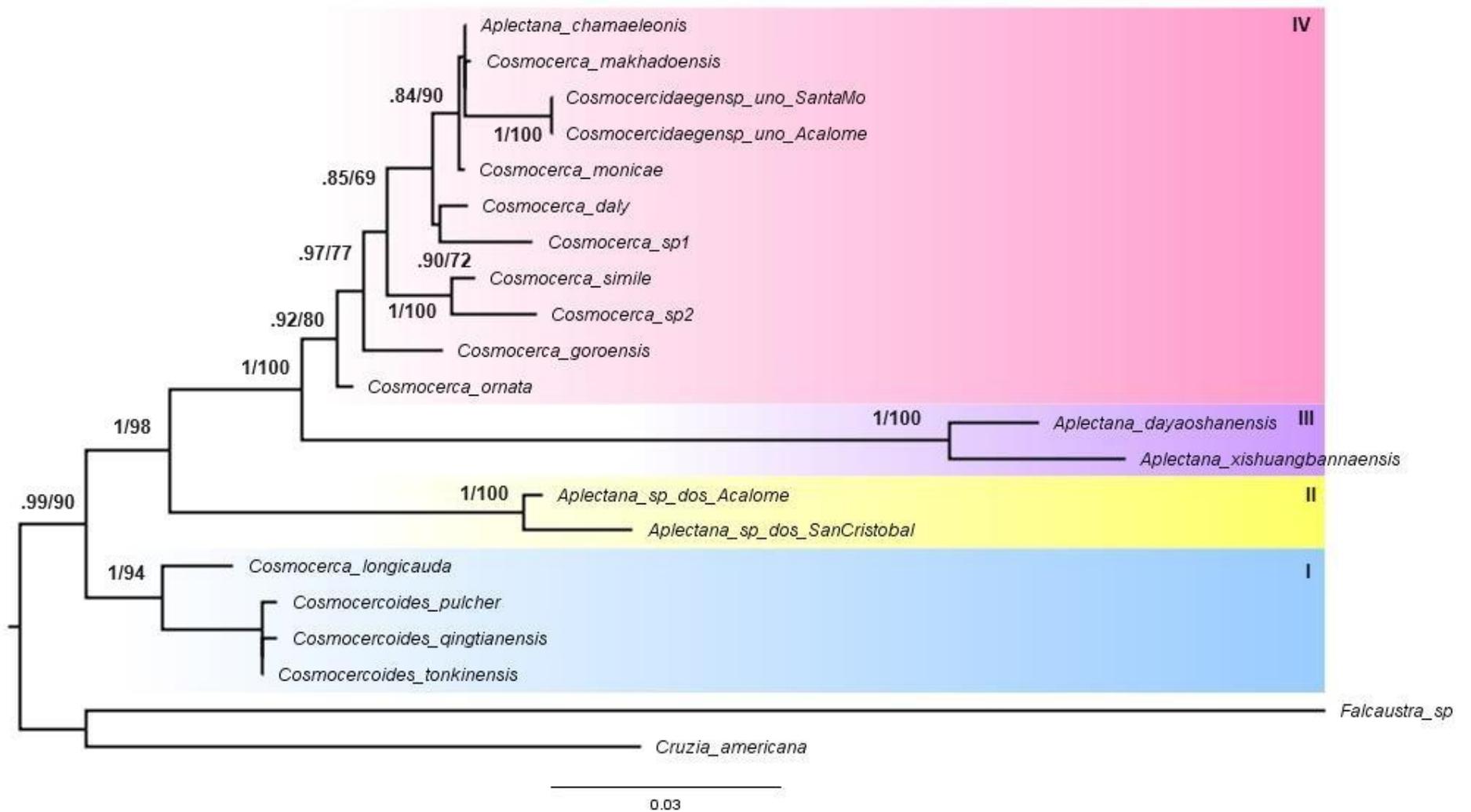


Figura 31. Árbol filogenético de especies de la familia Cosmocercidae parásitos de anfibios y reptiles. En las ramas, se muestran los valores de Probabilidad Posterior / Bootstrap.

Las distancias genéticas entre los cuatro grupos de cosmocercidos recuperados en la filogenia varió entre los 11.85 y 24.01%. El valor de divergencia más bajo se presentó entre el Grupo I y II al igual que el Grupo I y IV (11.85%), mientras que la distancia genética mayor, fue entre el Grupo II y III (24.01%). La distancia dentro de los grupos fue de 1.89% en el Grupo I, 1.84% en el Grupo II, 6.03% en el Grupo III y 3.24% en Grupo 4 (Cuadro 15).

Cuadro 15. Matriz de distancias promedio dentro (diagonal) y entre los grupos (por debajo de la diagonal) obtenidos en el análisis filogenético de la familia Cosmocercidae.

	I	II	III	IV
Grupo I <i>Cosmocercoides pulcher</i> , <i>C. tonkinensis</i> y <i>C. quinqtianensis</i>	1.89			
Grupo II <i>Aplectana n.sp.</i> y <i>n. sp.dos</i> (Este estudio)	11.85	1.84		
Grupo III <i>Aplectana dayaoshanensis</i> y <i>A. xishuangbannaensis</i>	23.79	24.05	6.03	
Grupo IV <i>Cosmocerca</i> sp. 1 y 2, <i>C. ornata</i> , <i>C. goroensis</i> , <i>C. simile</i> , <i>C. daly</i> , <i>C. monicae</i> , <i>C. makhadoensis</i> , <i>A. chamaeleonis</i> , Cosmocercidae gen sp. uno Santa Monica y Acalome. (estas últimas de este estudio)	11.85	13.37	19.76	3.24

VIII. DISCUSIÓN

8.1 Nematofauna que parasita al género *Incilius* en Hidalgo y sus parámetros ecológicos

La nematofauna que parasita el género *Incilius* en los sitios de estudio se conforma por 10 taxones: ocho de ellos pertenecen a la familia Cosmocercidae (dos especies de *Aplectana*, *Cosmocercoides* sp. y cinco morfotipos identificados como Cosmocercidae gen sp.), *Rhabdias* sp. y *Ochoterenella* sp.

Al comparar los registros con los estudios previos de *Incilius* spp (cuadro 2), se observa, que distintos taxones de los mismos géneros descritos en este trabajo han sido reportados previamente en otras regiones de México. Como es el caso de *Aplectana* sp., registrada previamente en *I. nebulifer* en Nuevo León (Martínez-Villarreal, 1969), *I. occidentalis* en Veracruz (Galicia-Guerrero et al., 2000) e *I. marmoreus* en Oaxaca (Trejo-Melendez et al., 2019), *Cosmocercoides* sp., registrada en *I. nebulifer* en Nuevo León (León-Règagnon et al., 2005), *Ochoterenella* sp. y *Rhabdias* sp., reportadas en *I. valliceps* en Veracruz (Guillén-Hernández, 1992; Galicia-Guerrero et al., 2000).

Con base en lo anterior, el presente trabajo aporta ocho nuevos registros (dos de ellos especies nuevas) para *Incilius* sp., *I. occidentalis* e *I. valliceps* y para los sitios de estudio. Además de ampliar la distribución de *Ochoterenella* sp. y *Rhabdias* sp., ya que ninguno de estos taxones había sido registrado en el estado de Hidalgo. La identificación de dichas especies contribuye al conocimiento de la biodiversidad a nivel mundial y particularmente de la riqueza de nematodos en Hidalgo. En México, los estados donde la nematofauna de anuros de *Incilius* están mejor representada son Quintana Roo (8 especies), Oaxaca (6), Sonora (5), Veracruz (5), Yucatán (3), Jalisco (3), Nuevo León (2) y Querétaro (2) (Paredes-León et al., 2008; Terán-Juárez, 2011; Trejo-Meléndez et al., 2019), por lo tanto el resto de las regiones donde habitan estos anuros no están bien representadas causando una asimetría en el conocimiento, dejando una puerta abierta para nuevos estudios parasitológicos.

Comocercidae gen sp. 1 y *Ochoterenella* sp. son los únicos organismos que se encontraron en dos localidades. En el primer caso, en Metztitlán y Eloxochitlán, lo que puede deberse a que en ambos sitios se ubican en el Altiplano Mexicano compartiendo condiciones muy similares, por ejemplo, el clima árido. En el segundo caso, en las localidades de

Eloxochitlán y Huehuetla los cuales no comparten condiciones climáticas parecidas (árido vs subtropical), sin embargo, es probable que estos nematodos tengan una historia antigua de asociación por coevolución con este grupo de hospederos (Weaver *et al.*, 2016).

El municipio con mayor número de especies fue Huehuetla con siete taxones, seguido de Metztitlán (3) y por último el Eloxochitlán (2); esta disparidad puede atribuirse a diversos factores, como la temporada de muestreo, pues se ha observado que la carga helmintológica (número de individuos) por especie, así como la riqueza específica puede variar con base en la temporada en que se recolecten los hospederos (Thomas, 1965; Rodríguez, 2009). De igual forma, este parámetro puede variar debido a la cualidad de agregación que muestran los parásitos, donde una gran cantidad de hospederos alberga un número pequeño de parásitos, mientras que un número pequeño de hospederos alberga la mayor parte de los parásitos (Bautista-Hernández *et al.*, 2015).

En cuanto a los parámetros de infección, los valores más altos de prevalencia, abundancia e intensidad en Metztitlán los presentó el taxón Cosmocercidae gen sp. 1, estos resultados se pueden atribuir al ciclo de vida directo de los cosmocercidos, la infección del hospedero se lleva a cabo por medio del contacto directo con heces (auto-infección) o del medio terrestre con presencia de larvas que posteriormente penetran la piel (Anderson, 2000), esto incrementa el potencial infectivo de estos parásitos pues facilita su entrada y reduce el tiempo de transmisión que se perdería si existiera un hospedero intermediario, además, los hábitos predominantemente terrestres del sapo incrementan las probabilidades de infectarse al estar en contacto directo con el medio donde las larvas se desarrollan (López *et al.*, 2009).

Ochoterenella sp. mostró la prevalencia más alta en Eloxochitlán (33.33%) y en Huehuetla (14.28%), la presencia de estos parásitos dependen directamente de la transmisión por la picadura de un vector díptero. La baja prevalencia en Huehuetla puede deberse a la temporada de colecta, o bien a la ausencia de cuerpos de agua que favorezcan la reproducción del vector. En el caso del Eloxochitlán, la prevalencia alta puede verse influenciada por la cantidad de hospederos recolectados (Pulido-Flores *et al.*, 2009), los cuales fueron pocos a comparación de las otras localidades (3 vs 7 y 10).

Los valores más bajos de abundancia se presentaron en Huehuetla por taxones de *Cosmocercoides* sp., Cosmocercidae gen sp. 2,5 y *Rhabdias* sp., en los cuales únicamente se registraron uno o dos individuos por sapo. Esta baja abundancia puede deberse a que los

sapos tenían poco tiempo de infectados cuando fueron recolectados, lo que evitó que los parásitos siguieran su ciclo de vida. Así mismo, puede tratarse de parásitos sensibles a cambios estacionales o la ausencia de sus hospederos intermediarios, en caso de *Cosmocercoides* sp.

Finalmente, los taxones de familia Cosmocercidae mostraron una dominancia en este estudio, similar a lo reportado por Bursey y Brooks (2010) en Costa Rica (Cuadro 1) y contrario a lo encontrado en estudios previos en México donde la dominancia la presentan especies de Molineidae y Rhabdiasidae. Lo que puede estar influenciados por los hábitos terrestres de los hospederos (sapos) quienes pueden incidir en la presencia de los parásitos que los infectan, en este caso, la mayoría de ciclo directo, ya que aquellos que necesitan un hospedero intermediario (molusco, artrópodo, etc.) dependen directamente de los cuerpos de agua donde residen y presentan una dominancia de parásitos con ciclos de vida indirecto (Barton, 1997; Pérez-Ponce de León *et al.*, 2000).

8.2 Variación entre las hembras de la familia Cosmocercidae

De los 15 atributos analizados en las hembras de los distintos taxones, destacaron seis de ellos: dirección de las ramas uterinas, forma de la cola, ubicación de la vulva, longitud del esófago, tipo de ala y papilas en la vulva, que son los que permiten establecer la divergencia entre los taxones utilizados e identificados como *Aplectana* n.sp. 1, *Aplectana* n.sp. 2, Cosmocercidae gen sp. 1, 2 y 4. La dirección de las ramas uterinas ya se había considerado como una característica importante para diferenciar a los géneros dentro de la familia Cosmocercidae en las claves taxonómicas generadas por Chabaud (1974).

La forma de la cola, la ubicación de la vulva, el tipo de ala y las papilas en la vulva son atributos significativos en este estudio, debido a que fueron variables entre los taxones analizados, sin embargo, en las claves taxonómicas (Chabaud, 1974) y en descripciones de otras especies de cosmocercidae no son caracteres relevantes o tomados en cuenta para las diagnósis. No obstante, la observación de esta clase de atributos cualitativos puede enriquecer las descripciones taxonómicas y permiten la identificación de nuevas especies, como fue en el caso de *Cosmocerca acanthurum*, dónde se detectó la presencia de espinas en la región posterior de las hembras, el cual es un atributo es exclusivo de la especie y permitió la

diferenciación con el resto de las especies del género (Falcón-Ordaz y colaboradores, 2007).

La longitud de esófago es un atributo significativo para diferenciar a los taxones de los géneros *Aplectana* y *Cosmocerca* de este estudio, ya que los ejemplares de *Aplectana* presentan un esófago significativamente mayor que los de *Cosmocerca*, lo que es consistente con lo mencionado por Falcón-Ordaz y colaboradores (2010) quienes llegaron a la misma conclusión.

El análisis morfológico aunado a lo obtenido en la prueba de PERMANOVA sugiere que los taxones identificados como Cosmocercidae gen. sp. 1 y 4 podrían ser de los géneros *Aplectana* o *Cosmocerca*, mostrando diferencias entre ellas por la forma de la cola y la longitud total del cuerpo. En el caso de Cosmocercidae gen. sp. 2 las características podrían pertenecer a *Cosmocercella* o *Raillietnema* al presentar un útero anfidélfico (Cuadro 10). Sin embargo, es difícil llegar a una identificación correcta debido a la ausencia de machos, pues ellos poseen de los caracteres diagnósticos. La relevancia de los atributos cualitativos encontrados en este trabajo podrían ser de utilidad para las descripciones de ejemplares hembras de Cosmocercidae.

El PcoA nuestro mostró la separación de las hembras de Cosmocercidae en seis grupos, cinco de ellos conformados por los taxones descritos en este estudio y el sexto integrado por las hembras de *A. incerta* y *A. itzacanensis*, las cuales muestran una posible sinonimia debido a la poca variación entre sus atributos, lo que difiere con las descripciones previas de estos organismos (Baker, 1985; Bautista-Guzmán *et al.*, 2006; Velázquez-Urrieta *et al.*, 2014) quienes mencionan que a pesar del parecido entre las hembras, los caracteres del tamaño y número de huevos permiten la diferenciación entre ellas, sin embargo, en este estudio esos caracteres no fueron significativos.

Diversos trabajos en nematodos, han utilizado los análisis de estadística multivariada con la finalidad de diferenciar especies (Di Deco *et al.*, 1994; Digiani *et al.*, 2015; Beveridge *et al.*, 2021) y corroborar la variabilidad morfológica (González *et al.*, 2019; Borba *et al.*, 2021; Souza *et al.*, 2022). No obstante, usan caracteres de hembras y machos, siendo pocos los que solo se llevan a cabo en hembras como en el presente estudio. Los atributos usados para los análisis dependen de las familias o géneros analizados, aunque en la mayoría se comparan la longitud total, ubicación de la vulva y características de los huevos. Por ejemplo,

Borba y colaboradores (2021) utilizaron los atributos de los huevos en un análisis de discriminantes para separar 28 especies de 8 géneros de la familia Capillaridae, por otra parte, Kirillova y colaboradores (2021) usaron la comparación de medias en un estudio en ejemplares de *Oswaldocruzia filiformis* que parasitan 10 hospederos anuros de 15 localidades en la Rusia europea, se examinaron los atributos del número de crestas, alas laterales, forma y estructura de la espícula, de la bursa y de rayo dorsal en machos, y la ubicación de la vulva, ancho y largo de huevos en hembras, con el fin de evaluar las variaciones intraespecíficas. Mientras que Harnoster y colaboradores (2022), realizaron un análisis de discriminantes en machos y hembras de tres especies de *Cosmocerca* que se encontraban parasitando un mismo hospedero, analizando los atributos de longitud total, ubicación de la vulva, tamaño y número de huevos, atributos que también son utilizados en este estudio, además de la disposición del arreglo papilar en machos. Entre los pocos estudios morfométricos donde se usa la estadística uni y multivariada de los que se tiene registro que se han llevado a cabo únicamente en hembras, son los realizados por Esslinger (1987;1988) quien elaboró claves taxonómicas para cinco especies nuevas de filarias pertenecientes al género *Ochoterenella* con ausencia de machos, basándose solo en medidas morfométricas y algunos atributos cualitativos. Aquino-Camacho y colaboradores (2024) al igual que en este estudio, utilizaron un análisis de PERMANOVA considerando 11 características morfológicas en hembras de *Syphacia peromysci* que parasitan roedores, con el propósito de corroborar si las poblaciones pertenecen a la misma especie.

8.3 Análisis filogenético y distancia genética

La reconstrucción filogenética basada en los genes 18s y 28s permitió conocer la posición de *Aplectana* n.sp 2 y *Cosmocercidae* gen sp. 1 dentro de la familia *Cosmocercidae*. Las relaciones encontradas difieren de las obtenidas en una filogenia preliminar basada en los genes 18s e ITS (que no cuenta con representantes de *Aplectana*) (Sinsch *et al.*, 2020) y de la clasificación tradicional, la cual ha sido propuesta basándose en caracteres morfológicos y rasgos ecológicos. Wilkie (1930), Skrjabin *et al.* (1961) y Chabaud (1974) distinguieron los géneros *Cosmocerca* y *Cosmocercoides* por la presencia de papilas modificadas, presencia de papilas rosetadas y plectanas en *Cosmocerca*, y papilas en roseta únicamente en *Cosmocercoides*, los diferentes autores señalaron que ambos grupos se encontraban

estrechamente relacionados. Sin embargo, el análisis realizado en este estudio mostró una relación más cercana entre ejemplares de los géneros *Aplectana* (que presenta papilas simples) y *Cosmocerca*, que no forman grupos exclusivos y en conjunto, forman el grupo hermano del género *Cosmocercoides*. Sin embargo, esto es congruente con lo obtenido por Chen *et al.*, (2021) y Harnoster *et al.*, (2022) quienes al igual que en este estudio, trabajaron con secuencias concatenadas de los genes 18s+28s obteniendo, en el primer caso, una filogenia de la superfamilia Cosmocercoidea con una topología similar a la obtenida en el presente estudio (Ver fig. 6) y el segundo una reconstrucción preliminar de la subfamilia Cosmocercinae (Ver fig. 7). En el trabajo de Chen *et al.*, (2021) y en este estudio se observa que las relaciones de los géneros que forman la familia Cosmocercidae son como las presentadas en la Figura 30, ((*Aplectana* + *Cosmocerca*) (*Cosmocercoides*)).

Como se mencionó antes, los resultados rechazan la monofilia del género *Aplectana*, dado que *A. chamaeleonis* se agrupa con un taxón de *Cosmocerca*, lo cual sugiere que las características que se utilizó tradicionalmente para separar a los géneros y principalmente para diagnosticarlos (presencia o no de papilas en forma de roseta) representan caracteres homoplásicos, lo que sería válido si la determinación de *A. chamaeleonis* es correcta, debido a que Chen y colaboradores (2021) comparten la secuencia pero no una descripción del individuo. Asimismo, el agrupamiento de *Cosmocerca longicauda* con *Cosmocercoides pulcher*, *C. qingtianensis* y *C. tonkinensis* descartó la monofilia del género *Cosmocercoides*, lo que difiere de Chen *et al.*, (2021 a,b), Alcántara *et al.*, (2022) y Harnoster *et al.*, (2022). Sin embargo, en esos estudios no tomaron en cuenta la secuencia de *C. longicauda* debido a una posible identificación errónea, ya que información del genbank menciona que fue encontrado en caracoles, lo que difiere a los ciclos de vida de las especies de *Cosmocerca* las cuales parasitan anfibios y reptiles.

La secuencia de Cosmocercidae gen sp. 1 obtenida en este estudio, mostró una relación cercana con taxones de *Cosmocerca*, lo cual sugiere que es un taxón de dicho género, lo que es apoyado por el análisis morfológico mostrado previamente. Mientras que *Aplectana* n.sp 2 forma un clado distinto de las otras especies del género: *A. dayaoshanensis* y *A. xishuangbannaensis* parásitos en la región oriental. Por lo cual, podemos formular dos hipótesis: 1) *Aplectana* n.sp. 2, *A. dayaoshanensis* y *A. xishuangbannaensis* no son integrantes del mismo género 2) *Aplectana* spp. podría tener un proceso de diversificación

independiente en la región neártica. Sin embargo, los escasos datos genéticos (cuadro 4), los errores taxonómicos en la identificación y los estudios con pocos representantes de la familia son una limitante para el conocimiento actual de las relaciones dentro de Cosmocercidae. Cabe mencionar que *Aplectana* n.sp 2 y Cosmocercidae gen sp. 1 son las primeras especies de Cosmocercidae en México y en la región neártica con secuencias parciales de los genes 18s y 28s.

Los genes ribosomales 18s y 28s han sido ampliamente empleados para el reconocimiento específico y la reconstrucción filogenética de algunos grupos de nematodos (Nadler *et al.*, 2007). Sin embargo, los datos obtenidos en este estudio, mostraron que el gen 18s presentó un número menor de sitios informativos. El uso de varios marcadores moleculares puede incrementar el número de sitios informativos (Telford *et al.*, 2015), por ello, se considera importante la utilización y análisis de matrices concatenadas e integradas por un mayor número de genes, para tener una mejor aproximación de las relaciones evolutivas de la familia.

La divergencia genética entre los grupos identificados en la filogenia varió en un intervalo de 11.85 y 24.01%, sin embargo la mayor divergencia se presentó entre el Grupo II integrado por el taxón *Aplectana* n.sp. 2 reportada en este estudio y el Grupo III, conformado por las especies de *Aplectana* de China (*A. dayaoshanensis* y *A. xishuangbannaensis*) con 24.01%. Las divergencias genéticas altas en integrantes de un mismo género podrían estar reflejando la distancia geográfica, estos valores, son consistentes con los reportados por Chen y colaboradores (2021a,b) quienes también trabajaron con representantes de Cosmocercidae y con una matriz concatenada de 18s y 28s obteniendo valores entre el 16.4 y 20.5%. En otros trabajos, Hou y colaboradores (2007) encontraron que divergencias genéticas mayores al 20%, en crustáceos de distintas familias usando los mismos genes. No obstante, son escasos los estudios que aportan información de las distancias genéticas obtenidas de matrices concatenadas, inclinándose a proporcionarlo para cada gen analizado. Sinsch *et al.* (2018) encontraron distancias genéticas entre el 5 y el 30% en taxones de Cosmocercidae. Por otra parte, Chen *et al.* (2018) y Liu *et al.* (2018) señalaron que el gen 18s no sirve para diferenciar especies del género *Cosmocercoides* debido los valores bajos de divergencia, los cuales variaron en un intervalo de 0.11 y 0.65%. En el caso de los nematodos marinos, Pereira (2008) encontró porcentajes de divergencia del 1.06% para el gen 18s y del 12.09% para 28s.

Con el gen 28s Chen y colaboradores (2020b) diferenciaron dos especies de *Megalobatrachonema* con un porcentaje de divergencia del 1.24%. De Ley y colaboradores (2005) reportan diferencias del 1.0% al 5.0% entre nematodos con el mismo gen. Sin embargo, Mwamula y colaboradores (2024) encontraron porcentajes del 13 al 16% en especies de la familia Hoplolaimidae. Las distancias genéticas encontradas entre las especies analizadas en el presente estudio con respecto a *Aplectana* n.sp 2 y *Cosmocercidae* gen sp. 1 aunado con las otras evidencias observadas (morfología y propuestas filogenéticas) apoyan que puede tratarse de especies no descritas.

IX. CONCLUSIONES

- La riqueza de nematodos en los municipios es de Huehuetla (6), seguida de Metztlán (4) y Eloxochitlán (2) del estado de Hidalgo se encuentra constituida por dos posibles especies nuevas pertenecientes *Aplectana*, una especie de los géneros *Cosmocercoides* sp., *Rhabdias* sp. y *Ochoterenella* sp, además de cinco morfotipos identificados como miembros de la familia Cosmocercidae, los cuales son nuevos registros para el área de estudio.
- Los valores más altos en prevalencia, abundancia e intensidad se registraron para Cosmocercidae gen sp. 1, estableciéndose como el taxón más representativo que parasita el género *Incilius* en este estudio, por lo contrario, los valores más bajos los obtuvo *Rhabdias* sp., lo que indica un ciclo de vida directo y la penetración es la vía de infección más común.
- A través de pruebas de PERMANOVA se identificaron que las características morfológicas de longitud del esófago (LE), dirección de útero (DU), forma de la cola (FC), tipo de ala (TA), ubicación de la vulva (UV) y papilas en la vulva (PV) son de importancia para distinguir entre ejemplares hembras de Cosmocercidae y el PcoA mostró la presencia de seis grupos formados por siete taxones, siendo uno de ellos integrado por *A. itzocanensis* y *A. incerta*.
- La reconstrucción filogenética permitió conocer las posiciones filogenéticas de *Aplectana* sp. 2 y Cosmocercidae gen sp. 1 dentro de la familia Cosmocercidae. Asimismo, muestra la separación de *Aplectana* sp. 2 de otras especies del mismo género y la agrupación de Cosmocercidae gen sp.1 con taxones de *Cosmocerca* de la región africana y oriental.
- La divergencia genética con el uso de los genes 18S y 28S, permitió separar a *Aplectana* sp. 2 y Cosmocercidae gen sp. 1 parásitos de *I. valliceps* de las otras especies de Cosmocercidae africanas, europeas y orientales con porcentajes entre 11.85 y 24.01%.

X. LITERATURA CITADA

- Adamson, M. L., y Baccam, D. (1988). Systematic revision of the Atractidae sensu Chabaud (1978) (Nematoda; Cosmocercoidea): *Maracaya belemensis* n. sp. and *Aplectana albae* n. sp. from *Amphisbaena alba* in Brazil. *Canadian Journal of Zoology*, 66(8), 1857–1864. <https://doi.org/10.1139/z88-268>
- Aho, J. M. (1990). Helminth communities of amphibians and reptiles: comparative approaches to understanding patterns and processes. En: G. W, Esch, A. O., Bush, y J. M., Aho (Eds) *Parasite Communities: Patterns and Processes*, (pp.157-165). Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-009-0837-6_7
- Alcantara, E. P., Ebert, M. B., Müller, M. I., Úngari, L. P., Ferreira-Silva, C., Emmerich, E., Santos, A. L. Q., O'Dwyer, L. H., y da Silva, R. J. (2022). First molecular assessment on *Cosmocerca* spp. from Brazilian anurans and description of a new species of *Cosmocerca* (Ascaridomorpha: Cosmocercoidea) from the white-spotted humming frog *Chiasmocleis albopunctata* (Boettger, 1885) (Anura: Microhylidae). *Journal of Helminthology*, 96(e64), e64. <https://doi.org/10.1017/S0022149X22000517>
- Alcantara, E. P., Ferreira-Silva, C., Forti, L. R., Morais, D. H., y Silva, R. J. (2021). A new species of *Aplectana* (Nematoda: Cosmocercoidea) in the Marsupial frog *Gastrotheca microdiscus* (Amphibia: Hemiphractidae) from Brazil. *Zootaxa*, 4908(3). <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4908.3.7>
- Alemán-Muñoz, F., Pulido-Flores, G., Monks, S. y Falcón-Ordaz, J. (2013). Análisis morfométrico de *Glypthemis quieta* (Stafford, 1900) Stafford, 1905 (Digenea: Macroderoididae) en la Reserva de la Biosfera Barranca de Metztlán, Hidalgo, México. En: G. Pulido-Flores y S. Monks (Ed). *Estudios Científicos en el estado de Hidalgo y Zonas Aledañas*. (Volumen II. pp. 41-58). University of Nebraska Lincoln.
- Altschul, S. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(17), 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Anderson, R. C. (1988). Nematode transmission patterns. *The Journal of parasitology*, 74(1), 30–45. <https://doi.org/10.2307/3282477>
- Anderson, R. C. (2000). *Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission*. 2a edición. CABI Publishing. <https://doi.org/10.1079/9780851994215.0001>

- Araujo, P. (1976/77). Uma nova espécie do gênero *Neyrapterlectana* (Nematoda: Subuluroidea: Cosmocercidae) encontrada em ofídios. *Memorias do Instituto Butantan (San Paulo)*, 40/41, 259–264.
- Arya, S. N. (1979). A new nematode, *Cosmocercoides nainitalensis* n. sp. from the frog, *Rana cyanophlyctis*. *Revista Brasileira Biologia* 39, 823–825.
- Arya, S. N. (1991). Two new species of the genus *Cosmocercoides* Wilkie, 1930 from a frog, *Rana cyanophlyctis* from Nainital. *Indian Journal of Helminthology*, 43, 139–143.
- Avila, R. W., Strüssmann, C., y da Silva, R. J. (2010). A new species of *Cosmocercoides* (Nematoda: Cosmocercidae) from a gymnophthalmid lizard of western Brazil. *The Journal of Parasitology*, 96(3), 558–560. <https://doi.org/10.1645/GE-2336.1>
- Baker, M. R. (1980). A revision of the genus *Oxysomatium* Railliet & Henry, 1916 (Nematoda: Cosmocercidae). *Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle*, 3, 707–718.
- Baker, M. R. (1981). Cosmocercoid nematode parasites from frogs of Southern Africa. *Koedoe*, 24, 25–32.
- Baker, M. R. (1985). Redescription of *Aplectana itzocanensis* and *A. incerta* (Nematoda: Cosmocercidae) from Amphibians. *Transactions of the American Microscopical Society*, 104(3), 272–277.
- Baker, M. R., y Green, D. M. (1988). Helminth parasites of native frogs (Leiopelmatidae) from New Zealand. *Canadian journal of zoology*, 66(3), 707–713. <https://doi.org/10.1139/z88-105>
- Baker, M. R., y Vaucher, C. (1986). Parasitic Helminths from Paraguay XII: *Aplectana* Railliet & Henry, 1916 (Nematoda: Cosmocercidae) from Frogs. *Revue Suisse de Zoologie* 93, 607–616. <https://doi.org/10.5962/bhl.part.79500>
- Barton, D. P. (1997). Introduced animals and their parasites: The cane toad, *Bufo marinus*, in Australia. *Australian Journal of Ecology*, 22, 316–324.
- Barus V., y Coy Otero, A. (1969). Systematic survey of nematodes parasitizing lizards (Sauria) in Cuba. *Helminthologia*, 10, 329–346
- Baylis, H.A. (1927). On two new species of *Oxysomatium* (Nematoda) with some remarks on the genus. *Annals and Magazine of Natural History*, 19 279–286.
- Baylis, H.A. (1929). Some parasitic nematodes from the Uluguru and Usambara Mountains, Tanganyika Territory. *The Annals and Magazine of Natural History*, 10, 372–381
- Beveridge, I., Sukee, T., y Jabbar, A. (2021). Redescription of *Rugopharynx australis* (Mönnig, 1926) and the description of *R. moennigi* n. sp. (Nematoda: Strongyloidea) from kangaroos (Marsupialia: Macropodidae) in Australia. *Systematic Parasitology*, 98(5–6), 679–695. <https://doi.org/10.1007/s11230-021-10004-6>

- Bhadury, P., Austen, M. C., Bilton, D. T., Lamshead, P. J. D., Rogers, A. D., y Smerdon, G. R. (2006). Development and evaluation of a DNA-barcoding approach for the rapid identification of nematodes. *Marine Ecology Progress Series*, 320, 1–9. <https://doi.org/10.3354/meps320001>
- Blaxter, M. L. (2004). The promise of a DNA taxonomy. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 359(1444), 669–679. <https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1447>
- Blaxter, M. L., De Ley, P., Garey, J. R., Liu, L. X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J. R., Mackey, L. Y., Dorris, M., Frisse, L. M., Vida, J. T., y Thomas, W. K. (1998). A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature*, 392(6671), 71–75. <https://doi.org/10.1038/32160>
- Blaxter, M., Mann, J., Chapman, T., Thomas, F., Whitton, C., Floyd, R., y Abebe, E. (2005). Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 360(1462), 1935–1943. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1725>
- Borba, V. H., Martin, C., Machado-Silva, J. R., Xavier, S. C. C., de Mello, F. L., y Iñiguez, A. M. (2021). Machine learning approach to support taxonomic species discrimination based on helminth collections data. *Parasites & Vectors*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04721-6>
- Bursey, C., y Goldberg, S. (2007). A new species of *Aplectana* (Nematoda, Cosmocercidae) in *Platymantis bouleengeri* (Anura, Ceratobatrachidae) from Papua New Guinea. *Acta parasitologica*, 52(4), 368–370. <https://doi.org/10.2478/s11686-007-0049-5>
- Bursey, C. R., y Brooks, D. R. (2010). Nematode parasites of 41 anuran species from the area de Conservación Guanacaste, Costa Rica. *Comparative Parasitology*, 77(2), 221–231. <https://doi.org/10.1654/4418.1>
- Bursey, C. R., Goldberg, S. R., y Kraus, F. (2011). New species of *Aplectana* (Nematoda: Cosmocercidae) in *Sphenomorphus pratti* from Papua New Guinea. *The Journal of Parasitology*, 97(4), 654–660. <https://doi.org/10.1645/ge-2720.1>
- Bursey, C. R., Goldberg, S. R., y Lee Grismer, L. (2018). A new species of *Aplectana* (Nematoda, Cosmocercidae) in *Goniurosaurus bawanglingensis* (Squamata, Eublepharidae), from Hainan Province, China. *Acta parasitologica*, 63(1), 190–197. <https://doi.org/10.1515/ap-2018-0022>
- Bursey, C. R., Goldberg, S. R., y Telford Jr., S. R. (2006). New species of *Aplectana* (Nematoda: Cosmocercidae) and *Mesocoelium monas* (Digenea: Brachycoeliidae) in *Lepidophyma*

- flavimaculatum* (Squamata: Xantusiidae) from Costa Rica. *Caribbean Journal of Science*, 42(2), 164-170.
- Bush, A. O., Lafferty, K. D., Lotz, J. M., y Shostak, A. W. (1997). Parasitology Meets Ecology on Its Own Terms: Margolis et al. Revisited. *The journal of parasitology*, 83(4), 575. <https://doi.org/10.2307/3284227>
- Brusca, R. C., Giribet, G., y Moore, W. (2022). *Invertebrates*. Oxford University Press.
- Caballero y Caballero, E. (1933). Nemátodos parásitos de los batracios de México. II. *Oxysomatium mexicanum* nov. espec. *Anales del Instituto de Biología de la Universidad Nacional de México*, 4, 187–190
- Carlson, C. J., Dallas, T. A., Alexander, L. W., Phelan, A. L., y Phillips, A. J. (2020). What would it take to describe the global diversity of parasites? *Proceedings of the Royal Society B*, 287(1939), 20201841, 1–12. <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.1841>
- Chabaud, A. G. (1978). *CIH Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates - No. 6 - Keys to Genera of the Superfamilies Cosmocercoidea, Seuratoidea, Heterakoidea and Subuluroidea*. Commonwealth Institute of Helminthology.
- Chabaud, A. G., y Brygoo, E.R. (1958). Description et cycle évolutif d'*Aplectana courdurieri* n. sp. (Nematoda, Cosmocercidae). *Memoires de l'Institut Scientifique de Madagascar, Serie A*, 12, 159–176.
- Chen, H.-X., Zhang, L.-P., Feng, Y.-Y., y Li, L. (2020a). Integrated evidence reveals a new species of *Cosmocerca* (Ascaridomorpha: Cosmocercoidea) from the Asiatic toad *Bufo gargarizans* Cantor (Amphibia: Anura). *Parasitology Research*, 119(6), 1795–1802. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06687-3>
- Chen, H.-X., Zhang, L.-P., Nakao, M., y Li, L. (2018). Morphological and molecular evidence for a new species of the genus *Cosmocercoides* Wilkie, 1930 (Ascaridida: Cosmocercidae) from the Asiatic toad *Bufo gargarizans* Cantor (Amphibia: Anura). *Parasitology Research*, 117(6), 1857–1864. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5877-8>
- Chen, H.-X., Zhang, L.-P., Sinsch, U., Scheid, P., Balczun, C., y Li, L. (2020b). Molecular phylogeny of *Megalobatrachonema* (Nematoda: Ascaridida), with description of a new species based on morphological and molecular evidence. *Infection, Genetics and Evolution*, 80(104172), 104172. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104172>
- Chitwood, B.G y Chitwood M.B. (1950). *Introduction to Nematology*. University Park Press, Baltimore.
- De Amorim, D. M., Da Silva, L. A. F., Morais, D. H., Da Silva, R. J., y Ávila, R. W. (2017). *Aplectana nordestina* n. sp. (Nematoda: Cosmocercidae) parasitizing *Leposternon polystegum*

- (Squamata: Amphisbaenidae) from Northeastern, Brazil. *Zootaxa*, 4247(1), 083-088. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4247.1.12>
- De Ley, P., y Bert, W. (2002). Video capture and editing as a tool for the storage, distribution, and illustration of morphological characters of nematodes. *Journal of Nematology*, 34(4), 296–302.
- De Ley, P., De Ley, I. T., Morris, K., Abebe, E., Mundo-Ocampo, M., Yoder, M., Heras, J., Waumann, D., Rocha-Olivares, A., Jay Burr, A. H., Baldwin, J. G., y Thomas, W. K. (2005). An integrated approach to fast and informative morphological vouchering of nematodes for applications in molecular barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 360(1462), 1945–1958. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1726>
- Derycke, S., Fonseca, G., Vierstraete, A., Vanfleteren, J., Vincx, M. y Moens, T. (2008). Disentangling taxonomy within the *Rhabditis* (Pellioditis) marina (Nematoda: Rhabditidae) species complex using molecular and morphological tools. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 152:1-15.
- Di Deco, M. A., Orecchia, P., Paggi, L., y Petrarca, V. (1994). Morphometric stepwise discriminant analysis of three genetically identified species within *Pseudoterranova decipiens* (Krabbe, 1878) (Nematoda: Ascaridida). *Systematic Parasitology*, 29(2), 81–88. <https://doi.org/10.1007/bf00009803>
- Digiani, M. C., Notarnicola, J., y Navone, G. T. (2015). Rediscovery and new morphological data on two *Hassalstrongylus* (Nematoda: Heligmonellidae) coparasitic in the marsh rat *Holohilus chacarius* (Rodentia: Cricetidae) from Argentina. *Journal of Parasitology*, 101(5), 556–564
- Dos Anjos, S. F., Oda, F. H., Campiãõ, K. M., Ávila, R. W., dos Santos, J. N., dos Santos, A. N., Almeida, G. O., de Vasconcelos Melo, F. T., y Rodrigues, D. J. (2021). A new species of *Cosmocercoides* (Ascaridida: Cosmocercidae) parasitic in tree frogs from southern Amazonia. *Journal of parasitology*, 107(2): 239-245. <https://doi.org/10.1645/20-78>
- Draghi, R., Drago, F. B., y Lunaschi, L. I. (2020). A new species of *Cosmocercoides* (Nematoda: Cosmocercidae) and other helminths in *Leptodactylus luctator* (Anura: Leptodactylidae) from Argentina. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 92, 1–14.
- Drago, F. B. (2017). *Macroparásitos: Diversidad y biología*. Universidad Nacional de La Plata (EDULP).
- Espínola-Novelo, J. F., y Guillén-Hernández, S. (2008). Helminth parasites in *Cranopsis valliceps* (Anura: Bufonidae) from Lagunas Yalahau, Yucatan, Mexico. *Journal of Parasitology*, 94: 672–674.

- Esslinger, J. H. (1986). Redescription of *Ochoterenella digiticauda* Caballero, 1944 (Nematoda: Filaroidea) from the toad, *Bufo marinus*, with a Redefinition of the genus *Ochoterenella* Caballero, 1944. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 53, 210-217.
- Esslinger, J. H. (1987). *Ochoterenella caballeroi* sp. n. and *O. nanolarvata* sp. n. (Nematoda: Filaroidea) from the Toad *Bufo marinus*. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 54, 126-132.
- Esslinger, J. H. (1988). *Ochoterenella chiapensis* n. sp. (Nematoda: Filaroidea) from the Toad *Bufo marinus* in Mexico and Guatemala. *Transactions of the American Microscopical Society*, 107, 203-208.
- Esslinger, J. H. (1988). *Ochoterenella figueroai* sp. n. and *O. lamothei* sp. n. (Nematoda: Filaroidea) from the toad *Bufo marinus*. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 55, 146-154
- Fabio, S.P. (1971). Sobre uma nova especie do genero *Neyraplectana* Ballesteros and Marquez, 1945 (Nematoda: Cosmocercidae). *Atas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro*, 1971; 15: 11-13.
- Falcón-Ordaz, J., Acosta, R., Fernández, J. A., y Lira-Guerrero, G. (2012). Helminths y sifonápteros parásitos de cinco especies de roedores en localidades de la Cuenca Oriental, en el centro de México. *Acta Zoologica Mexicana*, 28(2), 287-304. <https://doi.org/10.21829/azm.2012.282834>
- Falcón-Ordaz, J., Monks, S., Pulido-Flores, G. y Rodríguez-Amador, R. (2014). A new species of *Aplectana* (Nematoda: Cosmocercidae) in *Ambystoma velasci* (Amphibia: Ambystomatidae) from Mexico. *Comparative Parasitology*, 81, 220-224.
- Falcón-Ordaz, J., Windfield-Perez, J.C., Mendoza-Garfias, B., Parra-Olea, G., Perez-Ponce De Leon, G. (2007). *Cosmocerca acanthurum* n. sp. (Nematoda: Cosmocercidae) in *Pseudoeurycea leprosa* and *Chiropterotriton orculus* from the Transmexican Volcani Belt, Central Mexico, with a checklist of the helminth parasites of plethodontid salamanders. *Zootaxa* 1434:27-49
- Floyd, R. M., Rogers, A. D., Lamshead, P. J. D., y Smith, C. R. (2005). Nematode-specific PCR primers for the 18S small subunit rRNA gene. *Molecular Ecology Notes*, 5(3), 611-612. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01009.x>
- Frost, D.R. (2024). Amphibian Species of the World: An Online Reference. Version 6.0. Electronic Database. American Museum of Natural History, New York. Available from: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html> (access 17 de junio 2024)
- Galicia-Guerrero, S., Bursley, C.R., Goldberg, R.S., y Salgado-Maldonado, G. (2000). Helminths of two sympatric toad species, *Bufo marinus* (Linnaeus) and *Bufo marmoratus* Wiegmann, 1833

- (Anura: Bufonidae) from Chamela, Jalisco, México. *Comparative Parasitology*, 67: 129–133.
- Gomes, D.C. y Motta, C. (1967). Sobre um novo gênero e uma nova espécie de Oxyascarididae (Travassos, 1920) Freitas, 1958 (Nematoda, Subuluroidea). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 65, 29–31.
- García-Prieto, L., García-Varela, M., y Mendoza-Garfias, B. (2014a). Biodiversidad de Acanthocephala en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 177–182. <https://doi.org/10.7550/rmb.31684>
- García-Prieto, L., Mendoza-Garfias, B., y Pérez-Ponce de León, G. (2014b). Biodiversidad de Platyhelminthes parásitos en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 164–170. <https://doi.org/10.7550/rmb.31756>
- García-Prieto, L., Osorio-Sarabia, D., y Lamothe-Argumedo, M. R. (2014c). Biodiversidad de Nematoda parásitos de vertebrados en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 171–176. <https://doi.org/10.7550/rmb.31746>
- Goldberg, S. R., y Bursley C. R. (2002). Helminth parasites of seven anuran species from Northwestern Mexico. *Western North American Naturalist*, 62 160-169.
- Gomez, M. D. P., González, C. E., y Sanabria, E. A. (2017). A new species of *Aplectana* (Nematoda: Cosmocercidae) parasite of *Pleurodema nebulosum* (Anura: Leptodactylidae) from the Monte desert, Argentina, with a key to Neotropical species of the genus *Aplectana*. *Zootaxa*, 4247(2), 121–130. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4247.2.3>
- González, C. E., Gómez, V. I., y Hamann, M. I. (2019). Morphological variation of *Aplectana hylambatis* (Nematoda: Cosmocercidae) from different anuran hosts and localities in Argentina. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 91(3), 1-28. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920171028>
- Guillén-Hernández, S. (1992). Comunidades de helmintos de algunos anuros de “Los Tuxtlas”, Veracruz. Tesis Maestría, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico, 90 pp.
- Hammer, O., Harper, D.A.T. y Ryan, P.D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontología Electrónica* 4, 9.
- Harnoster, F., du Preez, L. H., y Svitin, R. (2022). Three new species of *Cosmocerca* Diesing, 1861 (Nematoda: Cosmocercidae) parasitising frogs *Cacosternum boettgeri* Boulenger, 1882, *Kassina senegalensis* Dumeril and Bibron, 1841 and *Phrynomantis bifasciatus* Smith, 1847 from South Africa. *Parasitology Research*, 121(2), 563–571. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07390-7>

- Harwood, P. D. (1930). A new species of *oxysomatium* (Nematoda) with some remarks on the genera *oxysomatium* and *Aplectana*, and observations on the life history. *The Journal of Parasitology*, 17(2), 61-73 <https://doi.org/10.2307/3271435>
- Hasegawa, H. (1989). Redescription of *Cosmocercoides tridens* Wilkie, 1930 (Nematoda: Cosmocercidae). *Canadian Journal of Zoology*, 67(5), 1189–1193. <https://doi.org/10.1139/z89-171>
- Hickman, C. P., Roberts, J. , Keen, S. L., Larson, S.L., Anson, A., y Eisenhour, D.J. (2009). *Principios Integrales de Zoología*. McGraw-Hill/Interamericana de España.
- Hodda, M. (2022). Phylum Nematoda: a classification, catalogue and index of valid genera, with a census of valid species. *Zootaxa*, 5114(1), 1-289. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5114.1.1>
- Holterman, M., van der Wurff, A., van den Elsen, S., van Megen, H., Bongers, T., Holovachov, O., Bakker, J., y Helder, J. (2006). Phylum-wide analysis of SSU rDNA reveals deep phylogenetic relationships among nematodes and accelerated evolution toward crown Clades. *Molecular Biology and Evolution*, 23(9), 1792–1800. <https://doi.org/10.1093/molbev/msl044>
- Huelsenbeck, J. P., y Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 17(8), 754–755. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>
- Islam, A, Farooq, M., y Khanum, Z. (1979). Two new genera of nematode parasites (Oxyuridae: Oxysomatinae) from toad *Bufo andersoni* of Pakistan. *Pakistan Journal of Zoology*, 11, 69-73.
- Karve, J. N. (1944). On a small collection of parasitic nematodes from anura. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences. Section B, Biological Sciences*, 19(3), 71–77. <https://doi.org/10.1007/bf03049773>
- Kennedy, M. J. (1980). Host-induced variations in *Haematolechus buttensis* (Trematoda:Haematoloechidae). *Canadian Journal of Zoology*, 58, 427-442.
- Khera, S. (1958). On a new species of *Cosmocercoides*. *Indian Journal of Helminthology* 10: 6–12.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., y Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kuzmin, Y., Tkach, V. V., y Snyder, S. D. (2003). The nematode genus *Rhabdias* (Nematoda: Rhabdiasidae) from amphibians and reptiles of the Nearctic. *Comparative parasitology*, 70(2), 101–114. <https://doi.org/10.1654/4075>
- Lamothe-Argumedo, R., y García-Prieto, L. (1988). *Helminthiasis del hombre en México. Tratamiento y profilaxis*. AGT.

- Lemos-Espinal, J. A., y Smith, G. R. (2015). Amphibians and reptiles of the state of Hidalgo, Mexico. *Check list*, 11(3), 1-11. <https://doi.org/10.15560/11.3.1642>
- Lent, H., y Freitas, F.T. (1948). Uma coleção de nematódeos, parasites de vertebrados do Museu de História Natural de Montevidéu. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 46: 1–71.
- León-Régagnon, V., Martínez-Salazar, E. A., Lazcano-Villareal, D., y Rosas-Valdez, R. (2005). Helminth parasites of four species of anurans from Nuevo Leon, Mexico. *The Southwestern Naturalist*, 50(2), 251–258.
- Le Van Hoa, L. (1962). Nématodes parasites de mamíferes, reptiles et amphibiens Mission G.F. de Witte (1946-49). *Brussels, Fascicle*. 65: 3–58.
- Lewis, O.T. (2006). Review. Climate change, species–area curves and the extinction crisis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 361:163-171.
- Liu, Y., Yu, Q., Shu, Y.-L., Zhao, J.-H., Fang, J.-Y., y Wu, H.-L. (2019). A new *Cosmocercoides* species (Ascaridida: Cosmocercidae), *C. wuyiensis* n. sp., from the Asiatic frog *Amolops wuyiensis* (Amphibia: Anura). *Journal of Helminthology*, 94(e59), e59. <https://doi.org/10.1017/S0022149X19000518>
- Liu, Y., Yu, Q., Shu, Y.-L., Zhao, J.-H., Fang, J.-Y., y Wu, H.-L. (2020). A new *Cosmocercoides* species (Ascaridida: Cosmocercidae), *C. wuyiensis* n. sp., from the Asiatic frog *Amolops wuyiensis* (Amphibia: Anura). *Journal of Helminthology*, 94(e59). <https://doi.org/10.1017/s0022149x19000518>
- López, L. O., Woolrich-Piña, G. A., y Lemos-Espinal, J. A. (2009). *La familia Bufonidae en México*. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad .
- Mardia, K. V. (1970). Measures of multivariate skewness and kurtosis with applications. *Biometrika*, 57(3), 519-530. <https://doi.org/10.2307/2334770>
- Martínez-Meyer, E., Sosa-Escalante, J. E., y Álvarez, F. (2014). El estudio de la biodiversidad en México: ¿una ruta con dirección? *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 1–9. <https://doi.org/10.7550/rmb.43248>
- Martínez-Salazar, E. A. (2008). Sistemática y biogeografía del género *Rhabdias* Stiles y Hassal, 1905 (Nematoda: Rhabdiasidae) en México. (Tesis de postgrado). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Martínez-Salazar, E. A., Falcón-Ordaz, J., González-Bernal, E., Parra-Olea, G., y de León, G. P.P. (2013). Helminth parasites of *Pseudacris hypochondriaca* (Anura: Hylidae) from Baja California, Mexico, with the description of two new species of nematodes. *The Journal of Parasitology*, 99(6), 1077–1085. <https://doi.org/10.1645/13-284.1>

- Martínez-Salazar, E. A., y León-Règagnon, V. (2007). New species of *Rhabdias* (Nematoda: Rhabdiasidae) from *Bufo occidentalis* (Anura: Bufonidae) from Sierra Madre del Sur, Mexico. *The Journal of Parasitology*, 93(5), 1171–1177. <https://doi.org/10.1645/GE-1188R.1>
- Martínez-Villarreal, J. M. (1969). Parásitos de algunos anfibios colectados en diferentes áreas de los municipios de Escobedo, Pesquería y Santiago, Nuevo León, México. B.S. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, Mexico, 53 pp.
- Merino, S. (2002). *Evolución de la interacción Parasito-hospedador*. En: Soler, M. 2002. Evolución: La base de la biología.
- Miranda, C. (1924). Alguns nematódeos do género *Aplectana* Railliet & Henry, 1916. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 17, 45-49.
- Monks, S., Pulido-Flores, G., Bautista-Hernández, C. E., Falcón-Ordaz, J., Gaytán-Oyarzún, J.C. y Alemán-García, B.(2013). El uso de helmintos parásitos como bioindicadores en la evaluación de la calidad del agua: Lago de Tecocomulco vs. Laguna de Metztitlán, Hidalgo, México. En G. Pulido-Flores y S. Monks (ed.). *Estudios Científicos en el estado de Hidalgo y Zonas Aledañas*. Volumen II. pp. 25-34. Zea Book, University of Nebraska Lincoln.
- Moravec, F. y Sey, O. (1986). Three new nematode species from *Phrynomantis* spp. (Amphibia: Microhylidae) from Papua New Guinea. *Folia Parasitologica*, 33, 343–351
- Nadler, S. A. y Hudspeth, D. (1998). Ribosomal DNA and Phylogeny of the Ascaridae (Nemata: Secernentea): Implications for Morphological Evolution and Classification. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 10, 221-236.
- Ni, X., Barton, D. P., y Li, L. (2022). *Austraplectana extranes* sp. n. (Nematoda: Cosmocercoidea) from Australian amphibians *Mixophyes carbinensis* Mahony, Donnellan, Richards & McDonald (Anura: Myobatrachidae) and *Rhinella marina* (Linnaeus) (Anura: Bufonidae). *Systematic Parasitology*, 100(2), 183-188. <https://doi.org/10.1007/s11230-022-10080-2>
- Ogden, C. G. (1966). On some parasitic nematodes from reptiles, mainly from Ceylon. *Journal of Helminthology*, 40(1), 81–90. <https://doi.org/10.1017/s0022149x00034118>
- Paredes-León, R., García-Prieto, L., Guzmán-Cornejo, C., León-Règagnon, V., y Pérez, T. M. (2008). Metazoan parasites of Mexican amphibians and reptiles. *Zootaxa*, 1904(1), 1-166. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1904.1.1>
- Pérez-Ponce de León, G., y García Prieto, L. (2001). Los parásitos en el contexto de la biodiversidad y la conservación. *Biodiversitas*. 34: 11-15.

- Pérez-Ponce de León, G., García-Prieto, L., y Razo-Mendivil, U. (2002). Species richness of helminth parasites in Mexican amphibians and reptiles. *Diversity & Distributions*, 8(4), 211–218. <https://doi.org/10.1046/j.1472-4642.2002.00149.x>
- Pérez-Ponce de León, G., León-Règagnon, V., García-Prieto, L., Razo-Mendivil, U., y Sánchez-Álvarez, A. (2000). Digenean fauna of amphibians from Central Mexico: Nearctic and Neotropical Influences. *Comparative Parasitology*. 67, 92-106.
- Piñeiro-Gomez, M. D., González, C. E., y Sanabria, E. A. (2017). A new species of *Aplectana* (Nematoda: Cosmocercidae) parasite of *Pleurodema nebulosum* (Anura: Leptodactylidae) from the Monte desert, Argentina, with a key to Neotropical species of the genus *Aplectana*. *Zootaxa*, 4247(2), 121-130. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4247.2.3>
- Price, P. W. (1980). *Evolutionary biology of parasites*. Princeton University Press. <https://doi.org/10.2307/j.ctvx8b6r1>
- Puga, S. y Torres, P. (1997). *Aplectana artigasi* n. sp. (Nematoda: Cosmocercidae) from the frog *Eupsophus calcaratus* (Anura: Leptodactylidae) in southern Chile. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92, 767–770.
- Pulido-Flores, G., Monks, S. y Pérez-Romero, G. (2009). Helminths parasites of *Lithobates spectabilis* Hillis y Frost, 1985, De la Reserva de la Biosfera Barranca de Metztlán, Hidalgo, México. En G. Pulido-Flores y S. Monks (ed.). *Estudios Científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledañas*. Vol I. pp 23-33. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Ramallo, G., Bursey, C. R., y Goldberg, S. R. (2007). Two new species of cosmocercids (Ascaridida) in the toad *Chaunus arenarum* (Anura: Bufonidae) from Argentina. *The Journal of Parasitology*, 93(4), 910–916. <https://doi.org/10.1645/GE-1131R.1>
- Ramallo, G., Bursey, C. R., y Goldberg, S. R. (2008). New species of *Aplectana* (Ascaridida: Cosmocercidae) in the toads, *Rhinella granulosa* and *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae) from northern Argentina. *The Journal of Parasitology*, 94(6), 1357–1360. <https://doi.org/10.1645/GE-1422.1>
- Ramírez-Bautista, A., Hernández-Salinas, U., Cruz-Elizalde, R., Berriozabal-Islas, C., Lara-Tufiño, D., Goyenechea Mayer-Goyenechea, I. y Castillo-Cerón, J. M. (2014). *Los anfibios y reptiles del estado de Hidalgo, México: Diversidad, Biogeografía y Conservación*. Sociedad Herpetológica Mexicana.
- Rao, R. (1979). On four new species of the genera *Paracosmocerca* Kung et Wu, 1945, *Cosmocerca* Diesing, 1861 and *Cosmocercoides* Wilkie, 1930 of the family Cosmocercidae Travassos, 1925. *Helminthologia*, 16, 23–34.

- Rebêlo, G. L., Santos, A. N., Tavares-Costa, L. F. S., Dias-Souza, M. R., Müller, M. I., Jesus, R. F., Costa-Campos, C. E., Santos, J. N. D., y De Vasconcelos Melo, F. T. (2023). Morphological and molecular characterization of *Cosmocercoides amapari* n. sp. (Nematoda: Cosmocercidae), parasitic in hylid frogs from the Brazilian Amazon. *Parasitology*, 150(3), 286-296. <https://doi.org/10.1017/s0031182022001767>
- Ricci, M. (1987). Parasites of *Speleomantes* (Amphibia: Urodela: Plethodontidae) in Italy. *Rivista di Parassitologia* 4, 5–25.
- Rico-Hernández, G. (2011). Evolución de interacciones parásito-hospedero: Coevolución, selección sexual, y otras teorías propuestas. *Revista U.D.C.A. Actualidad y Divulgación Científica*. 14,119-130.
- Rizvi, A. N. (2009). Two new species of amphibian nematodes from Bhadra Wildlife Sanctuary, Western Ghats, India. *Zootaxa*, 2013(1), 58–68. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2013.1.6>
- Rodríguez-Diego, J.G., Olivares, J.L., Arece, J., y Roque, E. (2009). Evolución de los parásitos: Consideraciones generales. *Revista de Salud Animal*. 31, 13-17.
- Santos, A. N., Borges, E. D. S., Willkens, Y., Santos, J. N. D., Costa-Campos, C. E., y De Vasconcelos Melo, F. T. (2023). A new species of *Aplectana* Railliet & Henry, 1916 (Nematoda: Cosmocercidae) in the Brazilian Amazon and the taxonomic status of *Aplectana longa*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária/Brazilian Journal Of Veterinary Parasitology*, 32(4), 1-11. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612023074>
- Sarasquete, C., Borrega, B., Robles, R., Nuñez, R., Bermudez, L., Ortiz-Delgado, J. B., Barrios, M.M. y García de Lomas, J.M. (2013). Parásitos como bioindicadores de calidad y salud en cultivos semiintensivos en esteros. Diagnóstico y pronóstico de histopatologías branquiales en dorada, *Sparus aurata*, y lubina, *Dicentrarchus labrax*. XIV Congreso Nacional de Acuicultura. 320-323.
- Sato, A., Hasegawa, H., Sekiya, K., Y Tsubouchi, T. (2015). Is *Cosmocerca* (Nematoda: Cosmocercidae) parasitic in Japanese amphibians a single species. *Japanese Journal of Veterinary Parasitology*, 14(1), 7-12.
- Silva, A. A. (1955). Nova espécie do gênero *Aplectana* Railliet & Henry, 1916 (Nematoda, Cosmocercidae). *Memoires do Instituto Oswaldo Cruz*, 52, 415–418
- Sinsch, U., Dehling, J. M., Scheid, P., y Balczun, C. (2020). Molecular diversity of nematode parasites in Afrotropical reed frogs (*Hyperolius* spp.). *Diversity*, 12(7), 265.
- Sinsch, U., Heneberg, P., Těšínský, M., Balczun, C., y Scheid, P. (2019). Helminth endoparasites of the smooth newt *Lissotriton vulgaris*: linking morphological identification and molecular

data. *Journal of Helminthology*, 93(3), 332–341. <https://doi.org/10.1017/s0022149x18000184>

- Smythe, A. B., Holovachov, O., y Kocot, K. M. (2019). Improved phylogenomic sampling of free-living nematodes enhances resolution of higher-level nematode phylogeny. *BMC Evolutionary Biology*, 19(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/s12862-019-1444-x>
- Sou, S. K., y Banerjee, S. (2020). Description of *Aplectana sriniketanensis* sp. nov. (Nematoda: Cosmocercidae) from *Hoplobatrachus crassus* (Anura: Dicroglossidae) from Birbhum District, West Bengal, India. *Flora And Fauna*, 26(1), 134-140. <https://doi.org/10.33451/10.33451/floraf fauna.v26i1pp134-140>
- Sou, S.K., y Nandi, A.P. (2015). *Aplectana dubrajpuri* sp. nov. (Nematoda: Cosmocercidae) in *Hoplobatrachus tigerinus* (Anura:Dicroglossidae) from Dubrajpur, Birbhum, West Bengal, India. *Acta Parasitologica*. 60: 430-434.
- Sou, S. K., Sow, K. K., y Nandi, A. P. (2014). On a new species of *Aplectana* (Nematoda, Cosmocercidae) from Kulti, Burdwan, West Bengal, India. *Acta Parasitologica*, 59(4), 694–697. <https://doi.org/10.2478/s11686-014-0295-2>
- Sou, S. K., Sow, K. K., y Nandi, A. P. (2018). *Aplectana hoplobatrachus* sp. nov. (Nematoda: Cosmocercidae) in *Hoplobatrachus crassus* (Jerdon, 1853) (Anura: Dicroglossidae) from Birbhum District, West Bengal, India. *Zootaxa*, 4472(1), 194–200. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4472.1.12>
- Souza, R., Vilela, R. do V., Gentile, R., Lopes-Torres, E. J., Cordeiro-Estrela, P., Moratelli, R., da Costa-Neto, S. F., Cardoso, T. D. S., Varella, K., y Maldonado Júnior, A. (2022). Population genetic structure and morphological diversity of *Cruzia tentaculata* (Nematoda: Ascaridida), a parasite of marsupials (Didelphinae), along the Atlantic Forest on the eastern coast of South America. *Parasitology*, 149(11), 1487–1504. <https://doi.org/10.1017/S0031182022000981>
- Tinsley, R.C., y Jackson, J.A (1998). Speciation of *Protopolytoma* Bychowsky, 1957 (Monogenea: Polystomatidae) in hosts of the genus *Xenopus* (Anura:Pipidae). *Systematic Parasitology* 40:93-141.
- Thomas, J.D. (1965). The anatomy, life history and size allometry of *Mesocoelium monodi* Dollfus, 1929. *Journal of Zoology*. 146: 413-446.
- Tran, B. T., Sato, H., y Van Luc, P. (2015). A new *Cosmocercoides* species (Nematoda: Cosmocercidae), *C. tonkinensis* n. sp., in the scale-bellied tree lizard (*Acanthosaura lepidogaster*) from Vietnam. *Acta Parasitologica*, 60(3), 407–416. <https://doi.org/10.1515/ap-2015-0056>

- Travassos, L. (1925). Contribuições para o conhecimento da fauna helmintológica dos Batraquios do Brazil. *Sciencia Medica, Rio de Janerio*, 9, 673–687.
- Travassos, L. (1926). Sôbre uma nova *Aplectana*. Boletim Biologico, Universidad Sao Paulo Faculdade de Medicina. *Laboratorio de Microbiologia*, 4, 94–96
- Travassos, L. (1931). Pesquisas helminthologicas realizadas em Hamburgo. IX Ensaio monographico da familia Cosmocercidae Trav., 1925 (Nematoda). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 25, 237-298.
- Terán- Juárez, S. A. (2011). Helmintos parásitos en cinco especies de anuros en el sur de Quintana Roo, México. Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico de Chetumal, 125 pp.
- Trejo-Meléndez, V., Osorio-Sarabia, D., García-Prieto, L., y Mata-López, R. (2019). Helminth Fauna of *Incilius marmoreus* (Anura: Bufonidae) in a Neotropical Locality of Mexico. *Comparative Parasitology*, 86(1), 52. <https://doi.org/10.1654/1525-2647-86.1.52>
- Vhora, M. S., y Bolek, M. G. (2013). New host and distribution records for *Aplectana hamatospicula* (Ascaridida: Cosmocercidae) in *Gastrophryne olivacea* (Anura: Microhylidae) from the Great Plains U.S.A. *The Journal of Parasitology*, 99(3), 417–420. <https://doi.org/10.1645/12-75.1>
- Vicente, J.J. y Santos E. (1970). Nova espécie do gênero *Neyraplectana* Ballesteros Marquez, 1945 (Nematoda: Subuluroidea). *Atas Sociedade de Biologica de Rio de Janeiro*, 13, 21–23.
- Vieira, F. M., Gonçalves, P. A., Lima, S. D. E. S., de Sousa, B. M., y Muniz-Pereira, L. C. (2020). A new species of *Aplectana* Railliet & Henry (Nematoda: Cosmocercidae) in *Amphisbaena alba* Linnaeus (Squamata: Amphisbaenidae) from Minas Gerais State, Brazil. *Zootaxa*, 4890(2). <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4890.2.4>
- Walton, A.C. (1940). Notes on amphibian parasites. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 7, 87–91.
- Wang, P.Q. (1980). Studies on some new nematodes of the suborder Oxyurata from Fujian, China. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 5:242–52.
- Wang, P.Q., Sun, L., Zhao R., y Zhang, W.H. (1981). Notes on five new species of nematodes from vertebrates in Wuyi, Fujian Province. *Wuyi Science Journal*, 1, 113–118.
- Wang, P.Q., Zhao, Y. y Chen, C. (1978). On some nematodes from vertebrates in south China. *Fjuian Shida Xuebao* 2: 75–90.
- Wilkie, J.S. (1930). Some parasitic nematodes from Japan. *The Annals and Magazine of Natural History* 10: 606–61.
- Yu Kirillova, N., Kirillov, A. A., y Chikhlyayev, I. V. (2021). Morphological variability of *Oswaldocruzia filiformis* (Nematoda: Molineidae) in amphibians from European Russia. *Earth and Environmental Science*, 818(1), 012018. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/818/1/012018>
- Zar, J. H. (1999). *Biostatistical Analysis: International Edition*. Prentice Hall.

XI. ANEXOS

Anexo 1. Matriz de datos los atributos de los ejemplares de Cosmocercidae identificados en este estudio y dos especies de *Aplectana* tomadas como referencia. Poner a que se refiere cada abreviatura y que significan el 1 y 2 de los últimos caracteres.

	Lt	AC	LE	AB	LB	PE --EA	AN --EA	LH	AH	No. de huevos	DU	FC	TA	PV
RAI1	2.35	0.1	0.43	0.08	0.08	0.35	0.23	0.125	0.085	19	1	1	1	1
RAI2	3.075	0.15	0.45	0.08	0.1	0.39	0.24	0.11	0.1	40	1	1	1	1
RAI3	2.75	0.12	0.36	0.08	0.1	0.31	0.2	0.175	0.075	50	1	1	1	1
RAI4	3.425	0.18	0.58	0.08	0.1	0.45	0.24	0.1	0.075	50	1	1	1	1
RAI5	3	0.15	0.43	0.08	0.08	0.37	0.23	0.125	0.075	30	1	1	1	1
RAI6	3.175	0.12	0.47	0.08	0.1	0.4	0.25	0.1	0.075	50	1	1	1	1
RAI7	3.175	0.15	0.45	0.08	0.1	0.4	0.2	0.15	0.075	30	1	1	1	1
RAI8	2.625	0.12	0.35	0.08	0.08	0.3	0.2	0.185	0.075	22	1	1	1	1
RAI9	3.35	0.15	0.44	0.09	0.08	0.4	0.23	0.135	0.095	35	1	1	1	1
RAI10	2.5	0.1	0.4	0.07	0.08	0.3	0.2	0.14	0.1	30	1	1	1	1
RAIN1	2.6	0.1	0.43	0.07	0.08	0.35	0.23	0.1	0.05	9	1	1	1	1
RAIN2	2.46	0.1	0.38	0.08	0.08	0.35	0.2	0.085	0.05	15	1	1	1	1
RAIN3	2.5	0.1	0.38	0.08	0.07	0.31	0.22	0.085	0.0575	5	1	1	1	1
RAIN4	2.8	0.15	0.43	0.08	0.07	0.4	0.23	0.085	0.045	5	1	1	1	1
RAIN5	2.4	0.1	0.42	0.05	0.08	0.4	0.24	0.7	0.0675	10	1	1	1	1
RAIN6	2.8	0.1	0.45	0.08	0.09	0.38	0.22	0.76	0.055	10	1	1	1	1
RAIN7	2.825	0.1	0.42	0.08	0.08	0.4	0.22	0.18	0.095	5	1	1	1	1
RAIN8	3.05	0.1	0.44	0.07	0.07	0.39	0.21	0.175	0.1	5	1	1	1	1
RAIN9	3	0.1	0.44	0.08	0.08	0.4	0.23	0.18	0.1	10	1	1	1	1
RAIN10	2.625	0.15	0.4	0.08	0.06	0.37	0.23	0.19	0.11	17	1	1	1	1
Aple(1)1	3.075	0.1	0.52	0.09	0.1	0.4	0.25	0.14	0.09	16	1	1	1	2
Aple(1)2	2.875	0.12	0.5	0.08	0.08	0.38	0.2	0.13	0.09	44	1	1	1	2
Aple(1)3	2.875	0.12	0.48	0.08	0.09	0.38	0.2	0.145	0.085	33	1	1	1	2
Aple(1)4	3.125	0.13	0.51	0.1	0.08	0.38	0.25	0.135	0.085	11	1	1	1	2
Aple(1)5	2.6	0.1	0.5	0.08	0.1	0.36	0.2	0.135	0.09	7	1	1	1	2
Aple(1)6	2.9	0.1	0.5	0.08	0.1	0.39	0.25	0.135	0.09	28	1	1	1	2
Aple(1)7	2.45	0.1	0.48	0.09	0.1	0.35	0.2	0.13	0.09	18	1	1	1	2
Aple(1)8	2.625	0.1	0.48	0.1	0.08	0.35	0.23	0.11	0.075	25	1	1	1	2
Aple(1)9	2.75	0.1	0.48	0.1	0.08	0.35	0.25	0.26	0.17	30	1	1	1	2

*Longitud total (LT), ancho del cuerpo (AM), longitud del esófago (LE), poro excretor a región anterior (PE-RA), anillo nervioso a región anterior (AN-RA), largo del bulbo (LB), ancho del bulbo (AB), longitud del huevo (LH), ancho del huevo (AH), dirección de las ramas uterinas (DU), forma de la cola (FC), tipo de ala (TA), papilas en la vulva (PV) y ubicación de la vulva (UV). Los caracteres cualitativos se les dio el valor de 1 o 2 según sea el caso (PV: ausencia 1, presencia 2; DU: prodélfas 1, anfidélfas 2; FC: cónica 1, filamento 2; TA: simple 1, tricúspide 2 y UV: ecuatorial 1, postecuatorial 2.

	Lt	AC	LE	AB	LB	PE -EA	AN -EA	LH	AH	No. de huevos	DU	FC	TA	PV
Aple(1)10	2.875	0.1	0.5	0.08	0.1	0.38	0.23	0.24	0.16	30	1	1	1	2
Aple(1)11	2.875	0.12	0.5	0.08	0.1	0.39	0.23	0	0.045	35	1	1	1	2
Aple(1)12	2.85	0.1	0.48	0.1	0.08	0.35	0.24	0.135	0.09	25	1	1	1	2
Aple(1)13	2.55	0.1	0.47	0.08	0.1	0.34	0.24	0.13	0.08	40	1	1	1	2
Aple (2)1	4.875	0.2	0.6	0.12	0.1	0.5	0.26	0.125	0.075	50	1	1	2	1
Aple (2)2	5.925	0.3	0.5	0.1	0.1	0.6	0.25	0.14	0.095	50	1	1	2	1
Aple (2)3	6.25	0.27	0.55	0.12	0.1	0.55	0.3	0.15	0.105	50	1	1	2	1
Aple (2)4	5.5	0.25	0.62	0.1	0.12	0.58	0.22	0.11	0.095	50	1	1	2	1
Aple (2)5	6.375	0.3	0.5	0.12	0.1	0.5	0.25	0.14	0.1	45	1	1	2	1
Aple (2)6	5.7	0.25	0.53	0.12	0.1	0.48	0.23	0.14	0.095	40	1	1	2	1
Aple (2)7	5	0.2	0.6	0.1	0.1	0.55	0.2	0.135	0.1	35	1	1	2	1
Aple (2)8	4.625	0.25	0.55	0.1	0.1	0.48	0.25	0.125	0.09	50	1	1	2	1
Aple (2)9	3	0.15	0.52	0.08	0.08	0.36	0.3	0.13	0.085	50	1	1	2	1
Aple (2)10	3	0.14	0.57	0.1	0.08	0.42	0.35	0.13	0.085	50	1	1	2	1
Aple (2)11	3.15	0.1	0.62	0.08	0.1	0.45	0.25	0.13	0.08	35	1	1	2	1
Aple (2)12	3.325	0.15	0.58	0.1	0.08	0.47	0.24	0.165	0.075	38	1	1	2	1
Aple (2)13	6.5	0.33	0.65	0.14	0.12	0.6	0.25	0.145	0.105	40	1	1	2	1
Cosmo (1) 1	2.875	0.17	0.33	0.1	0.1	0.2	0.17	0.19	0.15	25	1	2	1	1
Cosmo (1) 2	2	0.15	0.3	0.08	0.06	0.2	0.12	0.16	0.1	18	1	2	1	1
Cosmo (1) 3	2.5	0.18	0.3	0.06	0.06	0.24	0.15	0.19	0.125	18	1	2	1	1
Cosmo (1) 4	2.375	0.15	0.3	0.08	0.07	0.26	0.13	0.19	0.125	20	1	2	1	1
Cosmo (1) 5	2.25	0.15	0.3	0.07	0.09	0.23	0.15	0.205	0.115	22	1	2	1	1
Cosmo (1) 6	2.125	0.15	0.27	0.07	0.08	0.22	0.15	0.225	0.14	24	1	2	1	1
Cosmo (1) 7	2.225	0.18	0.25	0.08	0.08	0.22	0.15	0.2	0.11	26	1	2	1	1
Cosmo (1) 8	1.1	0.18	0.3	0.08	0.06	0.2	0.2	0.2	0.14	30	1	2	1	1
Cosmo (1) 9	2.5	0.18	0.3	0.1	0.08	0.24	0.21	0.21	0.14	18	1	2	1	1
Cosmo (1) 10	2.925	0.2	0.3	0.1	0.08	0.22	0.14	0.185	0.125	15	1	2	1	1
Cosmo (1) 11	3.25	0.18	0.35	0.08	0.06	0.3	0.18	0.175	0.105	15	1	2	1	1
Cosmo (1) 12	2.8	0.18	0.35	0.1	0.08	0.27	0.2	0.205	0.135	20	1	2	1	1
Cosmo (1) 13	3.125	0.2	0.36	0.08	0.08	0.25	0.13	0.19	0.135	21	1	2	1	1
Cosmo (2) 1	3.075	0.18	0.35	0.1	0.07	0.27	0.2	0.205	0.15	7	2	2	1	1
Cosmo (2) 2	2.475	0.15	0.3	0.08	0.07	0.25	0.17	0.21	0.12	4	2	2	1	1
Cosmo (2) 3	2.75	0.15	0.33	0.08	0.07	0.26	0.15	0.205	0.25	11	2	2	1	1

*Longitud total (LT), ancho del cuerpo (AM), longitud del esófago (LE), poro excretor a región anterior (PE-RA), anillo nervioso a región anterior (AN-RA), largo del bulbo (LB), ancho del bulbo (AB), longitud del huevo (LH), ancho del huevo (AH), dirección de las ramas uterinas (DU), forma de la cola (FC), tipo de ala (TA), papilas en la vulva (PV) y ubicación de la vulva (UV). Los caracteres cualitativos se les dio el valor de 1 o 2 según sea el caso (PV: ausencia 1, presencia 2; DU: prodélfas 1, anfidélfas 2; FC: cónica 1, filamento 2; TA: simple 1, tricúspide 2 y UV: ecuatorial 1, postecuatorial 2

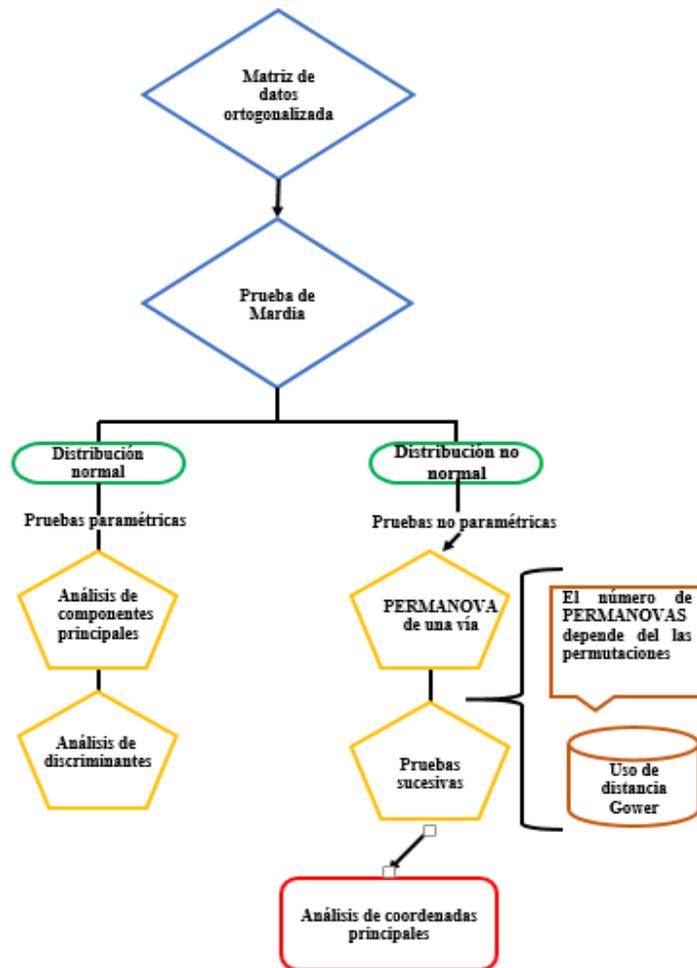
	Lt	AC	LE	AB	LB	PE -EA	AN -EA	LH	AH	No. de huevos	DU	FC	TA	PV
Cosmo (2) 4	2.625	0.15	0.35	0.1	0.07	0.27	0.18	0.19	0.135	7	2	2	1	1
Cosmo (2) 5	2.75	0.15	0.35	0.08	0.07	0.25	0.2	0.21	0.125	8	2	2	1	1
Cosmo (2) 6	2.625	0.15	0.33	0.1	0.07	0.28	0.17	0.175	0.125	6	2	2	1	1
Cosmo (2) 7	2.625	0.15	0.33	0.08	0.07	0.27	0.15	0.22	0.155	5	2	2	1	1
Cosmo (2) 8	2.9	0.2	0.34	0.08	0.07	0.29	0.15	0.21	0.165	7	2	2	1	1
Cosmo (2) 9	2.625	0.15	0.33	0.08	0.07	0.28	0.2	0.2	0.125	10	2	2	1	1
Cosmo (2)10	2.625	0.15	0.35	0.08	0.07	0.25	0.19	0.19	0.14	8	2	2	1	1
Cosmo (2) 11	3	0.15	0.33	0.08	0.07	0.28	0.17	0.215	0.155	12	2	2	1	1
Cosmo (2) 12	2.75	0.15	0.33	0.08	0.07	0.28	0.15	0.165	0.125	11	2	2	1	1
Cosmo (2) 13	2.625	0.15	0.35	0.08	0.07	0.25	0.15	0.21	0.165	10	2	2	1	1
Cosmo (4) 1	3.45	0.2	0.3	0.08	0.1	0.22	0.22	0.18	0.125	18	1	2	1	1
Cosmo (4) 2	3.125	0.2	0.3	0.08	0.08	0.22	0.18	0.16	0.12	20	1	2	1	1
Cosmo (4) 3	2.825	0.18	0.3	0.08	0.06	0.18	0.17	0.19	0.115	20	1	2	1	1
Cosmo (4) 4	2.8	0.18	0.3	0.08	0.06	0.2	0.14	0.16	0.12	15	1	2	1	1
Cosmo (4) 5	2.675	0.15	0.28	0.08	0.06	0.22	0.12	0.15	0.105	23	1	2	1	1
Cosmo (4) 6	3.275	0.25	0.3	0.08	0.06	0.25	0.12	0.16	0.125	21	1	2	1	1
Cosmo (4) 7	3.55	0.25	0.3	0.1	0.08	0.2	0.13	0.175	0.13	20	1	2	1	1
Cosmo (4) 8	3.325	0.2	0.3	0.08	0.06	0.22	0.15	0.17	0.125	20	1	2	1	1
Cosmo (4) 9	3.38	0.28	0.3	0.1	0.1	0.21	0.15	0.085	0.0625	17	1	2	1	1
Cosmo (4) 10	3.3	0.2	0.29	0.08	0.08	0.22	0.12	0.09	0.0625	18	1	2	1	1
Cosmo (4) 11	2.76	0.2	0.29	0.08	0.08	0.16	0.11	0.0925	0.0575	20	1	2	1	1
Cosmo (4) 12	2.78	0.18	0.3	0.09	0.07	0.33	0.15	0.085	0.06	15	1	2	1	1

Media	3.1025	0.1608	0.4068	0.0863	0.0821	0.3308	0.1998	0.1694	0.1039	23.45	1.152	1.458	1.152	1.15
Desviación	0.97204	0.0537	0.1023	0.0139	0.0147	0.1038	0.04714	0.0981	0.03451	14.07	0.3620	0.501	0.362	0.362

*Longitud total (LT), ancho del cuerpo (AM), longitud del esófago (LE), poro excretor a región anterior (PE-RA), anillo nervioso a región anterior (AN-RA), largo del bulbo (LB), ancho del bulbo (AB), longitud del huevo (LH), ancho del huevo (AH), dirección de las ramas uterinas (DU), forma de la cola (FC), tipo de ala (TA), papilas en la vulva (PV) y ubicación de la vulva (UV). Los caracteres cualitativos se les dio el valor de 1 o 2 según sea el caso (PV: ausencia 1, presencia 2; DU: prodélfas 1, anfidélfas 2; FC: cónica 1, filamento 2; TA: simple 1, tricúspide 2 y UV: ecuatorial 1, postecuatorial 2

Anexo 2

Diagrama de flujo de los métodos del análisis multivariado al que fueron sometidos los datos de los ejemplares hembras de *Cosmocercidae*.



Análisis de coordenadas principales (PcoA): es un método de análisis estadístico que permite representar en un gráfico de dos a tres dimensiones, objetos descritos por una matriz, para preservar en la medida de lo posible la distancia de las relaciones entre entidades en un espacio euclidiano (Ochoa de la Rosa, 1993).

Análisis discriminante: permite describir las relaciones entre dos o más grupos de observaciones multivariadas de manera que las diferencias entre estos se maximicen, creando un modelo predictivo para la pertenencia al grupo. Este análisis suele aplicarse con fines relacionados a la clasificación de poblaciones u observaciones sobre las cuales no se conocen grupos (Balzarini *et al.*, 2015).

Análisis de coordenadas principales (PcoA): es un método de análisis estadístico que permite representar en un gráfico de dos a tres dimensiones, objetos descritos por una matriz, para preservar en la medida de lo posible la distancia de las relaciones entre entidades en un espacio euclidiano (Ochoa de la Rosa, 1993).

PERMANOVA: es un método estadístico utilizado para analizar datos multivariantes mediante la partición de la variación basada en una medida de disimilitud elegida. Puede acomodar varios factores y diseños, y permite inferencias sin distribución utilizando el algoritmo de las permutaciones (Kenett *et al.*, 2017).

Anexo 3

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE DNA Zymo research Quick-DNA tissue/insect miniprep kit

1. Añadir la muestra en un tubo de lisis ZR BashingBead y agregar 750 μ l del buffer BashingBead.
2. Colocar la muestra en un disruptor celular por 10 minutos.
3. Centrifugar el tubo ZT BashingBead a 12,000 rpm /1 minuto.
4. Transferir 400 μ l del sobrenadante de la muestra a un tubo colector con filtro (zymo-spin III-F) y centrifugar a 10,500 rpm/ 1 minuto.
5. Añadir 1200 μ l del buffer de lisis al tubo colector con filtro.
6. Transferir 800 μ l a un nuevo tubo colector con filtro (zymo-spin II-CR) y centrifugar a 12,000 rpm/1 minuto.
7. Decantar y repetir el paso 6.
8. Agregar 200 μ l de buffer de pre-lavado y centrifugar a 12,000 rpm/ 1 minuto.
9. Agregar 500 μ l de buffer de lavado y centrifugar 12,000 rpm/ 1 minuto.
10. Transferir el filtro del tubo a uno nuevo y agregar 60 μ l del buffer de DNA y centrifugar a 12,000 rpm/ 45 segundos.

Anexo 4

PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN DE DNA Método de polyethylen glycol (PEG)

1. Transferir los productos de PCR a un tubo de 1.5 ml y agregar 20 µl de PEG 20% - NaCl 2.5 M.
2. Incubar en baño maría a 37° C por 20 minutos.
3. Centrifugar a velocidad máxima por 20 minutos.
4. Eliminar el sobrenadante con una pipeta [tratando de no tocar el botón].
5. Agregar 150 µl de etanol al 80% frío [-20° C].
6. Centrifugar a velocidad máxima por 10 minutos-
7. Eliminar el sobrenadante con una pipeta [tratando de no tocar el botón].
8. Agregar 150 µl de etanol al 95% frío [-20 ° C].
9. Centrifugar a velocidad máxima por 10 minutos.
10. Eliminar el sobrenadante con una pipeta [tratando de no tocar el botón].
11. Colocar los tubos en un concentrador de DNA a temperatura media [50–60° C] por 10 minutos [o hasta que todo el alcohol se haya evaporado].
12. Resuspender el botón de DNA en 10-15 µl de dH₂O, dependiendo del tamaño del botón

