

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**CENUR Litoral Norte**

Comparación molecular de estadios adultos y larvales de *Spirometra* sp.  
(Cestoda: Diphylobothriidae) en hospedadores definitivos e intermediarios de  
muestras de Uruguay

**“por”**

**Mauricio Burutarán Panissa**

TESIS DE GRADO presentada como uno de  
los requisitos para obtener el título de Doctor  
en Ciencias Veterinarias  
Orientación: Producción animal

MODALIDAD: ensayo experimental

**SALTO  
URUGUAY  
2018**

## PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

\_\_\_\_\_  
Lic. Oscar F. Castro

Segundo miembro (Tutor):

\_\_\_\_\_  
Dra. María Teresa Armúa

Tercer miembro:

\_\_\_\_\_  
Lic. Eugenio Jara

Cuarto miembro: (Co-tutor)

\_\_\_\_\_  
Dr. José M. Venzal

Fecha:

\_\_\_\_\_  
17 de julio de 2018

**Autor:**

\_\_\_\_\_  
Mauricio Burutarán Panissa

## **Agradecimientos**

A mi familia que me brindó todo lo necesario para culminar esta carrera Universitaria. A familiares y amigos por el apoyo incondicional. Al Laboratorio de Vectores y Enfermedades Transmitidas, al Laboratorio de Parasitología Veterinaria y a la Facultad de Veterinaria por permitirme desarrollar la Tesis de Grado. A la Dra. María Teresa Armúa (Tutora), Dr. José Manuel Venzal (Co-tutor), Dra. María Laura Félix y al Dr. Valentín Bazzano por la ayuda durante el desarrollo de este trabajo. Los Licenciados Oscar Castro y Eugenio Jara por evaluar mi tesis.

## **TABLA DE CONTENIDO**

	<b>Página</b>
PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE TABLAS	6
RESUMEN	7
SUMMARY	9
INTRODUCCIÓN	11
HIPÓTESIS	15
OBJETIVOS	15
Objetivo general	15
Objetivos específicos	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16
Sitio de muestreo y obtención de las muestras	16
Procedimientos	17
EXTRACCIÓN DE ADN	18
REALIZACIÓN DE PCRs	18
Puesta a punto de PCR	18
ANÁLISIS DE SECUENCIA	19
RESULTADOS	19
Muestras obtenidas	19
Clasificación morfológica tentativa	21
Extracción de ADN	21
PCRs	22
Análisis de secuencias	26
DISCUSIÓN	31
CONCLUSIONES	34
BIBLIOGRAFÍA	35

## LISTA DE FIGURAS

<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Ciclo biológico de <i>Spirometra</i> sp.	12
<b>Figura 2.</b> Gel de PCR para el gen COI (subunidad 1 de la citocromo oxidasa). Referencias: Gel superior: carril 1: marcador de peso molecular, carriles 2 a 11: muestras, carril 12: control positivo (P), carril 13: control negativo (N). Gel inferior: carril 1: marcador de peso molecular, carriles 2 y 3: muestras, carril 4: control positivo (P), carril 5: control negativo (N).	24
<b>Figura 3.</b> Gel de PCR para el gen ITS (espaciador interno transcripto). Referencias: Gel superior: carril 1: marcador de peso molecular, carriles 2 a 12: muestras, carril 13: control positivo (P), carril 14: control negativo (N). Gel inferior: carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: vacío, carril 3: muestra, carril 4: control positivo (P), carril 5: control negativo (N).	25
<b>Figura 4.</b> Imagen del alineamiento de las secuencias consenso generadas para cada muestra. Los puntos de diferentes colores representan los pares de bases que son comunes en todas las secuencias.	27
<b>Figura 5.</b> Zorro de campo ( <i>Lycalopex gymnocercus</i> ) atropellado.	28
<b>Figura 6.</b> Zorro de monte ( <i>Cerdocyon thous</i> ) atropellado.	28
<b>Figura 7.</b> Gato montés ( <i>Leopardus geoffroyi</i> ) atropellado.	29
<b>Figura 8.</b> Comadreja mora ( <i>Didelphis albiventris</i> ) atropellada.	29
<b>Figura 9.</b> Plerocercoides en mesenterio de Comadreja mora ( <i>Didelphis albiventris</i> ) (señalados con círculo amarillo).	30
<b>Figura 10.</b> Plerocercoide en subcutáneo de <i>Philodryas patagoniensis</i>	30
<b>Figura 11.</b> <i>Philodryas patagoniensis</i> atropellada.	31

## **LISTA DE TABLAS**

<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Primers utilizados en este trabajo.	18
<b>Tabla 2.</b> Datos de los mamíferos analizados durante el estudio.	20
<b>Tabla 3.</b> Datos de los reptiles analizados durante el estudio.	21
<b>Tabla 4.</b> Muestras de pseudofilídeos utilizadas para obtener ADN.	22
<b>Tabla 5.</b> Resultados de PCRs realizadas a muestras de pseudofilídeos utilizando los cebadores-primers (ITS – COI).	23
<b>Tabla 6.</b> Identidad de las secuencias obtenidas para el gen COI.	26

---

## **RESUMEN**

*Spirometra* sp. (Cestoda: Diphyllbothriidae) es un género de cestodos cuyas especies se encuentran distribuidas a nivel mundial. Así como los otros miembros del orden Pseudophyllidea necesita de dos hospedadores intermediarios y uno definitivo para completar su ciclo biológico. Los proceroides se desarrollan en crustáceos (copépodos) y los plerocercoides en tejidos de una amplia variedad de hospedadores, incluyendo anfibios, reptiles, aves y mamíferos. Ocasionalmente, las formas larvianas pueden parasitar humanos provocando una enfermedad llamada esparganosis. Por otra parte, la fase adulta se desarrolla en el intestino delgado de carnívoros domésticos y silvestres. En Uruguay, se han reportado adultos de *Spirometra* sp. en diferentes estudios realizados en carnívoros domésticos y silvestres, así como también se han reportado plerocercoides tanto en anfibios, como en reptiles y mamíferos. El objetivo de este estudio fue comparar mediante estudios moleculares los estadios adultos y larvales de *Spirometra* sp. en hospedadores definitivos e intermediarios de muestras procedentes de Uruguay. El ADN fue extraído mediante un kit comercial. Las PCRs utilizadas para la identificación molecular de los pseudofilídeos amplifican fragmentos de los genes COI (subunidad 1 de la citocromo oxidasa) e ITS (espaciador interno transcripto). Los amplicones de tamaño esperado obtenidos por PCR fueron purificados y enviados a secuenciar. Para la obtención de las muestras se procesaron un total de 13 mamíferos y seis reptiles. Los mamíferos correspondieron a siete zorros de monte (*Cerdocyon thous*) y uno de campo (*Lycalopex gymnocercus*), un gato montés (*Leopardus geoffroyi*), tres comadreja moras (*Didelphis albiventris*) y un perro doméstico (*Canis familiaris*). En el caso de los reptiles, todas las muestras (n=6) provinieron de la culebra parejera (*Philodryas patagoniensis*). En cuanto a los mamíferos, cuatro de los zorros (4/8), todos *C. thous*, albergaban pseudofilídeos adultos en el intestino delgado. Del único perro utilizado en el estudio también se obtuvo un adulto de pseudofilídeos. El ejemplar de gato montés no albergaba pseudofilídeos. De las tres comadreas analizadas se obtuvieron plerocercoides de pseudofilídeos del mesenterio y paredes de los músculos abdominales. Así mismo, de las parejeras se obtuvieron plerocercoides del subcutáneo, músculo y paredes de órganos. Mediante las PCRs se lograron amplificar 10 de

las 14 muestras obtenidas de adultos y plerocercoides de pseudofilídeos. Siete amplificaron para el fragmento parcial del gen ITS, y 10 para el gen COI, y siete para ambos genes. Las secuencias obtenidas para el gen ITS no poseían una buena calidad y los fragmentos obtenidos no fueron lo suficientemente amplios como para realizar una comparación confiable. Por lo tanto, este gen no fue utilizado para la caracterización de las muestras. En cambio, las secuencias obtenidas para el gen COI fueron de buena calidad y tras las correcciones manuales se obtuvieron fragmentos entre 430 pb y 560 pb. Todas las secuencias obtenidas tanto de ejemplares adultos como de plerocercoides demostraron una identidad de entre 94 y 99% con representantes del género *Spirometra*. En cuanto a nivel específico, hasta el momento no hay ninguna especie de *Spirometra* caracterizada morfológica y molecularmente en nuestra región, por lo que en nuestros resultados tampoco se pudo asignar las secuencias obtenidas a ninguna especie. Aunque cabe destacar que nuestras muestras presentaron una alta identidad (97 a 99%) con adultos obtenidos de un zorro de campo (*L. gymnocercus*) de Argentina, de un zorro Horay (*L. vetulus*) de Brasil, así como también con un plerocercóide de *Crotalus* sp. también de Brasil. Este taxón fue denominado como SPIROMETRA-URU 1. Por otro lado, una muestra de plerocercóide obtenida de una parejera (*P. patagoniensis*) tuvo un 94 y 99% de identidad con muestras de un ocelote (*Leopardus pardalis*) de los Estados de Minas Gerais y Pará, Brasil, respectivamente. Este otro taxón fue denominado como SPIROMETRA-URU 2. Para la realización de trabajos futuros, la conjunción de estudios moleculares y morfológicos será primordial para avanzar en la determinación específica de estos cestodos en nuestra región.

## **SUMMARY**

*Spirometra* sp. (Cestoda: Diphyllbothriidae) is a genus of cestodes which its species are distributed worldwide. As the other members of the order Pseudophyllidea, it needs two intermediate hosts and a definitive one in order to complete their lifecycle. Procercooids develop in crustaceans (copepods) and plerocercoids in tissues of a wide variety of hosts, including amphibians, reptiles, birds and mammals. Occasionally, the larval stages can parasitize humans causing a disease called sparganosis. On the other hand, the adult stage develops in the small intestine of domestic and wild carnivores. In Uruguay, *Spirometra* sp. adults in domestic and wild carnivores, as well as plerocercoids in amphibians, reptiles and mammals have been reported in several studies. The objective of this study was to compare the adult and larval stages of *Spirometra* sp. in definitive and intermediate hosts samples from Uruguay. DNA was extracted using a commercial kit. The PCRs used for the molecular identification of pseudophyllideans amplify fragments of the COI (cytochrome oxidase subunit 1) and ITS (internal transcribed spacer) genes. The amplicons of expected size obtained by PCR were purified and sent for sequencing. For sampling collection, a total of 13 mammals and six reptiles were processed. The mammal samples corresponded to seven crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*) and a pampas fox (*Lycalopex gymnocercus*), a geoffroy's cat (*Leopardus geoffroyi*), three white-eared opossums (*Didelphis albiventris*) and a dog (*Canis familiaris*). In the case of the reptiles, all the samples (n=6) were of the colubrid snake *Philodryas patagoniensis*. Regarding the mammals, four foxes (4/8), all *C. thous*, harbored pseudophyllidean adults in the small intestine. Moreover, a pseudophyllidean adult was obtained in the only dog used in this study. The geoffroy's cat specimen did not harbor any pseudophyllidean. Pseudophyllidean plerocercoids were retrieved from mesentery and the abdominal muscle walls of the three opossums. Likewise, plerocercoids were obtained from subcutaneous, muscles and organ walls from the snakes. Through the PCRs 10 out of 14 samples of adults and pseudophyllidean plerocercoids were obtained. Seven amplified for the partial fragment of the ITS gene, and 10 for the COI gene, and, seven for both genes. The sequences obtained for the ITS gene resulted in poor quality and the fragments obtained were not large enough to make a reliable comparison.

Therefore, this gene was not used for samples characterization. In contrast, the sequences obtained for the COI gene had good quality and after manual corrections, fragments between 430 bp and 560 bp were obtained. All the sequences obtained from both adult and plerocercoid specimens showed an identity between 94 and 99% of the genus *Spirometra*. Regarding the specific level, until now there is no *Spirometra* sp. characterized morphologically and molecularly in our region. Hence, in our results we could not assign the sequences obtained to any species. Although, it is worth mentioning that our samples revealed a high identity (97 to 99%) with adults obtained from a pampas fox (*L. gymnocercus*) of Argentina, a Hoary fox (*L. vetulus*) from Brazil, as well as, a plerocercoid from *Crotatuls* sp. also from Brazil. This taxon was named as SPIROMETRA-URU 1. On the other hand, a plerocercoid sample obtained from a snake revealed an identity of 94 and 99 % with samples of an ocelot (*Leopardus pardalis*) of Minas Gerais and Pará States, Brazil, respectively. This other taxon was named SPIROMETRA-URU 2. For further studies, the combination of molecular and morphological studies will be essential to advance in the species determination of these cestodes in our region.

## **INTRODUCCIÓN**

Los órdenes Cyclophyllidea y Pseudophyllidea concentran la mayoría de las especies de interés médico y veterinario dentro de la clase Cestoda. Y dentro de los pseudofilídeos los géneros *Diphyllobothrium* y *Spirometra* son los que presentan especies de mayor importancia sanitaria (Bowman, 2004).

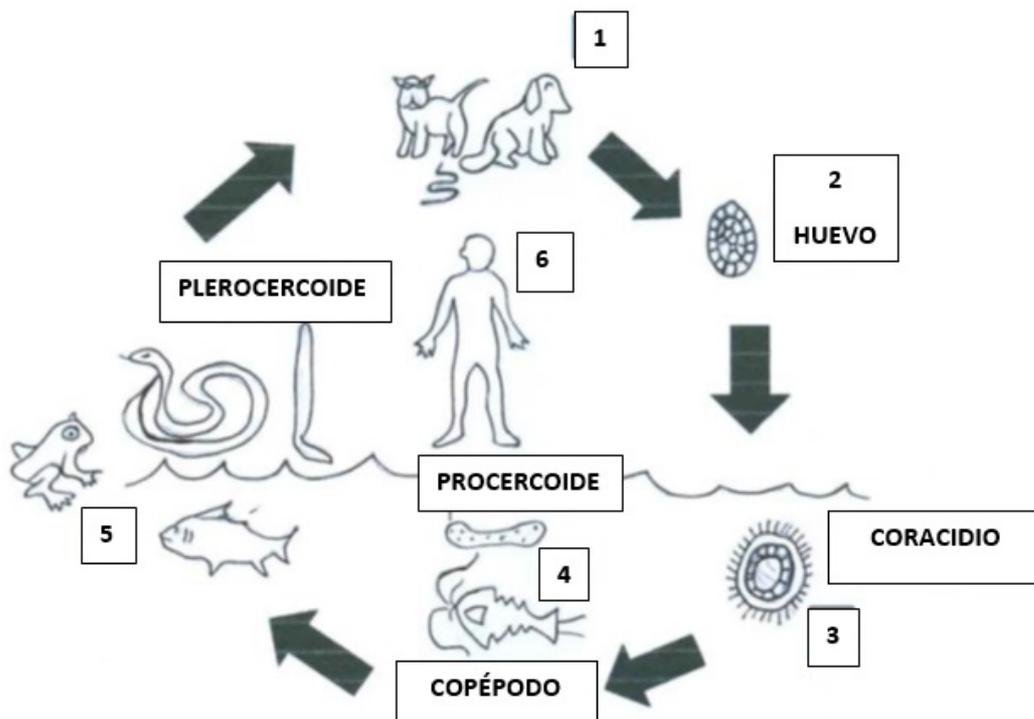
Los pseudofilídeos (Pseudophyllidea) cuentan con una morfología similar a la de los ciclofilídeos (Cyclophyllidea), aunque presentan diferencias remarcables (Urquhart y cols., 2001). En primer lugar, el escólex solamente tiene dos botrios o surcos longitudinales poco profundos para su sujeción en sustitución a las ventosas que se encuentran presentes en el orden Cyclophyllidea. En ambos órdenes los primeros segmentos de la estróbila son indiferenciados, pero a medida que se van distanciando del cuello se van formando ovarios, testículos, glándulas vitelógenas y otros órganos reproductivos. Estos órganos reproductivos maduran gradualmente formando óvulos y esperma, hasta que se produce la fertilización. La otra diferencia importante para destacar es que en los pseudofilídeos los segmentos maduros son más anchos que largos, el útero tiene una posición central y presenta un poro uterino que permite la salida de los huevos. Los segmentos grávidos van excretando huevos hasta que agotan sus reservas en contraposición con los ciclofilídeos en los cuales los proglótidos grávidos se desprenden de la estróbila y se eliminan con las materias fecales (Urquhart y cols., 2001).

El ciclo biológico de los pseudofilídeos requiere dos hospedadores intermediarios. Los huevos son de cáscara fina, color marrón y operculado (Urquhart y cols., 2001). Se desarrollan en un medio acuoso y en pocas semanas eclosionan los coracidios (oncósfera con un embrióforo provisto de cilios que le permite desplazarse en el agua). El coracidio debe ser ingerido por un copépodo (crustáceo) y dentro de la cavidad corporal del mismo se desarrolla la primera fase larvaria, el procercoide. Posteriormente, luego de que el copépodo es ingerido por un pez de agua dulce (en el caso de *Diphyllobothrium* spp.), el procercoide se libera, y migra hacia la musculatura dando lugar a la segunda fase larvaria, plerocercioide, que ya posee el escólex característico de este orden (Urquhart y cols., 2001). Cabe aclarar que, únicamente este estadio es infectante para el hospedador definitivo. El ciclo biológico se completa cuando

el pez infectado es ingerido por el hospedador definitivo (carnívoros, humanos) (Figura 1). Sin embargo, si el pez infectado con el plerocercioide es ingerido por otro pez de mayor tamaño, dicha larva tiene la capacidad de establecerse por sí misma en el nuevo hospedador sin seguir su desarrollo, es decir, manteniéndose como plerocercioide. A este tipo de hospedero se le llama paraténico (Urquhart y cols., 2001).

En el caso de *Spirometra* los adultos se desarrollan en el intestino delgado de perros, gatos y carnívoros salvajes en varios continentes. Los procercoides se desarrollan en crustáceos (ej. copépodos) y los plerocercioides en tejidos de una amplia diversidad de hospedadores, incluyendo anfibios, reptiles, aves y mamíferos (Figura 1).

Figura 1. Esquema del ciclo biológico de *Spirometra* sp.



Referencias: 1 - Hospedadores definitivos. 2 - Huevo. 3 - Coracidio. 4 - Copépodo con procercoide (Primer Hospedador intermediario), 5 - reptiles, anfibios, o mamíferos (Segundos Hospedadores intermediarios conteniendo plerocercioides), 6 - hombre (Hospedador accidental).

En el hombre, ocasionalmente pueden desarrollarse plerocercoides, bien por beber agua con crustáceos portadores de proceroides o al consumir hospedadores parasitados por plerocercoides como anfibios. Esta zoonosis, conocida como esparganosis (*sparganum* es la antigua denominación de estos plerocercoides), se caracterizan por la presencia de larvas de hasta 35 mm de longitud en los músculos y el tejido subcutáneo, especialmente en la zona periorbital, causando edema e inflamación (Urquhart y cols., 2001). Para Uruguay, existen dos reportes de esparganosis, uno subcutáneo (pierna) y otro testicular (Osimani y Peyrallo, 1954; Sakamoto y cols., 2003).

Actualmente, el conocimiento acerca de la taxonomía de *Spirometra* todavía es muy incipiente y necesita una revisión exhaustiva (Kuchta y cols., 2015). Varios autores que han trabajado revisando la literatura de este género han brindado una identificación taxonómica de las especies de *Spirometra*, aunque no existe evidencia que justifique sus diagnósticos (Osimani y Dei-Cas, 1974; Gutierrez y cols., 1977; Venturini, 1989). En la actualidad, se reconocen las siguientes especies: *S. decipiens*, *S. erinaceieuropaei* (= *S. erinacei*), *S. mansoni*, *S. mansonoides* y *S. ranarum* (Jeon y cols., 2015). Adicionalmente, existe un taxón de *Spirometra* aun sin denominar (ya que se desconoce la forma adulta), que es el agente causal de la sparganosis proliferativa en humanos y su forma larvaria se conoce con el nombre de *Sparganum proliferum* (Miyadera y cols., 2001). Un trabajo reciente de Almeida y cols. (2016) reporta la ocurrencia de las menos dos especies de *Spirometra* en Sudamérica, las cuales son diferentes a *S. erinaceieuropaei* y *S. proliferum*. Las similitudes tanto de los adultos como de las formas larvarias dentro de las diferentes especies de estos parásitos hacen imperativo el uso de técnicas moleculares en conjunto con los estudios morfológicos para caracterizar mejor este género en nuestro continente (Kuchta y cols., 2015).

Sobre los registros para el género *Diphyllbothrium* en Uruguay, Holcman-Spector y cols. (1985) hallaron vermes adultos de *Diphyllbothrium* spp. en el 3,9% de perros callejeros de distintas zonas de Montevideo. Posteriormente, Sampaio y cols. (1992) publicaron el hallazgo de *Diphyllbothrium* sp. en perros para Uruguay. Adicionalmente, Cabrera y cols. (1994) determinaron *Diphyllbothrium latum* en el 0,3 % de 303 perros por medio de purgas con bromhidrato de arecolina en el departamento de Florida, y Drocco y Cabrera

(2003) hallaron *Diphyllbothrium* spp. en el 2,5% de los perros en un estudio de taénidos de una población canina perteneciente a un poblado rural.

En cambio, *Spirometra* spp. en Uruguay se han reportado en hallazgos de adultos en perros y gatos domésticos (Osimani y Dei-Cas. 1974; Sampaio y cols., 1987; Castro y cols., 2009; Cabrera y cols., 1994), así como también en carnívoros silvestres como ser gato montés (*Oncifelis geoffroyi*), mano pelada (*Procyon cancrivorus*), zorro de monte (*C. thous*) y zorro de campo (*L. gymnocercus*) (Castro y cols., 2007; Lena y Radcenco, 2017); así como numerosos reportes de larvas (pleroceroides) en anfibios, reptiles y mamíferos. De este modo, Vogelsang (1925) reportó para Uruguay por primera vez larvas de *Spirometra* enquistadas en la musculatura del antebrazo de un anfibio anuro de la especie *Leptodactylus latrans*. Además, Wolffhügel y Vogelsang (1926) hallaron larvas de *Sparganum* en marsupiales autóctonos (*Didelphis albiventris* y *Lutreolina crassicaudata parnalis*), siendo identificadas como *Sparganum reptans*. Para completar su ciclo, dichas larvas fueron usadas para infectar de forma experimental algunos perros, en los cuales se pudo identificar las formas adultas con el nombre de *Dibothriocephalus decipiens* que en la actualidad se clasifica dentro del género *Spirometra*. Dei-Cas y cols. (1976) reportaron también la aparición de esparganos en algunas especies de reptiles de Uruguay, como también en especímenes de *L. latrans* colectados en el Sur del país, en los departamentos de Montevideo, Maldonado y Rocha. Sampaio y cols. (1987) reportaron más recientemente casos de *Spirometra* en gatos domésticos en el departamento de Montevideo. Por último, Borteiro y cols. (2015) reportaron la aparición de esparganos en anfibios de la especie *Hypsiboas pulchellus* (Hylidae) colectados en La Paloma, departamento de Rocha. Estos pocos reportes, se basan en la morfología de los especímenes hallados y no definen, en muchos casos, de que géneros de pseudofilídeos se tratan.

En una reciente revisión Oda y cols. (2016) recopilan los hallazgos de formas larvarias de *Spirometra* en anfibios y reptiles de Sudamérica y además agregan nuevos registros para estos hospedadores en Brasil y Argentina.

Desde el punto de vista morfológico, los dos principales géneros de pseudofilídeos de interés médico y veterinario, *Diphyllbothrium* y *Spirometra*, son semejantes. Pero difieren en algunos detalles como ser que *Spirometra* es de menor tamaño, posee útero más simple y espiralado, que no alcanza la bolsa

del cirro. La vagina y el cirro se abren en forma independiente y este último se encuentra fusionado con la vesícula seminal formando una sola unidad (Valerio y cols., 2004).

Por lo tanto, las herramientas moleculares, en este caso, podrían ser de gran importancia para poder definir y caracterizar los géneros/especies presentes Uruguay y así dar un panorama más claro de la fauna de pseudofilídeos en la región.

## **HIPOTESIS**

- Corresponden los adultos de *Spirometra* sp. hallados en hospedadores definitivos (carnívoros domésticos y silvestres) al mismo taxón (o especie) que los plerocercoides que parasitan hospedadores intermediarios como ser reptiles, anfibios, y/o mamíferos en Uruguay.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general:**

- Comparar mediante estudios moleculares los estadios adultos y larvales de *Spirometra* sp. (Cestoda: Diphylobothriidae) en hospedadores definitivos e intermediarios de muestras procedentes de Uruguay.

### **Objetivos específicos:**

- Determinar mediante técnicas moleculares la identidad específica de *Spirometra* sp. (Cestoda: Diphylobothriidae) en sus hospedadores definitivos e intermediarios de muestras obtenidas en Uruguay.
- Poner a punto las PCRs para la identificación de cestodos utilizando cebadores (primers) que amplifiquen los genes más frecuentemente utilizados para estos.

- Analizar la relación de el o los taxones obtenidos de *Spirometra* sp. en Uruguay con la de otra/s especie/s cuyas secuencias se encuentren depositadas en Genbank.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Obtención de material de hospedadores definitivos e intermediarios**

**Adultos de *Spirometra* spp.:** se obtuvieron muestras de los hospedadores definitivos carnívoros domésticos y silvestres a partir de diferentes fuentes.

Las muestras provenientes de perros domésticos se encontraban depositadas y conservadas en alcohol 70-95° en el Departamento de Parasitología Veterinaria, Facultad de Veterinaria, Montevideo, UdelaR.

En cuanto a carnívoros silvestres se obtuvo nuevo material a partir de ejemplares enteros o tractos digestivos de zorros de monte (*C. thous*) y zorros de campo (*L. gymnocercus*) que se encontraban congelados en el Laboratorio de Vectores y Enfermedades transmitidas, y Laboratorio de Parasitología Veterinaria, CENUR Litoral Norte – Salto, así como de nuevos zorros que se obtuvieron de ejemplares atropellados accidentalmente de rutas nacionales y caminos vecinales del país. De la misma forma que de animales domésticos, de zorros se aprovechó material ya obtenido y que se encontraba depositado en las instituciones anteriormente mencionadas, así como de material proveniente de una reciente tesis de grado: Endoparásitos del zorro de campo (*L. gymnocercus*) y zorro de monte (*C. thous*) de la región noroeste del Uruguay (Lena y Radcenco, 2017). Uno de los inconvenientes fue que el protocolo de dicha tesis incluía el pasaje por 24 horas del material en formol, lo cual puede afectar la calidad del ADN las muestras.

**Formas larvarias de *Spirometra* sp.:** teniendo en cuenta que los proceroides son pequeños y habría que obtenerlos de crustáceos copépodos, las muestras de larvas que se procesaron fueron de plerocercoides que se obtuvieron de mamíferos (marsupiales didélfidos) y reptiles (culebras). Estos hospedadores al igual que los zorros fueron ejemplares hallados atropellados en rutas y caminos.

**IMPORTANTE:** Cabe destacar que todos los hospedadores que fueron utilizados para obtener las muestras de esta tesis ya se encontraban muertos al momento de ser colectados. Por lo tanto, no fue necesario contar con la aprobación previa de la Comisión de Bioética.

### **Procedimiento**

Para la obtención de los cestodos adultos, en el caso de carnívoros domésticos y silvestres se realizó la apertura del animal mediante un corte longitudinal medio ventral y se retiró el tracto digestivo el cual se seccionó y separó el esófago, estómago, intestino delgado e intestino grueso, diferenciando el ciego del resto. Las diferentes secciones del tracto digestivo se cortaron longitudinalmente utilizando un enterótomo y su contenido se obtuvo mediante el lavado con agua en una copa de sedimentación según la metodología propuesta por Castro y col. (2009).

Al sedimento obtenido se le realizó la lectura bajo una lupa estereoscópica para la búsqueda de ejemplares de pseudofilídeos los cuales fueron lavados en agua destilada y conservados en alcohol 95% hasta su procesamiento. Los helmintos hallados durante dicho trabajo fueron recolectados y conservados en alcohol 70% o 95%, para futuras investigaciones.

El contenido de materia fecal del recto se utilizó para realizar la técnica de sedimentación simple identificando por morfología los huevos de pseudofilídeos. En cambio, para obtener formas inmaduras de pseudofilídeos en hospedadores intermediarios y/o paraténicos como ser culebras y mamíferos didélfidos (comadreas), se realizó de la siguiente manera. Las culebras se procesaron inmediatamente de colectadas o se trabajó con material descongelado disponible de colectas anteriores. Se les realizó una incisión ventro-medial y se extrajo la piel realizando la búsqueda de plerocercoides en el tejido subcutáneo, músculos y diferentes órganos. En las comadreas los plerocercoides se obtuvieron de órganos y tejidos, para lo cual se realizó la apertura ventro-medial del animal, con la posterior extracción de vísceras realizando la búsqueda y extracción de los mismos en sitios como peritoneo y paredes de cavidad abdominal. Las muestras extraídas también fueron conservadas en alcohol 95% hasta su procesamiento para biología molecular.

## **Detección molecular de ADN de Pseudophyllidea mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

La extracción de ADN se realizó a partir de las muestras de adultos y plerocercoides de pseudofilídeos obtenidos utilizando el kit comercial GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific).

El ADN extraído se cuantificó mediante el uso de un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

Para la identificación molecular de los pseudofilídeos se realizaron PCRs que amplificaron dos fragmentos de los genes COI (subunidad 1 de la citocromo oxidasa) e ITS (espaciador interno transcripto) utilizando los protocolos descritos por Almeida y cols., (2016), Bowles y cols. (1992) y Král'ová y cols. (2001).

Las secuencias de los primers utilizados se detallan en la tabla 1.

Como control positivo se utilizó una muestra de *Coenurus cerebralis* extraída de bovino la cual fue previamente secuenciada (Buroni y cols., 201X).

Los productos resultantes de las PCRs se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, teñidos con GoodView™ Nucleic Acid Stain (Beijing SBS Genetech Co. LTd), y visualizados bajo un transiluminador UV.

Los amplicones del tamaño esperado fueron purificados utilizando el kit comercial GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific) y enviados a secuenciar a la empresa Macrogen (Corea del Sur).

**Tabla 1. Primers utilizados en este trabajo.**

<b>Primers</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Referencia</b>
<b>ITS Fw</b>	5'-GTCGTAACAAGGTTTCCGTA-3'	Král'ová y cols., 2001
<b>ITS Rv</b>	5'-TATGCTTAAATTCAGCGGGT-3'	
<b>COI Fw</b>	5'TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT3'	Bowles y cols., 1992
<b>COI Rv</b>	5'TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG3'	
<b>COI pr-a</b>	5'-TGGTTTTTTGTGCATCCTGAGGTTTA-3'	Almeida y cols., 2016
<b>COI pr-b</b>	5'-AGAAAGAACGTAATGAAAATGAGCAAC-3'	

## **Análisis de las secuencias**

Para el estudio de la identidad, las secuencias obtenidas fueron corregidas manualmente observando los cromatogramas de ambas secuencias y se generaron secuencias consenso utilizando el programa MEGA 7 (Kumar y col., 1994). El alineamiento de todas las secuencias consenso se realizó con el programa BioEdit (Hall, 1999). Asimismo, cada secuencia consenso fue comparada con las disponibles en el GenBank mediante la búsqueda BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

## **RESULTADOS**

### **Muestras obtenidas**

Para la obtención de las muestras se procesaron un total de 13 mamíferos y seis reptiles (Tabla 2, 3). Los mamíferos correspondieron a siete zorros de monte (*C. thous*) (Figura 6) y uno de campo (*L. gymnocercus*) (Figura 5), un gato montés (*L. geoffroyi*) (Figura 7), tres comadreja moras (*D. albiventris*) (Figura 8) y un perro doméstico (*C. familiaris*) (Tabla 2). En el caso de los reptiles, todas las muestras (n=6) provinieron de la culebra parejera (*P. patagoniensis*) (Figura 11; Tabla 3).

En cuanto a los mamíferos, cuatro de los zorros (4/8) tuvieron pseudofilídeos adultos en el intestino delgado, todos los zorros positivos correspondieron a *C. thous*. Del único perro utilizado en el estudio también se obtuvo un adulto de pseudofilídeos, aunque hay que resaltar que esta muestra no se obtuvo mediante necropsia si no que el cestodo fue expulsado en heces por el animal. El ejemplar de gato montés (*L. geoffroyi*) no albergaba pseudofilídeos. De las tres *D. albiventris* analizadas se obtuvieron plerocercoides de pseudofilídeos del mesenterio y paredes de los músculos abdominales (Figura 9).

Así mismo, de las parejeras (*P. patagoniensis*) se obtuvieron plerocercoides del subcutáneo, músculo y paredes de órganos (Figura 10).

**Tabla 2.** Datos de los mamíferos analizados durante el estudio.

<b>Código</b>	<b>Especie</b>	<b>Sexo</b>	<b>Sitio colecta</b>	<b>Fecha</b>	<b>Pseudofilídeos</b>
<b>Z49</b>	<i>Cerdocyon thous</i>	Macho	Ruta 1, km 67, San José	17/06/2017	<b>+</b>
<b>Z59</b>	<i>Cerdocyon thous</i>	Macho	Ruta 3, Km460, Paysandú	24/06/2017	<b>-</b>
<b>Z64</b>	<i>Cerdocyon thous</i>	Hembra	Ruta 3, Km 427, Paysandú	29/01/2018	<b>-</b>
<b>Z68</b>	<i>Cerdocyon thous</i>	Hembra	Ruta 31, Km 34, Salto	10/06/2017	<b>+</b>
<b>Z69</b>	<i>Cerdocyon thous</i>	Macho	Ruta 31, Km 30, Salto	11/01/2018	<b>+</b>
<b>Z71</b>	<i>Cerdocyon thous</i>	Macho	Ruta 5, Km 427, Rivera	16/01/2018	<b>+</b>
<b>Z73</b>	<i>Lycalopex gymnocercus</i>	Macho	Ruta 11, Km123, Canelones	30/01/2018	<b>-</b>
<b>Z75</b>	<i>Cerdocyon thous</i>	Macho	Ruta 2, Km 269, Soriano	15/01/2018	<b>-</b>
<b>W36</b>	<i>Leopardus geoffroyi</i>	Macho	Ruta 31, Km 187, Tacuarembó	17/01/2018	<b>-</b>
<b>P01</b>	<i>Canis familiaris</i>	Macho	Montevideo	13/06/2017	<b>+</b>
<b>W09</b>	<i>Didelphis albiventris</i>	Hembra	Tambores, Tacuarembó	07/04/2016	<b>+</b>
<b>W22</b>	<i>Didelphis albiventris</i>	Macho	Ruta 2, km 287, Mercedes - Soriano	18/09/2016	<b>+</b>
<b>W24</b>	<i>Didelphis albiventris</i>	Macho	Ruta 27, km 61, Tres Puentes - Rivera	26/10/2016	<b>+</b>

\* Este perro viajó durante el verano 2016-2017 a Punta del Diablo, Rocha.

**Tabla 3.** Datos de los reptiles analizados durante el estudio.

<b>Código</b>	<b>Especie</b>	<b>Sitio colecta</b>	<b>Fecha</b>	<b>Pseudofilídeos</b>
<b>V10</b>	<i>Philodryas patagoniensis</i>	Establecimiento "El Relincho" - Paysandú	11/07/2015	+
<b>V11</b>	<i>Philodryas patagoniensis</i>	Establecimiento "El Relincho" - Paysandú	11/05/2015	+
<b>V14</b>	<i>Philodryas patagoniensis</i>	Ruta 3, km 536.9, Puente Arroyo Palomas - Salto	11/02/2016	+
<b>V18</b>	<i>Philodryas patagoniensis</i>	Barrio Artigas, Salto-Salto	17/10/2016	+
<b>V19</b>	<i>Philodryas patagoniensis</i>	Ruta 3, km 476, Puente Daymán - Paysandú	30/09/2015	+
<b>V23</b>	<i>Philodryas patagoniensis</i>	Ruta 3, km 512 - Salto	11/02/2016	+

### **Clasificación morfológica tentativa y extracción de ADN**

Todos los ejemplares adultos de pseudofilídeos obtenidos en los zorros de monte (*C. thous*) son compatibles con *Spirometra* sp. ya que los poros genitales femenino y masculino se encuentran separados. En cambio, el único ejemplar obtenido de perro no se pudo clasificar en forma genérica debido a que no se observaron ciertas estructuras.

En cuanto a las formas larvares, plerocercoides, obtenidos en comadrejas moras (*D. albiventris*) y culebras (*P. patagoniensis*), es imposible diferenciarlos morfológicamente hasta nivel genérico.

Las concentraciones de ADN resultantes de las muestras de fragmentos de adultos y ejemplares enteros de plerocercoides fueron relativamente bajas, salvo las muestras de plerocercoides de los hospedadores V18, W09 y W22 de las que se obtuvo una concentración de 149,6, 135,5 y 191,6 ng/ul respectivamente, la cual podemos considerarla como buena (Tabla 4). Incluso de dos muestras de adultos, Z69 y Z71, no se obtuvo ADN en la extracción.

**Tabla 4.** Muestras de pseudofilídeos utilizadas para obtener ADN.

<b>Código</b>	<b>Estadio de pseudofilídeo</b>	<b>Hospedador</b>	<b>Clasificación morfológica tentativa</b>	<b>ADN extraído (ng/ul)</b>
<b>Z49</b>	adulto	<i>C. thous</i>	<i>Spirometra</i>	3,1
<b>Z68</b>	adulto	<i>C. thous</i>	<i>Spirometra</i>	7,1
<b>Z69</b>	adulto	<i>C. thous</i>	<i>Spirometra</i>	0,0
<b>Z71</b>	adulto	<i>C. thous</i>	<i>Spirometra</i>	0,0
<b>P01</b>	adulto	<i>C. familiaris</i>	SD*	28,2
<b>V10</b>	pleroceroide	<i>P. patagoniensis</i>	SD*	2,2
<b>V11</b>	pleroceroide	<i>P. patagoniensis</i>	SD*	11,8
<b>V14</b>	pleroceroide	<i>P. patagoniensis</i>	SD*	15,3
<b>V18</b>	pleroceroide	<i>P. patagoniensis</i>	SD*	149,6
<b>V19</b>	pleroceroide	<i>P. patagoniensis</i>	SD*	27,9
<b>V23</b>	pleroceroide	<i>P. patagoniensis</i>	SD*	9,5
<b>W09</b>	pleroceroide	<i>P. patagoniensis</i>	SD*	135,5
<b>W22</b>	pleroceroide	<i>P. patagoniensis</i>	SD*	191,6
<b>W24</b>	pleroceroide	<i>P. patagoniensis</i>	SD*	36,4

\*SD: sin determinar

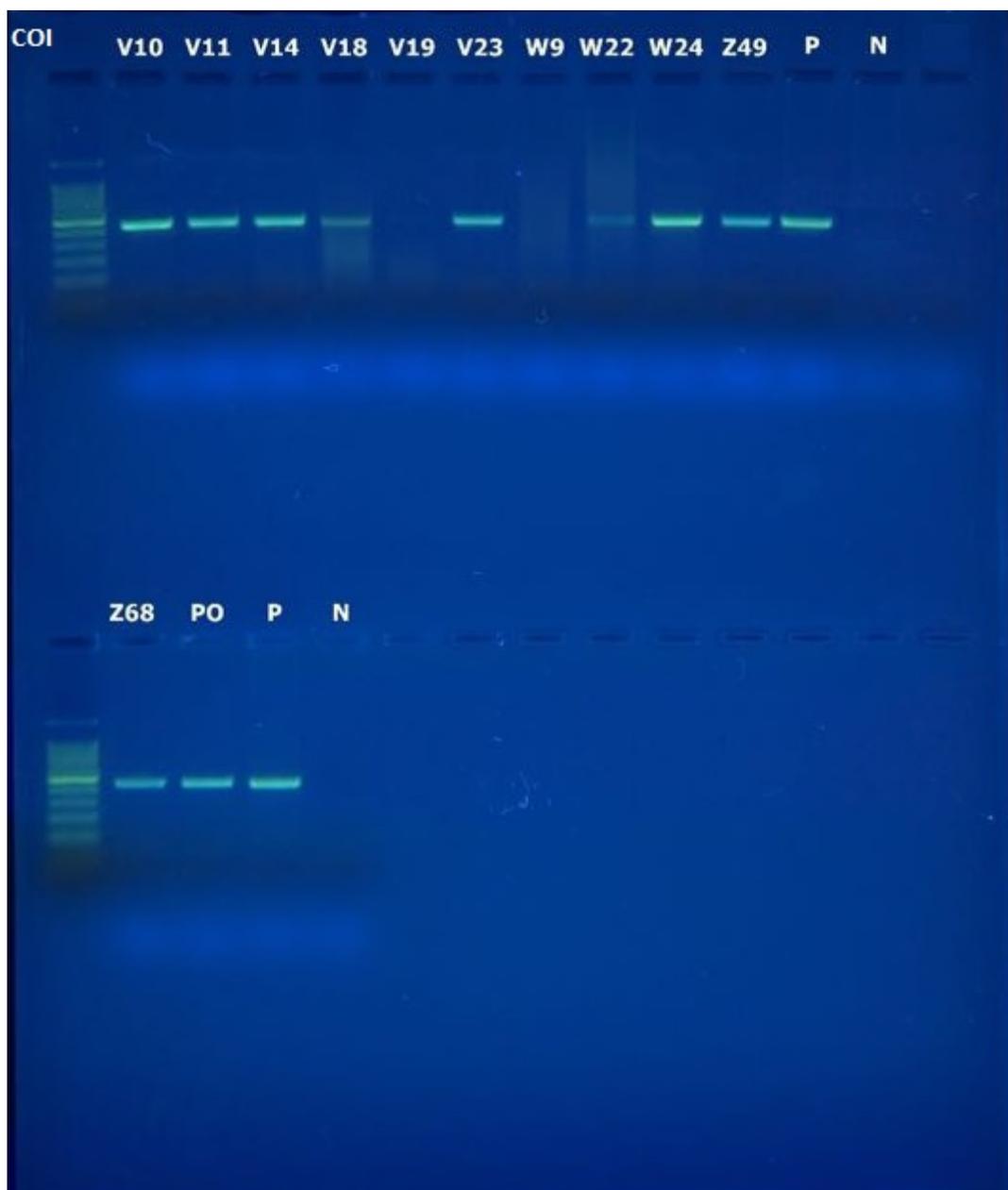
### **PCR**

Las muestras Z69 y Z71 no fueron procesadas debido a la ausencia de ADN en la extracción. Por lo tanto, se realizaron PCRs a 12 de las 14 muestras iniciales. De éstas, 7 muestras amplificaron para el fragmento parcial del gen ITS, y 10 para el gen COI. Siete de estas muestras amplificaron para ambos genes (tabla 5, Figuras 2 y 3).

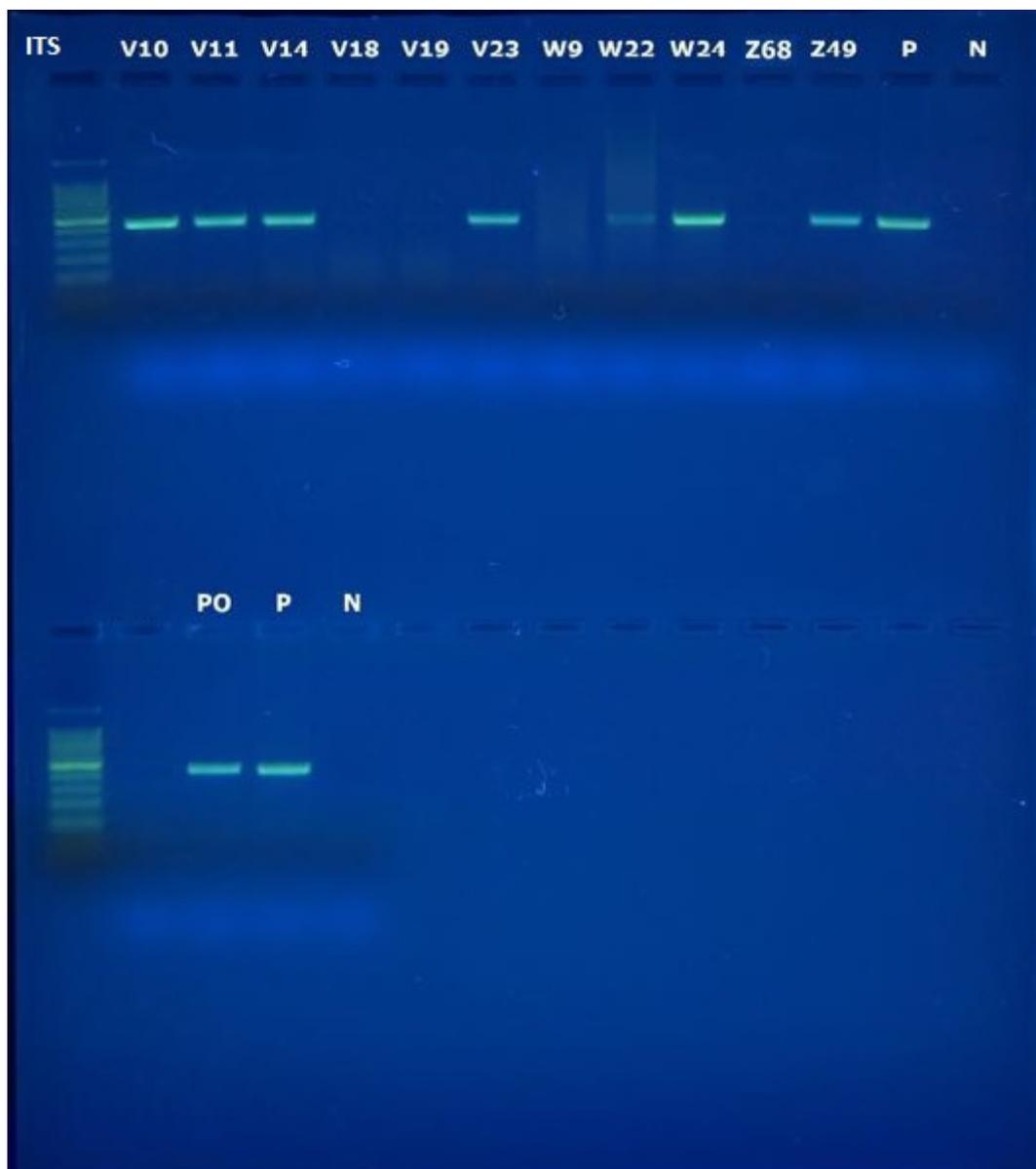
**Tabla 5.** Resultados PCRs realizadas a muestras de pseudofilídeos utilizando los cebadores-primers (ITS – COI).

<b>Código</b>	<b>Estadio de pseudofilídeo</b>	<b>Hospedador</b>	<b>Clasificación morfológica tentativa</b>	<b>ITS</b>	<b>COI</b>
<b>Z49</b>	Adulto	<i>C. thous</i>	<i>Spirometra</i>	+	+
<b>Z68</b>	Adulto	<i>C. thous</i>	<i>Spirometra</i>	-	+
<b>P01</b>	Adulto	<i>C. familiaris</i>	SD*	-	+
<b>V10</b>	pleroceroide	<i>P. patagoniensis</i>	SD*	+	+
<b>V11</b>	pleroceroide	<i>P. patagoniensis</i>	SD*	+	+
<b>V14</b>	pleroceroide	<i>P. patagoniensis</i>	SD*	+	+
<b>V18</b>	pleroceroide	<i>P. patagoniensis</i>	SD*	-	+
<b>V19</b>	pleroceroide	<i>P. patagoniensis</i>	SD*	-	-
<b>V23</b>	pleroceroide	<i>P. patagoniensis</i>	SD*	+	+
<b>W9</b>	pleroceroide	<i>P. patagoniensis</i>	SD*	-	-
<b>W22</b>	pleroceroide	<i>P. patagoniensis</i>	SD*	+	+
<b>W24</b>	pleroceroide	<i>P. patagoniensis</i>	SD*	+	+

**Figura 2.** Gel de PCR para el gen COI (subunidad 1 de la citocromo oxidasa). Referencias: Gel superior: carril 1: marcador de peso molecular, carriles 2 a 11: muestras, carril 12: control positivo (P), carril 13: control negativo (N). Gel inferior: carril 1: marcador de peso molecular, carriles 2 y 3: muestras, carril 4: control positivo (P), carril 5: control negativo (N).



**Figura 3.** Gel de PCR para el gen ITS (espaciador interno transcripto). Referencias: Gel superior: carril 1: marcador de peso molecular, carriles 2 a 12: muestras, carril 13: control positivo (P), carril 14: control negativo (N). Gel inferior: carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: vacío, carril 3: muestra, carril 4: control positivo (P), carril 5: control negativo (N).



**Tabla 6.** Identidad de las secuencias obtenidas del gen COI.

Muestra	Género / especie	Identidad: pb y %	N° GenBank	Hospedador	País
V10	<i>Spirometra</i> sp.	379/382 (99%)	KF572950	<i>Lycalopex gymnocercus</i>	Argentina
V11	<i>Spirometra</i> sp.	371/374 (99%)	KF572950	<i>Lycalopex gymnocercus</i>	Argentina
V14	<i>Spirometra</i> sp.	366/368 (99%)	KF572950	<i>Lycalopex gymnocercus</i>	Argentina
V18	<i>Spirometra</i> sp.	366/368 (99%)	KF740506	<i>Leopardus pardalis</i>	Brasil
	<i>Spirometra</i> sp.	345/368 (94%)	KF740507	<i>Leopardus pardalis</i>	Brasil
V23	<i>Spirometra</i> sp.	353/354 (99%)	KF572950	<i>Lycalopex gymnocercus</i>	Argentina
W22	<i>Spirometra</i> sp.	349/356 (98%)	KF572950	<i>Lycalopex gymnocercus</i>	Argentina
	<i>Spirometra</i> sp.	169/175 (97%)	KT375457	<i>Lycalopex vetulus</i>	Brasil
	<i>Spirometra</i> sp.	169/174 (97%)	KT375456	<i>Crotalus</i> sp.	Brasil
W24	<i>Spirometra</i> sp.	336/339 (99%)	KF572950	<i>Lycalopex gymnocercus</i>	Argentina
Z49	<i>Spirometra</i> sp.	370/373 (99%)	KF572950	<i>Lycalopex gymnocercus</i>	Argentina
Z68	<i>Spirometra</i> sp.	370/373 (99%)	KF572950	<i>Lycalopex gymnocercus</i>	Argentina
P01	<i>Spirometra</i> sp.	379/382 (99%)	KF572950	<i>Lycalopex gymnocercus</i>	Argentina

### **Análisis de las secuencias**

De todas las muestras amplificadas se obtuvieron secuencias utilizando ambos primers. Se alinearon las secuencias complementarias para cada muestra utilizando el programa MEGA 7 (Kumar y col., 1994) y se generaron secuencias consenso que fueron comparadas mediante la herramienta BLASTn con otras secuencias de pseudofilídeos depositadas en el GenBank. El alineamiento de todas las secuencias consenso del gen COI esta representado en la figura 4.

Algunas de las secuencias obtenidas para el gen ITS no fueron de buena calidad y los fragmentos obtenidos no fueron lo suficientemente amplios como para realizar una comparación confiable. Además, para este gen prácticamente no existen secuencias de pseudofilídeos de la región, por lo que se optó por no utilizar las secuencias obtenidas de este gen para esta tesis. En cambio, las secuencias obtenidas para el gen COI fueron de buena calidad y tras las correcciones manuales se obtuvieron fragmentos entre 430 pb (P01) y 560 pb (W22).

Los resultados de la identidad de estas secuencias comparadas con otras del GenBank se muestran en la Tabla 6.

Todas las secuencias obtenidas tanto de ejemplares adultos como de plerocercoides demostraron una identidad de entre 94 y 99% con representantes del género *Spirometra*.

Las muestras de plerocercoides V10, V11, V14, V23, W22 y W24 y de adultos Z49, Z68 y P01 tienen una alta identidad de entre 98 y 99% con una muestra determinada como *Spirometra* sp. obtenida a partir de huevos de *Spirometra* sp. de un zorro de campo (*L. gymnocercus*) de Argentina (KF572950). Y además la secuencia W24 tiene un 97% de identidad con *Spirometra* sp. de muestras del zorro Horay (*Lycalopex vetulus*) (KT375457) y de un plerocercoides (“sparganun”) de *Crotalus* sp. (KT375456), ambas de Brasil. A este taxón lo denominaremos SPIROMETRA-URU 1.

Por otro lado, la muestra de plerocercoides V18, presenta un 99 y 94% de identidad con secuencia correspondientes a *Spirometra* sp. obtenidas de ocelote (*Leopardus pardalis*) en los Estados de Pará y Minas Gerais, Brasil (KF40506, KF40507 respectivamente). Esta otra será mencionada como SPIROMETRA-URU 2.

**Figura 4.** Imagen del alineamiento de las secuencias consenso generadas para cada muestra del gen COI. Los puntos de diferentes colores representan los pares de bases que son comunes en todas las secuencias.



**Figura 5.** Zorro de campo (*Lycalopex gymnocercus*) atropellado



**Figura 6.** Zorro de monte (*Cerdocyon thous*) atropellado.



**Figura 7.** Gato montés (*Leopardus geoffroyi*) atropellado.



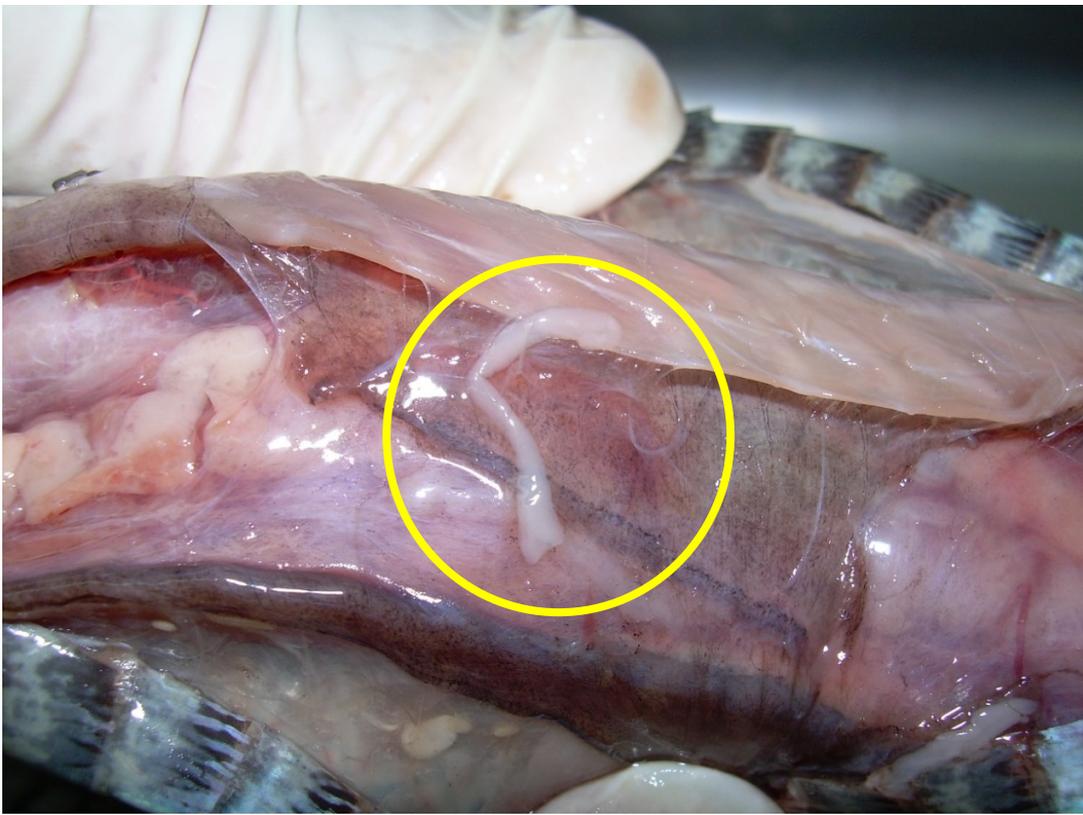
**Figura 8.** Comadreja mora (*Didelphis albiventris*) W 37



**Figura 9.** Plerocercoides en mesenterio de Comadreja mora (*D. albiventris*).



**Figura 10.** Plerocercoides en *Philodryas patagoniensis*.



**Figura 11.** *Philodryas patagoniensis* atropellada.



## **DISCUSIÓN**

Hasta la fecha en Uruguay los reportes de pseudofilídeos tanto del género *Diphyllobothrium* como *Spirometra* se han basado en la identificación de huevos, plerocercoides y ejemplares adultos únicamente mediante morfología. Y si bien la diferenciación morfológica no representaría mayores problemas a nivel genérico, en el caso de *Spirometra* sí es un problema a nivel específico.

En un reciente trabajo, Kuchta y cols. (2015) recomiendan usar técnicas moleculares en conjunto con los estudios morfológicos para caracterizar este género en nuestro continente debido a las similitudes morfológicas tanto de los adultos como de las formas larvianas de las diferentes especies de este grupo de parásitos.

Es por ello, que los trabajos más recientes sobre este grupo de cestodos se han basado en métodos moleculares donde se estudian secuencias parciales de genes como la subunidad 1 de la citocromo oxidasa (COI). Basados en esto Almeida y cols. (2016) reportan la ocurrencia de al menos dos especies de

*Spirometra* en Sudamérica, las cuales son diferentes a *S. erinaceieuropaei* y *S. proliferum*, ampliamente citadas en la bibliografía mundial.

En los resultados obtenidos en nuestro trabajo en el cual se estudiaron muestras de plerocercoides provenientes de reptiles (culebras) y marsupiales didélfidos y de adultos de carnívoros domésticos (perro) y silvestres (zorros), todas las secuencias parciales obtenidas para el gen COI demostraron que las muestras pertenecían a ejemplares del género *Spirometra*. Lo cual es de esperar ya que las muestras provenían de mamíferos y reptiles cuyas localidades están alejadas de áreas marítimas y costeras cuyas condiciones favorecerían al desarrollo de *Diphyllbothrium* sp.

En cuanto a nivel específico, hasta el momento no hay ninguna especie de *Spirometra* caracterizada morfológica y molecularmente en nuestra región, por lo que en nuestros resultados tampoco se pudo asignar las secuencias obtenida a ninguna especie.

Mediante la comparación de las secuencias con las depositadas en el GenBank determinamos la presencia de dos taxones pertenecientes al género *Spirometra*, relacionados con taxones hallados previamente en la región.

Uno de ellos, que denominamos SPIROMETRA-URU 1, y que resultó ser la secuencia más frecuente ya que se obtuvo en 9 de las 10 muestras, tuvo una identidad de entre 98 y 99% con *Spirometra* sp. obtenida de un zorro de campo (*L. gymnocercus*) de Argentina (Petrih y cols., 2015). Estas muestras también tuvieron una alta identidad con secuencias obtenidas de material provenientes de *Lycalopex vetulus* y de un plerocercoides de *Crotalus durissus* de Brasil (Almeida y cols. 2016). Este resultado es esperable ya que adultos de *Spirometra* sp. ha sido reportados en zorros de la región como ser *C. thous* y *L. gymnocercus*, así como en perros (Cabrera y col., 1994; Scioscia y cols., 2014; Ruas y cols., 2008; Oda y cols., 2016).

Así mismo, la mayoría de las secuencias obtenidas de los plerocercoides pertenecían a este mismo taxón, por lo que probablemente los zorros y perros se parasitan al ingerir estas formas larvarias a partir de reptiles (culebras), marsupiales didélfidos (comadreja) u otros vertebrados como anfibios que serían los segundos hospedadores intermediarios. En la literatura para Uruguay y demás países de la región existen numerosos reportes de plerocercoides en reptiles, anfibios y comadreja (Oda y cols., 2016). Por lo tanto, estos hallazgos

concuerdan con los resultados obtenidos en Brasil por Almeida y cols. (2016), ya que *Crotalus durissus* es un ofidio conocido comúnmente como “cascabel” y fue el hospedador donde se halló el plerocercóide cuya secuencia es similar a SPIROMETRA-URU 1.

El otro taxón, SPIROMETRA-URU 2, provino de una única muestra de plerocercóide obtenido de la culebra *P. patagoniensis* (V18) la cual fue recogida atropellada en los alrededores de la ciudad de Salto (Barrio Artigas). La secuencia de esta muestra tuvo un alto porcentaje de identidad (94-99%) con secuencias de *Spirometra* sp. provenientes del felino silvestre ocelote (*Leopardus pardalis*) de Brasil (Almeida y cols., 2016). En la literatura regional existen reportes de *Spirometra* sp. parasitando félidos silvestres (Castro y cols., 2007; Vieira y cols., 2008; Gressler y cols., 2016). Por este motivo, se incluyó en esta tesis un ejemplar de gato montés, pero el mismo resultó no estar parasitado con pseudofilídeos.

La puesta a punto de los protocolos de PCR fue llevada a cabo utilizando ADN extraído en este trabajo, así como de ADN de un ejemplar de *Coenurus cerebralis* que se encontraba disponible en el Laboratorio de Vectores y Enfermedades transmitidas, en el CENUR-Salto. El protocolo para el fragmento del gen COI mostró bandas del tamaño esperado siguiendo el protocolo descrito por Bowles y col, 1992. Sin embargo, para el gen ITS, no todas las muestras pudieron ser amplificadas siguiendo el protocolo original (Král'ová, y col, 2001). Por lo tanto, se realizaron varias rondas de PCR para intentar mejorar la amplificación aumentando el número de ciclos (de 30 a 35), y se realizó un gradiente de 5 grados (55° a 50°C) sin haber cambios en el resultado. Por lo tanto, se concluyó que, si bien ambos protocolos de PCR amplificaron bandas del tamaño esperado, la PCR para el gen ITS mostró ser menos eficiente y varias de las muestras no pudieron ser amplificadas. Así mismo, luego de la secuenciación, la calidad de las secuencias obtenidas del gen ITS fue baja y en muchos casos fue no interpretable ya que no pudo obtenerse información luego de hacer la búsqueda con la herramienta BLASTn. Uno de los mayores inconvenientes para la caracterización del género *Spirometra* es el escaso número de secuencias de otros genes diferentes a COI para pseudofilídeos depositados en GenBank, especialmente los de taxones de la región. Cabe destacar, que, si bien el gen ITS es utilizado para la caracterización molecular

de varios cestodes a nivel mundial, no se cuenta hasta la fecha con secuencias regionales disponibles a fin de ser comparadas con las obtenidas en este trabajo. De continuar estos trabajos, la conjunción de estudios moleculares y morfológicos permitirá avanzar en la determinación específica de estos cestodos, lo cual como ya ha sido mencionado por otros autores, continúa siendo muy confusa (Kuchta y cols., 2015).

## **CONCLUSIONES**

Las secuencias parciales del gen COI de muestras de adultos y plerocercoides de pseudofilídeos provenientes de carnívoros domésticos y silvestres, así como reptiles y mamíferos didélfidos demostraron que hay al menos dos taxones correspondientes al género *Spirometra* en Uruguay.

Los estudios taxonómicos basados en el uso en conjunto de técnicas morfológicas y moleculares será a futuro la forma de poder determinar a nivel específico los taxones presentes de pseudofilídeos en la región.

## **BIBLIOGRAFÍA CITADA**

1. Almeida, G.G., Coscarelli, D., Melo, M.N., Melo, A.L. and Pinto, H.A., (2016). Molecular identification of *Spirometra* spp. (Cestoda: Diphylobothriidae) in some wild animals from Brazil. *Parasitology International*, 65(5):428-431.
2. Borteiro, C., Castro, O., Sabalsagaray, M.J., Kolenc, F., Debat, C.M., Ubilla, M., (2015). Spargana in the Neotropical frog *Hypsiboas pulchellus* (Hylidae) from Uruguay. *North-Western Journal of Zoology*, 11(1):171-173.
3. Bowles, J., Blair, D., McManus, D.P., (1992). Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 54(2):165-173.
4. Bowman, D.D., Eberhard, M.L., Lynn, R.C., (2004). *Georgis parasitología para veterinarios*. 8ª ed. Madrid. Elsevier, 480 pp.
5. Cabrera, P., Parietti, S., Harán, G., Botto, T., Benavidez, U., Valledor, S., Perera, G., Lloyd, S., Gemmell, M. (1994). Dinámica de transmisión de *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena* y *Taenia ovis* en perros del Departamento de Florida, Uruguay. III Jornadas Técnicas de la Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay, p. 28.
6. Castro, O., Venzal, J.M., Felix, M.L., (2009). Two new records of helminth parasites of domestic cat from Uruguay: *Alaria alata* (Goeze, 1782) (Digenea, Diplostomidae) and *Lagochilascaris major* Leiper, 1910 (Nematoda, Ascarididae). *Veterinary Parasitology*, 160(3-4):344-347.
7. Castro, O., Venzal, J.M., Morgades, D., Katz, H., Gagliardi, F., Benítez, G. (2007). Algunos helmintos nuevos para Uruguay registrados en la Colección de Helmintos Parásitos de Fauna Silvestre del Departamento de Parasitología, Facultad de Veterinaria, UdelaR. V Jornadas Técnicas de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, p 37.
8. Dei-Cas, E., Rodrigues, N., Botto, C., Osimani, J.J., (1976). Larvas plerocercoides de *Spirometra* (Dibothriocephalidae) en el hombre y en

- animales silvestres de Uruguay. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 18:165-172.
9. Drocco, A., Cabrera, P.A. (2003). Estudio preliminar de *Echinococcus granulosus* y otros Taeniidae de una población canina perteneciente a un poblado rural. IV Jornadas Técnicas de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, p 151.
  10. Gressler, L.T., Noll, J.C.G., Freitas, Í.B.D., Monteiro, S.G., (2016). Multiparasitism in a wild cat (*Leopardus colocolo*) (Carnivora: Felidae) in southern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 25(3):374-377.
  11. Gutierrez, V.C., Fróes, O.M., Amato, J.F., (1977). Identification of a new intermediate host of *Spirometra mansonioides* Mueller, 1935 in the area of Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. *Revista Brasileira de Biologia*, 37(1):131.
  12. Hall, T.A., (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*, 41(41):95-98.
  13. Holcman-Spector, B., Olagüe, G., Couto, A., (1985). Helminthiasis del perro vagabundo (*Canis familiaris*) en la ciudad de Montevideo. *Revista Uruguaya Patología Clínica*, 21:67-73.
  14. Jeon, H.K., Park, H., Lee, D., Choe, S., Kim, K.H., Huh, S., Sohn, W.M., Chai, J.Y., Eom, K.S., (2015). Human infections with *Spirometra decipiens* plerocercoids identified by morphologic and genetic analyses in Korea. *The Korean Journal of Parasitology*, 53(3):299.
  15. Král'ová, I., Hanzelová, V., Scholz, T., Gerdeaux, D., Špakulová, M., (2001). A comparison of the internal transcribed spacer of the ribosomal DNA for *Eubothrium crassum* and *Eubothrium salvelini* (Cestoda: Pseudophyllidea), parasites of salmonid fish. *International Journal for Parasitology*, 31(1):93-96.
  16. Kuchta, R., Scholz, T., Brabec, J., Narduzzi-Wicht, B., (2015). *Diphyllobothrium*, *Diplogonoporus* and *Spirometra*. *Biology of Foodborne Parasites. Section III Important Foodborne Parasites*.

17. Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., (1994). MEGA: molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers. *Bioinformatics*, 10(2):189-191.
18. Lena, I., Radcenco, P.A. (2017). Endoparásito del zorro de campo (*Lycalopex gymnocercus*) y zorro de monte (*C. thous*) de la región noroeste del Uruguay. Tesis de Grado, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, 50 pp. Disponible en: <http://www.fvet.edu.uy/images/Biblioteca/FV-33050.pdf> (fecha de consulta: 26 de febrero de 2018).
19. Miyadera, H., Kokaze, A., Kuramochi, T., Kita, K., Machinami, R., Noya, O., de Noya, B.A., Okamoto, M., Kojima, S., (2001). Phylogenetic identification of *Sparganum proliferum* as a pseudophyllidean cestode by the sequence analyses on mitochondrial COI and nuclear *sdhB* genes. *Parasitology International*, 50(2):93-104.
20. Oda, F.H., Borteiro, C., da Graça, R.J., Tavares, L.E.R., Crampet, A., Guerra, V., Lima, F.S., Bellay, S., Karling, L.C., Castro, O., Takemoto, R.M., (2016). Parasitism by larval tapeworms genus *Spirometra* in South American amphibians and reptiles: new records from Brazil and Uruguay, and a review of current knowledge in the region. *Acta tropica*, 164:150-164.
21. Osimani, J.J., Dei-Cas, E.V., (1974). Sobre la obtención experimental de *Spirometra* sp. (Cestoda-Dibothriocephalidae). *Neotropica* 20:57-63.
22. Osimani, J.J., Peyrallo, R., (1954). Segundo caso de esparganosis encontrado en América del Sur. Primer caso descrito en el Uruguay. *Archivos Uruguayos de Medicina y Cirugía Especializada*, 44:139-147.
23. Sampaio, I., Castro, E., Chifflet, L., Areosa, O., (1992). Hallazgo de *Diphyllobothrium* sp. en *Canis familiaris*. *Veterinaria*, 28(118):22-23.
24. Sakamoto, T., Gutierrez, C., Rodriguez, A., Sauto, S., (2003). Testicular sparganosis in a child from Uruguay. *Acta tropica*, 88(1):83-86.

25. Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Dun, A.M., Jennings, F.W. (2001). *Parasitología veterinaria*. Segunda edición. Zaragoza. Acribia. 355 pp.
26. Valerio, I., Rodríguez, B., Chinchilla, M., (2004). Primer hallazgo de *Spirometra mansoni* en *Felis domesticus* de Costa Rica. *Parasitología Latinoamericana*, 59(3-4):162-166.
27. Venturini, L., (1989). El Ciclo Evolutivo Experimental de *Diphyllobothrium erinaceieuropaei* en *Paracyclops fimbriatus*, larvas de *Bufo Arenarum* y caninos. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 31:308-312.
28. Vieira, F.M., Luque, J.L., Muniz-Pereira, L.C., (2008). Checklist of helminth parasites in wild carnivore mammals from Brazil. *Zootaxa*, 1721:1-23.
29. Vogelsang, E.G., (1925). Presencia de un *Sparganum* en las ranas (*Leptodactylus ocellatus*) del Uruguay. *Revista de Medicina Veterinaria (Montevideo)*, 8:301.
30. Wolffhügel, K., Vogelsang, E.G., (1926). *Dibothriocephalus decipiens* (Diesing) y su larva *Sparganum reptans* en el Uruguay. *Revista de Medicina Veterinaria (Montevideo)*, 9:433-434.
31. Petrich, R.S., Scioscia, N.P., Denegri, G.M., Fugassa, M.H., (2015). Research Note. Cox-1 gene sequence of *Spirometra* in Pampas foxes from Argentina. *Helminthologia*, 52(4):355-359.
32. Ruas, J.L., Muller, G., Farias, N.A.R., Gallina, T., Lucas, A.S., G Pappen, F., Sinkoc, A.L., Brum, J.G.W., (2008). Helminths of Pampas fox *Pseudalopex gymnocercus* (Fischer, 1814) and of Crab-eating fox *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766) in the Southern of the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 17(2):87-92.
33. Scioscia, N.P., Petrich, R.S., Beldomenico, P.M., Denegri, G.M., (2014). The Pampas fox (*Lycalopex gymnocercus*) as new definitive host for *Spirometra erinacei* (Cestoda: Diphyllbothriidae). *Acta tropica*, 133:78-82.