

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS**



“CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DEL COCCIDIO  
PARÁSITO *AGGREGATA* SP. (APICOMPLEXA: AGGREGATIDAE) EN EL  
PULPO *OCTOPUS BIMACULATUS* DE BAHÍA DE LOS ÁNGELES, BAJA  
CALIFORNIA”

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y**

**BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

**GRACIELA ESMERALDA COLUNGA RAMÍREZ**

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MEXICO.

27 DE SEPTIEMBRE DEL 2019

## ABSTRACT

Coccidia of the genus *Aggregata* are common intracellular parasites that inhabit the digestive tract of cephalopods, causing the malabsorption syndrome. In Mexico, these parasites are poorly known, even when they infect commercially important species of cephalopods such as *Octopus bimaculatus*, which currently sustains the octopus's fishery in Baja California (B.C.) and is a candidate species to develop the octopus aquaculture in the state. The objective of the present work was to describe the coccidian that infects *Octopus bimaculatus* from Bahia de Los Angeles, B.C. Between May-June, 2018 and January, 2019 a total of 34 hosts were collected from the commercial fishery that takes place in Bahia de Los Angeles. The caecum was cut from each octopus and oocyst, sporocysts and sporozoites were manually isolated. A sample of the tissue was processed by histology and the rest of the organ was digested in pepsin acid in order to isolate and quantify the number of sporocyst's. The morphological features of sporogonic stages were analyzed by light (LM) and scanning electron microscopy (SEM). In addition, three partial sequences of the gene 18S rRNA were amplified and a phylogenetic analysis was done with the Bayesian inference (BI). The coccidian was recorded in 100% of hosts that harbored, in average,  $1.92 \times 10^6$  sporocysts per gram of infected tissue. The sporocysts were ovoid to spherical in shape, 18  $\mu\text{m}$  in length, harbored 11-13 sporozoites and showed a suture that divides the sporocysts into two valves through which the sporozoites are freed. The wall of the sporocysts showed long tubular projections uniformly distributed. At the

molecular level, three partial sequences of 1, 533 bp were sequenced and it confirms that the coccidian belonged to the genus *Aggregata*. The molecular phylogenetic analysis suggests that the coccidia from Bahia de Los Angeles formed a sister clade highly supported (posterior probability, PP=1) with *Aggregata octopiana*, from which it differed approximately 9-12% at the sequence level. Based on the morphological and molecular data, *O. bimaculatus* is infected by a new *Aggregata* species without coincidences among their congeners. This is the first coccidian species described in cephalopods from Mexico.

## RESUMEN

Los coccidios del género *Aggregata* son parásitos intracelulares comunes en el tracto digestivo de cefalópodos y causantes del síndrome de malabsorción. En México, estos parásitos son poco conocidos aun cuando infectan a especies de importancia comercial como *Octopus bimaculatus*, que sostiene la pesquería de pulpo en Baja California (B.C.) y es una de las candidatas de mayor interés para desarrollar la acuicultura de pulpo en el estado. El objetivo del presente trabajo fue describir al coccidio que infecta a *Octopus bimaculatus* de Bahía de los Ángeles, B.C. Para ello, entre mayo-junio, 2018 y enero, 2019 se recolectó un total de 34 hospederos de la pesca artesanal de Bahía de Los Ángeles. De cada hospedero se extrajo el ciego digestivo del cual, se aislaron manualmente oquistes, esporoquistes y esporozoítos. Una porción del ciego se procesó mediante histología y el resto del tejido se digirió en pepsina ácida para aislar y cuantificar el número de esporoquistes. Las características morfológicas de las fases esporogónicas se analizaron mediante microscopia de luz (ML) y microscopia electrónica de barrido (MEB). También, se amplificó el gen 18S ARN ribosomal (18S ARNr) y se realizó un análisis filogenético mediante Inferencia Bayesiana (IB). Los coccidios se registraron en el 100% de los pulpos analizados, que presentaron, en promedio  $1.92 \times 10^6$  esporoquistes por gramo de tejido infectado. Los esporoquistes presentaron forma ovoide/esférica de 18  $\mu\text{m}$  de longitud, conteniendo de 11 a 13 esporozoítos y mostraron una sutura que los divide en dos valvas a través de la cual son liberados los parásitos. La pared de

los esporoquistes presentó proyecciones tubulares distribuidas homogéneamente. A nivel molecular se obtuvieron tres secuencias parciales de 1,533 pb del gen 18S ARNr, que confirman que el coccidio de estudio pertenece al género *Aggregata*. El análisis filogenético indica que este coccidio forma un clado hermano altamente sustentado (Probabilidad Posterior, PP=1) con el coccidio *Aggregata octopiana* del cual, presenta 9-12% de diferencia nucleotídica. Los datos morfológicos y moleculares indican que *O. bimaculatus* es infectado por una nueva especie del género *Aggregata*, siendo este estudio el primero en describir a una especie de coccidio en cefalópodos de México.

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS  
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR y BIOTECNOLOGÍA

"CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DEL COCCIDIO  
PARÁSITO *AGGREGATA* SP. (APICOMPLEXA: AGGREGATIDAE) EN EL  
PULPO *OCTOPUS BIMACULATUS* DE BAHÍA DE LOS ÁNGELES, BAJA  
CALIFORNIA"

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS  
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

GRACIELA ESMERALDA COLUNGA RAMÍREZ

Aprobada por:



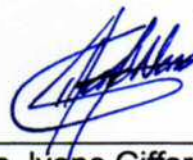
\_\_\_\_\_  
Dra. Sheila Castellanos Martínez  
Director de tesis



\_\_\_\_\_  
Dr. Carlos Alberto Flores López  
Sinodal



\_\_\_\_\_  
Dr. Andrés Martínez Aquino  
Sinodal



\_\_\_\_\_  
Dra. Ivone Giffard Mena  
Sinodal

## DEDICATORIA

*A mi familia, que son y siempre han sido mi soporte. Nuestros logros siempre serán compartidos, porque al final la familia es el equipo al que siempre vamos a pertenecer, y por el cual nos va a tocar participar y apoyar, pero sobre todo a amar.*

*¡GRACIAS!*

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia por el apoyo incondicional y amor brindado. Principalmente a mis padres que con su amor y sabiduría hoy soy lo que soy.

A Ramón Rodríguez López por la paciencia y el amor.

A la Dra. Sheila Castellanos Martínez por confiar en mí y darme la oportunidad de continuar aprendiendo y afrontar nuevos retos, ya que, su guía como me ha hecho crecer profesionalmente.

A mis amigos, en especial a Lorena González, Marina Banuet, Roberto Oyervides y Rodrigo Arce por todo su apoyo y cariño.

A todo el equipo de SOAM Lab, UNAM, por permitirme ser parte del “SAOM TEAM y Otras cosas”, y hacer que me sienta como en familia.

A toda la gente que labora en la Universidad Autónoma de Baja California, en especial al Instituto de Investigaciones Marinas y a la Facultad de Ciencias Marinas ya que sin ellos este paso académico de mi vida no hubiese sido posible.

A la Dra. Camino Gestal por darme la oportunidad de aceptarme de estancia en su laboratorio en el Instituto de Investigaciones Marinas en Vigo, España.

A la Dra. Ana Rodríguez Hernández del Centro de Nanociencias y Nanotecnología, UNAM, por permitirme y darme la confianza para trabajar y aprender en su laboratorio.

Al personal del Laboratorio Nacional de Nano y Biomateriales del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), Unidad Mérida por consentir que realizara una estancia de investigación.

Al Dr. Andrés Aquino por su gran ayuda para la elaboración de esta tesis, por su atención y sobretodo paciencia.

Al Dr. Carlos Flores por confiar en mí y darme la oportunidad y confianza de trabajar en su laboratorio.

A la Dra. Ivone Giffard por ser parte de mi realización importante para mi realización y formación académica como maestra ciencias.

Al Dr. Luis Enriquez Paredes el cual no solo me ha fomentado ser un buen estudiante, sino a ser honesta con mi trabajo y el mundo que me rodea.

A todos los investigadores con lo que me ha tocado participar, involucrados o no este proyecto, ya que uno a uno me ha demostrado que México cuenta con la capacidad humana e intelectual para ser grandes científicos y forjar a los futuros investigadores de este país.

A todos los ciudadanos de México y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca 769732/632044 otorgada para obtener el grado de maestra.

Al proyecto 11522, el cual financió este proyecto de investigación.

*¡GRACIAS!*

## ÍNDICE

ABSTRACT.....	I
RESUMEN.....	III
DEDICATORIA .....	VI
AGRADECIMIENTOS.....	VII
ÍNDICE.....	X
FIGURAS.....	XI
TABLAS.....	XII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	10
2.1. General.....	10
2.2. Específicos .....	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
3.1. Obtención de muestras de coccidio.....	11
3.2. Aislamiento y purificación de parásitos.....	12
3.3. Caracterización morfológica .....	13
3.3.1. Microscopía óptica .....	13
3.3.2. Histología .....	14
3.3.3. Microscopía electrónica de barrido (MEB) .....	16
3.4. Caracterización molecular .....	16
3.4.1 Extracción de ADN y amplificación del gen 18S ARNr.....	16
3.4.2. Análisis filogenético.....	18
4. RESULTADOS.....	21
4.1. Datos morfométricos de <i>Octopus bimaculatus</i> .....	21
4.2. Estimación de la prevalencia e intensidad media de infección.....	21
4.3. Descripción taxonómica.....	23
4.3.1. Gamogonia.....	23
4.3.2. Esporogonia .....	24
4.4. Resumen Taxonómico.....	26
4.5. Análisis filogenético de <i>Aggregata</i> sp.....	27

5. OBSERVACIONES TAXONÓMICAS GENERALES.....	30
6. DISCUSIÓN.....	33
7. CONCLUSIONES .....	38
8. LITERATURA CITADA .....	39

## FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Aggregata</i> spp. en cefalópodos.....	3
Figura 2. <i>Octopus bimaculatus</i> mostrando la mancha azul situada debajo del ojo. .....	9
Figura 3. Detección macroscópica de <i>Aggregata</i> sp. en el ciego de <i>Octopus bimaculatus</i> . .....	12
Figura 4. Esquema de un esporozoítio indicando las mediciones realizadas.....	14
Figura 5. Toma de muestra de tejido para procesamiento histológico.....	15
Figura 6. Micrográficas de corte histológico del ciego de <i>Octopus bimaculatus</i> que muestra los estadios de gamogonia de <i>Aggregata</i> sp.....	23
Figura 7. Micrográficas del coccidio <i>Aggregata</i> sp. aislado del ciego de <i>Octopus bimaculatus</i> . .....	25
Figura 8. Árbol filogenético con mayor soporte probabilístico obtenido por Inferencia Bayesiana a partir de secuencias parciales del gen 18S RNAr del Phylum Apicomplexa.....	29

**TABLAS**

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen 18S ARNr de <i>Aggregata</i> spp.....	18
Tabla 2. Datos morfométricos de los hospederos <i>Octopus bimaculatus</i> . ....	22
Tabla 3. Especies de <i>Aggregata</i> descritas en hospederos cefalópodos.....	32

## 1. INTRODUCCIÓN

El phylum Apicomplexa está conformado por organismos eucariotas unicelulares (Gestal et al. 2010). Los Apicomplexa viven como parásitos obligados, intracelulares que se caracterizan por presentar una fase infectiva llamada, “esporozoíto”, misma que posee un complejo apical situado en el extremo anterior de la célula. Dentro de este phylum se encuentra la familia Aggregatidae Labbé, 1899, un grupo taxonómico de parásitos específicos de moluscos (Kristmundsson y Freeman 2018). Esta familia incluye 8 géneros: *Aggregata* Frenzel, 1885, *Angeiocystis* Brasil, 1904, *Grasseella* Tuzet & Ormières, 1960, *Merocystis* Dakin, 1911, *Ovivora* Mackinnon & Ray, 1937, *Pseudoklossia* Léger & Duboscq, 1915, *Selysina* Duboscq, 1917 y *Steinina* Leger & Duboscq, 1904 (“WoRMS - World Register of Marine Species - Aggregatidae Labbé, 1899” s/f). De los géneros que se incluyen en esta familia las especies de coccidios del género *Aggregata* infectan a cefalópodos y son considerados los parásitos de mayor prevalencia en estos moluscos tanto de vida silvestre como de cultivo (Pascual et al. 1996, 2006 y Gestal et al. 2002c).

El ciclo de vida de *Aggregata* spp. posee dos tipos de reproducción: sexual y asexual, y requiere de dos hospederos para completarlo. Durante la reproducción asexual tiene lugar la fase de merogonia (por división múltiple) y ocurre en el tracto digestivo de los hospederos intermediarios (p. ej., crustáceos decápodos). Durante el estadio sexual se desarrollan los gametos (gamogonia) y esporoquistes (esporogonia) en el tracto digestivo de los cefalópodos (Fig. 1),

quienes participan como hospederos definitivos (Gestal et al. 2002a; Ibáñez et al. 2005). La infección es adquirida a través de los hábitos alimentarios de los cefalópodos. Por ejemplo, cuando el parásito es ingerido por el cefalópodo, los merozoítos migran al tracto digestivo del molusco. Una vez allí, inicia el proceso de gamogonia, a partir del cual se desarrollan micro- y macrogametos, cuya unión resulta en la formación de un cigoto. Comienza entonces la fase de esporogonia, donde el cigoto sufre una serie de divisiones nucleares para formar un esporonte multinucleado. Del esporonte derivan los esporoblastos, que van a formar un oquiste con numerosos esporoquistes que contienen en su interior a los esporozoítos, la fase infectiva del parásito. Cuando los esporozoítos han completado su desarrollo, los esporoquistes son liberados al medio marino a través de las heces del cefalópodo, quedando disponibles para ser ingeridos por un nuevo hospedero intermediario (i.e., un crustáceo decápodo) (Fig. 1). Una vez que los esporoquistes alcanzan el tracto digestivo de su hospedero intermediario, los esporozoítos eclosionan e invaden las células epiteliales, dando origen a merozoítos como resultados de la merogonia. Así, el crustáceo será ingerido por un cefalópodo para repetir el ciclo (Gestal et al. 2002b, 2010) (para más detalle ver Fig. 1).

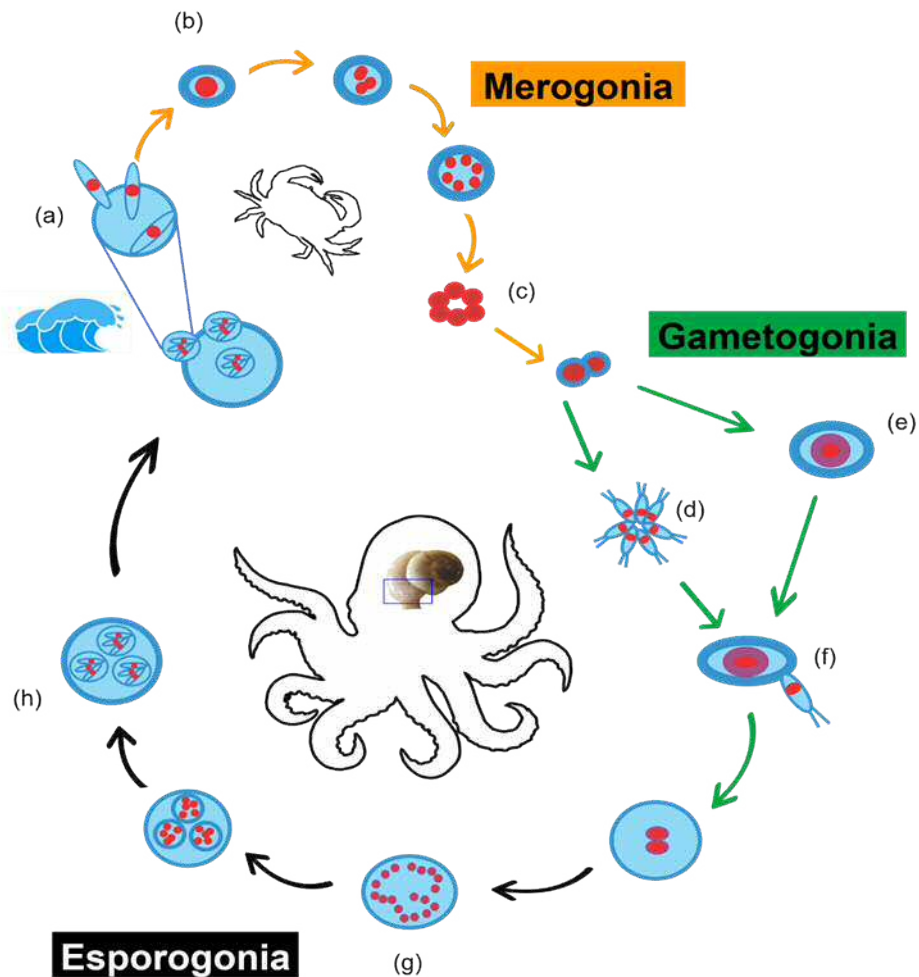


Figura 1. Ciclo de vida de *Aggregata* spp. en cefalópodos. Merogonia (color naranja): los esporoquistes libres en el medio marino (a) son ingeridos por un crustáceo (hospedero intermediario). El parásito se desarrollará en un meronte (célula madre) (b) que dará lugar a merozoítos, las células hijas (color verde): una vez que el crustáceo es ingerido por el cefalópodo, el merozoíto se divide para dar lugar a: (d) microgameto y (e) macrogameto. Esporogonia: tras la fertilización (f) del macrogameto, surge un cigoto que sufrirá múltiples divisiones celulares. Cada núcleo dará lugar a un esporozoíto (g) que se desarrollará (h) dentro de un esporoquiste y éstos a su vez, estarán contenidos en un oquiste hasta que completen su desarrollo y sean liberados al medio marino a través de las heces del cefalópodo. De esta manera, después serán ingeridos por los crustáceos decápodos y continuarán su ciclo de vida.

En el tracto digestivo del cefalópodo, el ciego es considerado el órgano diana de la infección (Estévez et al. 1996). Una vez que el parásito se ha establecido, éste causa hipertrofia, desplazamiento del núcleo de las células infectadas, ulceración, inflamación y la destrucción del tejido infectado, y en casos extremos

la mayor parte del tejido es sustituido por el parásito (Gestal et al. 2002a; Gestal et al. 2002c). Además, los coccidios ocasionan el síndrome de malabsorción de nutrimentos. Éste ocurre como resultado de las altas cantidades de ácido láctico producidas por el metabolismo de los coccidios. El ácido láctico acidifica el tracto digestivo del cefalópodo, haciendo que disminuya la actividad catalítica, principalmente el de las enzimas digestivas maltasa y leucina aminopeptidasa (activas a  $\text{pH} \geq 7.0$ ). En consecuencia, se origina una deficiencia en la absorción de glucosa y aminoácidos libres que no son digeridos completamente y, por ende, no son absorbidos por las células epiteliales (Gestal et al. 2002a). Aunado a lo anterior, la coccidiosis tiene efectos a nivel funcional y molecular. En el primer caso, provoca el incremento en la capacidad fagocitaria de los hemocitos, aunque reduce la producción de radicales de oxígeno en las mismas y la capacidad del sistema inmunitario para combatir la infección. El mecanismo citotóxico incluso se ha observado casi inhibido en individuos considerados enfermos ( $>6 \times 10^6$  esporoquistes por gramo de tejido infectado) (E/G). Por todo lo expuesto anteriormente, las especies de coccidios del género *Aggregata* son considerados los parásitos más peligrosos para los pulpos silvestres y de cultivo (Gestal et al. 2007; Castellanos-Martínez et al. 2014).

Actualmente se han descrito 10 especies del género *Aggregata* en distintas especies de cefalópodos alrededor del mundo (Tabla 3) (Castellanos-Martínez et al. 2013a). La mayoría de las especies de coccidios han sido descritas con base en caracteres morfológicos. Sin embargo, a partir del 2006 han surgido

avances para la obtención y análisis de datos moleculares en el género *Aggregata*, que han promovido el desarrollo de una nueva taxonomía (i.e., Taxonomía Integrativa) (Kopečná et al. 2006; Padial et al. 2010; Castellanos-Martínez et al. 2013a; Tedesco et al. 2017), la cual incluye la información molecular necesaria para facilitar la resolución de problemas de delimitación de especies conocidas y nuevas para la ciencia. En *Aggregata* spp., la caracterización molecular y sistemática filogenética se ha basado principalmente en el marcador molecular del gen que codifica para la subunidad pequeña de ARN ribosomal 18S (18S ARNr) (Kopečná et al. 2006; Barta et al. 2011; Castellanos-Martínez et al. 2013a y Tedesco et al. 2017). Sin embargo, a la fecha sólo se cuenta con información molecular de dos especies del género *Aggregata*: *Aggregata octopiana* (Schneider, 1875), que infecta al pulpo *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) y *Aggregata eberthi* (Labbé, 1895), que infecta a la sepia *Sepia officinalis* (Linneo, 1758) (Kopečná et al. 2006; Barta et al. 2011; Castellanos-Martínez et al. 2013a y Tedesco et al. 2017). Por el contrario, el resto de las especies del género *Aggregata* se han descrito únicamente con base en sus características morfológicas. En el Pacífico Oriental (frontera entre Canadá y Estados Unidos de Norteamérica) Poynton et al. (1992) describieron a las especies: *Aggregata millerorum* (Poynton et al., 1992) en el pulpo *Octopus bimaculoides* Pickford & McConnaughey, 1949, y a *Aggregata dobelli* Poynton et al., 1992, en el pulpo *Enteroctopus dofleini* (Wülker, 1910). En México, el único registro de coccidios en cefalópodos corresponde al reportado por Guillén-Hernández et al. (2018) quienes observaron la presencia de coccidios *Aggregata*

en el tracto digestivo de *Octopus maya* (Voss y Solís, 1966), en la Península de Yucatán; sin embargo, no ha sido descrita.

Los principales grupos de parásitos conocidos que afectan a los cefalópodos reportados hasta la fecha son algunas especies pertenecientes a los reinos Protozoa, Chromista; los phylum: Dicyemida, Acanthocephala y Nematoda; al subphylum Crustacea; las clases: Cestoda y Trematoda, y la subclase, Digenea; así como, algunos patógenos oportunistas del grupo de las bacterias, dinoflagelados y hongos (Castellanos-Martínez y Gestal, 2013b; Roubledakis et al. 2018). Para el Pacífico mexicano, la investigación referente a enfermedades, parásitos o simbiosis de cefalópodos es escasa (Castellanos-Martínez et al. 2011). Aun cuando se estima que existen 10 especies de cefalópodos en esta región, incluyendo aquellas de importancia comercial, son pocas las especies de cefalópodos que han sido estudiadas bajo un esquema parasitológico. Tal es el caso del calamar jumbo, *Dosidicus gigas* (d'Orbigny, 1835), que es infectado por cestodos, trematodos y nematodos, (Pardo-Gandarillas et al. 2009, 2014; Jereb et al. 2014).

Respecto a las especies de pulpo, en el Pacífico Mexicano, las pesquerías más importantes se ubican en el noroeste mexicano, particularmente, en los estados de Baja California (B.C.), Baja California Sur (B.C.S.), Sonora y Nayarit. Las especies más importantes son *Octopus hubbsorum* Berry, 1953, *Octopus bimaculoides* Pickford & McConnaughey, 1949 y *Octopus bimaculatus* Verrill, 1883. Esta última es la de mayor importancia comercial en el estado de Baja

California, destacando Bahía de los Ángeles como la zona con el mayor número de capturas registradas de esta especie con hasta 180 toneladas (t) anuales (López-Rocha et al. 2012; Domínguez-Contreras et al. 2018; CONAPESCA, 2018).

*Octopus bimaculatus* (pulpo café o pulpo de las dos manchas) se distribuye desde Santa Bárbara, California, EE. UU. hasta la Bahía de Sebastián Vizcaíno, B.C.S. y el Golfo de California en México (Domínguez-Contreras et al. 2018). Es generalmente de color variable que oscila desde gris oscuro, café, rojo u olivo moteado. Posee dos manchas azules que forman un patrón de pequeños eslabones que se moldean en forma de estrella y están situadas debajo de cada ojo, entre el segundo y tercer par de brazos (Fig. 2). Posee un ciclo de vida de 1.5 a 2 años. Es carnívoro durante toda su vida, alimentándose principalmente de bivalvos y pequeños crustáceos (Brusca, 1980; Villegas et al. 2014).

El conocimiento de los parásitos que infectan a *O. bimaculatus* es escaso. Pickford y McConnaughey (1949) describieron dos especies de parásitos diciémidos (*Phylum Dicyemida*) que se creía infectaban los sacos renales de *O. bimaculatus*. Sin embargo, *O. bimaculatus*, es infectado por *Dicyemeneia abelis* McConnaughey, 1949; y *O. bimaculoides*, es infectado por *Dicyemeneia californica* McConnaughey, 1941. Recientemente, también se identificó a las sanguijuelas que infectan la cavidad paleal, cabeza y brazos de *O. bimaculatus* de Bahía de Los Ángeles como *Stibarobdella moorei* (López-Peraza et al. 2017).

Además de lo anteriormente mencionado, no existen otros reportes publicados sobre estudios parasitológicos en esta especie de cefalópodo.

Las investigaciones actuales realizadas sobre *O. bimaculatus* se centran en el estudio de la variación y preferencias alimenticias con relación a la estación del año, sexo y etapas de desarrollo, así como, la utilización de refugios, reproducción y distribución (Ambrose, 1982; López-Rocha et al. 2012; Villegas et al. 2014; Domínguez-Contreras et al. 2016). La finalidad de esos estudios es generar conocimiento biológico básico, ya que *O. bimaculatus* se posiciona como una especie con potencial acuícola (Ambrose, 1984; López-Peraza et al. 2014; Villegas et al. 2014; Domínguez-Contreras et al. 2018).

Resulta importante entonces prever los posibles problemas sanitarios derivados de infecciones parasitarias que puedan afectar a organismos de cultivo, así como a los consumidores de este producto. Actualmente, los pulpos usados para engorde y que serán comercializados para el consumo humano; así como aquellos utilizados en estudios experimentales, provienen de poblaciones silvestres que presentan prevalencias superiores al 80% de infección (Gestal et al. 2002c; Pascual et al. 2007; Mayo-Hernández et al. 2013; Sykes et al. 2017). Teniendo pleno conocimiento de que existe un sinergismo entre malnutrición e infección por estos coccidios que afectan el correcto funcionamiento de las enzimas digestivas del cefalópodo, actualmente se considera que la coccidiosis podría alterar los resultados experimentales en diversos estudios tales como aquellos enfocados en la nutrición y búsqueda de dietas suplementarias (Sykes

et al. 2017; Roumbedakis et al. 2018). Por tanto, como un primer paso hacia la comprensión de los parásitos y enfermedades de cefalópodos en México, el objetivo del presente estudio fue determinar la presencia, así como describir morfológica y filogenéticamente por primera vez al coccidio parásito *Aggregata* sp. que infecta al pulpo de las dos manchas, *O. bimaculatus* de Bahía de Los Ángeles, B.C.



Figura 2. *Octopus bimaculatus* mostrando la mancha azul situada debajo del ojo. Nótese un patrón de pequeños eslabones que se moldean en forma de estrella (Fotografía: Jorge Fernando Sánchez Solís).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. General

Caracterizar a nivel morfológico y molecular el coccidio *Aggregata* sp. del pulpo café, *Octopus bimaculatus*, de Bahía de Los Ángeles, B.C.

### 2.2. Específicos

a. Describir caracteres taxonómicos del coccidio *Aggregata* sp. de *Octopus bimaculatus* de Bahía de Los Ángeles, B.C., mediante microscopia óptica, electrónica de barrido e histología.

b. Amplificar el gen 18S RNAr del coccidio *Aggregata* sp. de *Octopus bimaculatus*, de Bahía de Los Ángeles, B.C. con cebadores específicos para el género *Aggregata*, para ser analizadas a través de métodos filogenéticos moleculares.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Obtención de muestras de coccidio

De un total de 34 pulpos de *O. bimaculatus* se obtuvieron las muestras del coccidio, recolectadas en los meses de abril y mayo del 2018, y enero de 2019 de la pesca artesanal, realizada mediante el uso de trampas en Bahía de los Ángeles, localizada en la Costa Este de la península de Baja California, México (29°00'N, 113°30'W).

Los pulpos se trasladaron en un contenedor con hielo al Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) en Ensenada para su examinación parasitológica. De cada pulpo se midió la longitud del manto dorsal (LMD) con una cinta métrica ( $\pm 0.1$  cm), el peso total (PT) utilizando una balanza granataria Ohaus ( $\pm 0.1$ g) y se identificó el sexo de los organismos mediante observación directa de la gónada. Posteriormente, cada individuo fue diseccionado para extraer el ciego y realizar su examen parasitológico. Cuando en el ciego se observó a simple vista la presencia de puntos blancos con forma esférica-ovoide (oquistes del coccidio), los pulpos se consideraron infectados (Fig. 3).

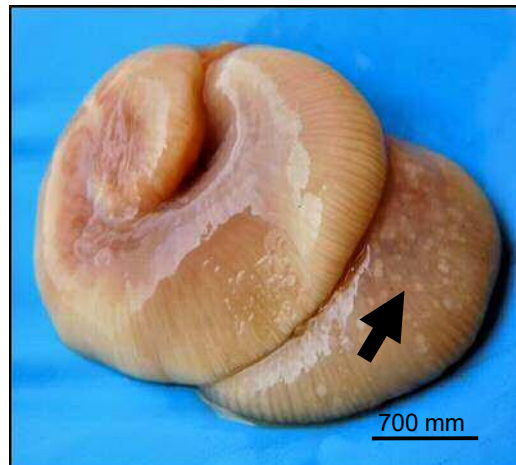


Figura 3. Detección macroscópica de *Aggregata* sp. en el ciego de *Octopus bimaculatus*. El tejido muestra puntos blancuecinos de aproximadamente 300 µm de longitud, correspondientes a oquistes del coccidio (flecha negra).

### 3.2. Aislamiento y purificación de parásitos

El aislamiento y purificación de esporoquistes presentes en los ciegos de *O. bimaculatus* se realizó para cada individuo de acuerdo con el método de digestión con pepsina de Dubey (1998), con modificaciones. Brevemente, con unas tijeras grado quirúrgico, cada ciego se cortó en trozos pequeños ( $\leq 0.5$  cm, aproximadamente) y se incubaron durante dos horas en pepsina ácida (pH 1.1-1.2) a 37 °C en una incubadora (Boekel Scientific, 123000). El tejido digerido se tamizó en un filtro de nylon con un poro de 28 micrometros (µm). Estos últimos se lavaron dos veces con agua destilada filtrada con el fin de recuperar el mayor número de esporoquistes en un tubo cónico de 50 ml, en un volumen final de 10 ml. Después, los esporoquistes tamizados se centrifugaron a 1,200 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 min a 4 °C. Las muestras se decantaron para recuperar el pellet de esporoquistes y se llevaron a un volumen final de 1 ml en

agua destilada filtrada en un microtubo de 1.5 ml. Finalmente, se cuantificó el número de esporoquistes en cámara Neubauer para evaluar la intensidad media de infección y la prevalencia parasitaria, ambas se estimaron con base en Bush et al. (1997) (Ec. 1 y 2). La infección se estandarizó de acuerdo con Gestal et al. (2007), como sigue: número de esporoquistes por gramo de tejido infectado (E/G).

\_\_\_\_\_ (Ecuación 1)

\_\_\_\_\_ (Ecuación 2)

### **3.3. Caracterización morfológica**

#### **3.3.1. Microscopía óptica**

Los oquistes del coccidio se extrajeron manualmente del ciego de cada pulpo y se colocaron entre un cubreobjetos y portaobjetos. Consecutivamente, se añadió una gota del colorante Giemsa (Betancor et al. 2010) y se midió el diámetro de los mismos. Posteriormente, los oquistes fueron sometidos a presión mecánica para liberar a los esporoquistes y esporozoítos (Poynton et al. 1992; Betancor et al. 2010). El diámetro de los esporoquistes se midió únicamente en aquellos que mantuvieron una forma definida. Igualmente, de cada esporozoíto se midió la longitud total (LT), el ancho apical (AA), central (AC) y contrapical

(ACA) sólo de aquellos que conservaron su estructura vermiforme (Fig. 4). Todas las medidas se realizaron con un microscopio óptico compuesto Primo Star (Carl Zeiss Microscopy, Jena Germany) mediante el software ZEN lite, Blue edition (Zeiss).

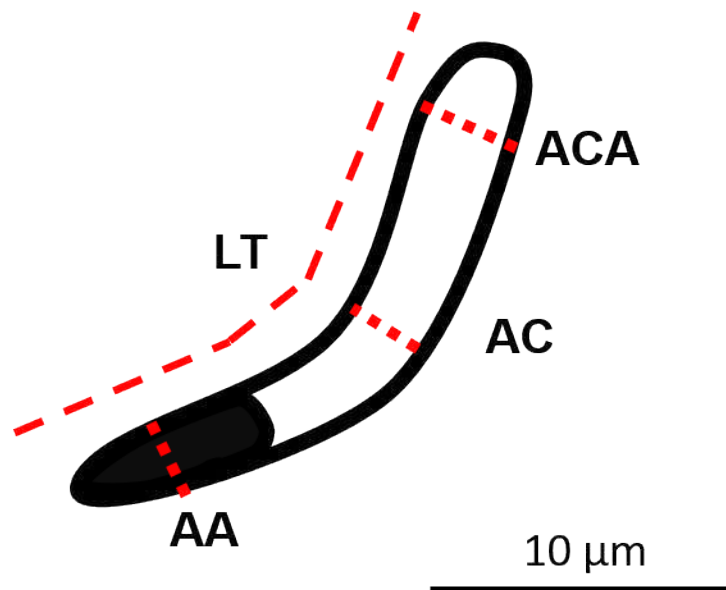


Figura 4. Esquema de un esporozoíto indicando las mediciones realizadas: longitud total (LT), ancho apical (AA), ancho central (AC) y ancho contra apical (ACA) (líneas punteadas rojas).

### 3.3.2. Histología

Con el objetivo de evidenciar la infección por coccidios y las diferentes etapas de desarrollo de éstos, así como cuantificar el número de esporoquistes de cada pulpo, con un bisturí se cortó aproximadamente el primer tercio del ciego (Fig. 5). Las muestras se colocaron en Davidson fijador durante 24 horas (h). Transcurrido el tiempo, se preservaron en Davidson conservante hasta su

procesamiento. El tejido se deshidrató en una serie gradual de alcoholes, se incluyó en parafina para realizar cortes de 5  $\mu\text{m}$  de grosor en un microtomo (Leica RM2125 RTS). Los cortes se tiñeron de acuerdo con la técnica de Hematoxilina-Eosina (H&E) (Culling et al, 1985) y se analizaron con un microscopio óptico compuesto Primo Star (Zeiss, Germany). El número de esporozoítos en cada esporoquiste se cuantificó únicamente en aquellos esporoquistes cortados de forma transversal y donde los núcleos de los esporozoítos se observarían claramente para ser contabilizados.

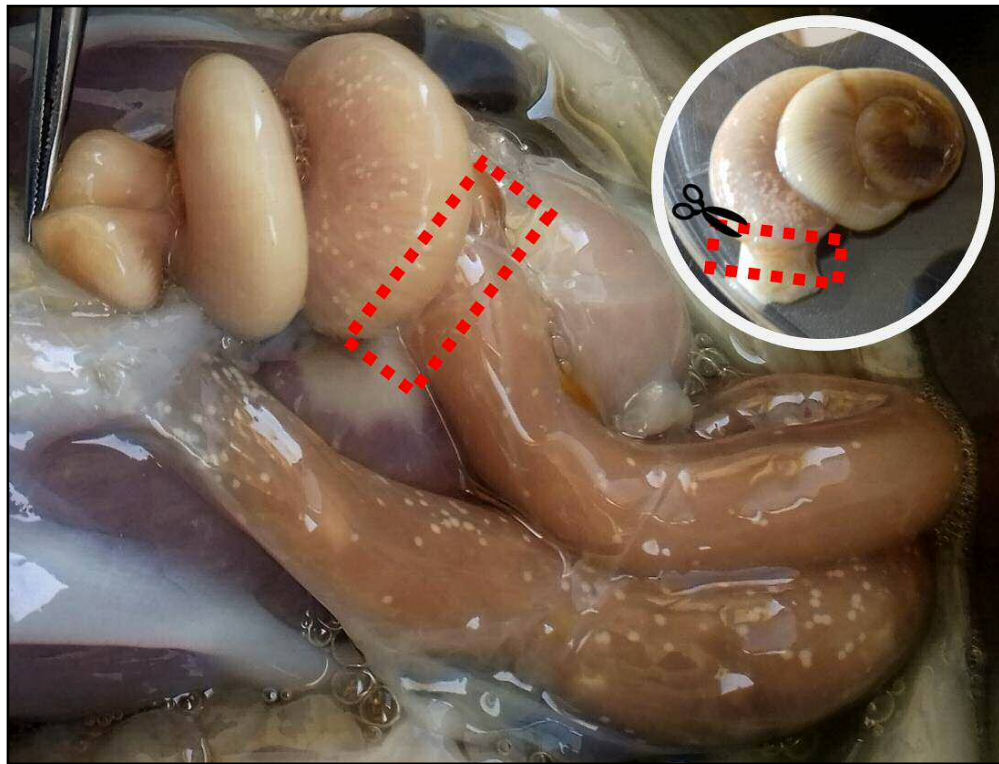


Figura 5. Toma de muestra de tejido para procesamiento histológico. Los cuadrantes punteados en rojo (sitio de unión ciego e intestino) indican la zona del ciego de pulpo donde se obtuvo la muestra para el análisis histológico.

### 3.3.3. Microscopía electrónica de barrido (MEB)

La ultraestructura de los esporoquistes se analizó mediante MEB. Para ello, una muestra de esporoquistes purificados se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en tampón cacodilato 0.2 M, pH 7.4 durante 4 h a 4 °C. A continuación, se realizaron dos lavados en el mismo tampón, las muestras se post-fijaron en OsO<sub>4</sub> 2% (tampón cacodilato 0.2 M, pH 7.2) durante 4 h a 4 °C y se deshidrataron en una serie gradual de etanol (30%, 50%, 70%, 80% 90% y 100%) durante 15 min en cada concentración. Finalmente, las muestras se secaron con el secador de punto crítico CO<sub>2</sub> (Leica CPD 030), se recubrieron con oro-paladio y se observaron en un microscopio FEI Quanta 200 a 12.5 kV.

## 3.4. Caracterización molecular

### 3.4.1 Extracción de ADN y amplificación del gen 18S ARNr

Del ciego de cada hospedero, se aislaron manualmente 20 oquistes. Éstos se resuspendieron en un tubo de 1.5 ml conteniendo PureLink Genomic Digestion Buffer (Thermo Fisher Scientific) y 0.4 gr de perlas de vidrio de 1 mm de diámetro. El tubo se colocó en un homogenizador de acción rápida (BeadBug, Benchmark Scientific) a 3,200 rpm durante 1 min. Posteriormente, la muestra se incubó en Proteinasa K a 55 °C, durante 4 h siguiendo el protocolo y reactivos del fabricante (Kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen). El ADN genómico obtenido se resuspendió en Pure Link Genomic Elution Buffer y se guardó a -4 °C hasta su uso.

La subunidad pequeña del gen 18S ARNr del coccidio se obtuvo con oligonucleótidos previamente diseñados para el género *Aggregata* por Kopečná et al. (2006) y Castellanos-Martínez et al. (2013a) (Tabla 1).

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 25  $\mu$ l que contenían: 1  $\mu$ l de mix de dNTP 10 mM, 2.5  $\mu$ l de buffer de reacción ( $Mg^{+}$  1.5 Mm), 0.25  $\mu$ l de *Taq* polimerasa (Kapa Biosystems, Inc), 1  $\mu$ l de cada oligonucleótido (directo y reverso), 1  $\mu$ l de ADN (100 ng/ $\mu$ l) y 17.25  $\mu$ l de agua libre de nucleasas. Se realizaron 35 ciclos de reacción, el cual cada uno consistió en: una temperatura de desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineamiento (temperatura según los oligonucleótidos, tabla 1), elongación de 72 °C durante 1 min y la extensión final a 72 °C durante 10 min. Los productos de PCR se observaron en un gel de agarosa al 1% en TAE 1X (w/v) teñida con SyBr Safe (Invitrogen). Para determinar el tamaño de las bandas amplificadas se utilizó una escalera de 1 Kb (Invitrogen). El gel se observó en un transiluminador de luz ultravioleta (UV) (Azure c200 de Azure Biosystems, Inc).

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen 18S ARNr de *Aggregata* spp.

(+) Directo, (-) Reverso

Oligonucleótidos 5'-3'	Perfil de Amplificación (35 ciclos)		Tamaño (Pb)	Referencia
(+) ATGATGAAACTGCGAAGAGC	94 °C	1 min	76 – 1008	Kopečná et al. (2006)
(-) CGACGGTATCTGATCGTCTT	54 °C			
	72 °C			
(+) GGGGGTATTTGTATTTAACAAGCA	94 °C	1min	871 – 1781	Kopečná et al. (2006)
(-) AACTAAGAACGGCCATGCAC	55 °C			
	72 °C			
(+) AAGCTCGTAGTTGCAGTTTTGA	94 °C	1 min	544 – 1178	Castellanos- Martínez et al. (2013a)
(-) AACTAAGAACGGCCATGCAC	54 °C			
	72 °C			

### 3.4.2. Análisis filogenético

Los productos de PCR fueron secuenciados bi-direccionalmente por el método Sanger mediante el secuenciador automático ABI 3730-XL (MacroGen, Korea). Las secuencias obtenidas se contrastaron con las secuencias disponibles en la base de datos NCBI a fin de validar que correspondían al phylum Apicomplexa. Para establecer la posición filogenética del parásito, se obtuvo la secuencia parcial de los coccidios *Aggregata* sp. de *O. bimaclatus* y se comparó con 71 secuencias homólogas de 54 taxa de protistas Alveolata (Apicomplexa: Conoidasida) disponibles en el banco de genes del NCBI.

Los números de acceso de las secuencias del gen 18S ARNr empleadas fueron las siguientes: *Aggregata eberthi* (DQ096838, KC188343), *Aggregata octopiana* (DQ096837, KC188342, LC186909, LC186911, LC186912, LC186914, LC186910, LC186913, LC186915, LC186916, LC186917, LC186918, LC186919, LC186920, LC186921, LC186922, LC186923, LC186924, LC186925), *Pseudoklossia pectinis* (MH348778), *Merocystis kathae* (MH348777), *Klossia helicina* (HQ224956), *Adelina grylli* (DQ096836), *Adelina dimidiata* (DQ096835), *Haemogregarina pellegrini* (KM887509), *Haemogregarina sacaliae* (KM887507), *Hepatozoon martis* (MG136688), *Hepatozoon canis* (AY150067), *Klossiella equi* (MH211602), *Apicomplexa* (AB000912), *Babesia gibsoni* (KC461261), *Theileria parva* (L02366), *Cytauxzoon felis* (EU622908), *Caryospora ernsti* (KU180247), *Eimeria tokayae* (KR360734), *Margolisiella islandica* (JN227668), *Eimeria tenella* (KT184354), *Eimeria maxima* (KT184345), *Cystoisospora canis* (KT184368), *Frenkelia glareoli* (AF009245), *Hyaloklossia lieberkuehni* (AF298623), *Neospora caninum* (L24380), *Sarcocystis muris* (M64244), *Toxoplasma gondii* (L24381), *Cystoisospora belli* (U94787), *Rhytidocystis cyamus* (GQ149767), *Rhytidocystis polygordiae* (DQ273988), *Protista* (BOU83331), *Filipodium phascolosomae* (FJ832163), *Selenidium vivax* (AY196708), *Dactylosoma ranarum* (HQ224958), *Hemolivia mariae* (HQ224961) y *Perkinsus marinus* (AF324218). Este último, es una especie de parásito Alveolata de la familia Perkinsidae, que se usó como grupo externo para polarizar el análisis filogenético. El alineamiento múltiple de las secuencias se realizó en MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>) y las regiones ambiguas se

removieron usando GBlocks (Castresana, 2000). Para determinar el mejor modelo de sustitución de ADN, así como para calcular las distancias entre las secuencias alineadas se empleó jModelTest bajo el Criterio de Información Bayesiano (BIC). Con el software Mr. Bayes se realizó la reconstrucción filogenética bayesiana de *Aggregata* spp. a través de dos análisis paralelos de Cadenas de Markov de Monte Carlo (MCMC), muestreando  $1 \times 10^6$  generaciones, guardando los resultados de búsqueda cada 1,000 generaciones. Finalmente, el 25% de los árboles iniciales fueron descartados como fase de calentamiento hasta obtener el árbol conceso para su interpretación probabilística.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Datos morfométricos de *Octopus bimaculatus*

De los pulpos *O. bimaculatus* obtenidos de la pesquería de Bahía de Los Ángeles, B.C. el 32% fueron hembras y 68% machos. El total de los individuos presento una longitud dorsal del manto y peso promedio de  $13 \pm 1.83$  (min. 10.5 y máx. 17) cm y  $792 \pm 315$  (min. 400 y máx. 1630) g, respectivamente (Tabla 2).

### 4.2. Estimación de la prevalencia e intensidad media de infección

De los 34 individuos revisados, la prevalencia de infección fue del 100%. Por su parte, la intensidad media de infección fue de  $1.92 \times 10^6 \pm 2.07 \times 10^6$  (min.  $2.29 \times 10^5$  y máx.  $1.04 \times 10^7$ ) E/G (Tabla 2).

Tabla 2. Datos morfométricos de los hospederos, *Octopus bimaculatus*. Intensidad media de infección estimada en los hospederos, analizados en el presente estudio. LDM: Longitud dorsal del manto, PT: Peso total del pulpo, E/G: número de esporoquistes por gramo de tejido infectado.

Individuo	Sexo	LDM (cm)	PT (g)	E/G X 10 <sup>6</sup>
1		12	792	10
2		11	663	7
3		12	625	6
4		13	922	2.71
5		13	555	2
6	♀	17	1230	1.95
7	♀	13	795	1.88
8		16	1292	1.87
9		13	795	1.2
10		15	849	0.92
11		11	400	0.6
12		12	577	2.55
13		11	580	2
14		12	550	2
15		16	1555	2
16		12	625	1.94
17		16	1556	1.94
18		15	894	1.92
19		12	550	1.82
20		11	531	1.81
21		14	1054	1.81
22		12	575	1.77
23	♂	14	924	1.71
24	♂	12	499	1.12
25		12	1253	0.66
26		14	1051	0.62
27		12	529	0.57
28		14	929	0.55
29		16	1555	0.44
30		17	1630	0.34
31		11	503	0.33
32		12	556	0.32
33		13	792	0.3
34		13	910	0.22

### 4.3. Descripción taxonómica (Gestal et al. 2010)

#### *Aggregata* sp. (Fig. 5-6)

##### 4.3.1. Gamogonia

Se observó la fase de microgametos en desarrollo (Fig. 5a). Ésta se observó como una célula con numerosos núcleos periféricos, una vez maduros, los citoplasmas celulares sufrirán una fisión múltiple para dar lugar a microgametos con flagelos (maduros). El macrogameto presenta forma ovoide, citoplasma de aspecto esponjoso, núcleo excéntrico prominente y nucléolo intensamente teñido (Fig. 5b). Las fases de micro y macrogameto se encontraron rodeadas por una vacuola parasitófora y numerosos hemocitos.

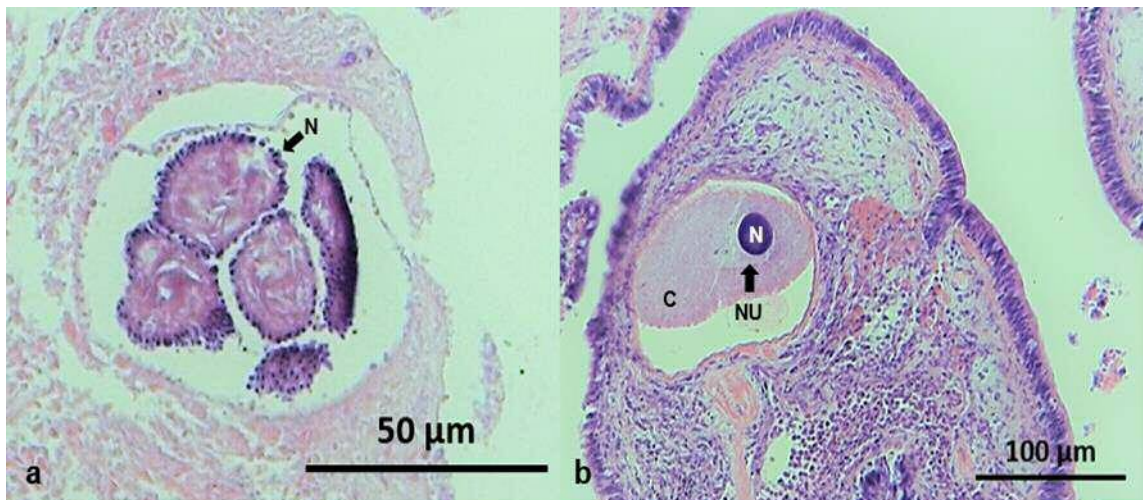


Figura 6. Micrografías de corte histológico del ciego de *Octopus bimaculatus* que muestran los estadios de gamogonia de *Aggregata* sp. (a) Microgametos en desarrollo mostrando numerosos núcleos en la periferia celular y plegamiento de la membrana plasmática, previo a la fisión del citoplasma. (b) Macrogameto mostrando núcleo excéntrico (NU), nucléolo (N) visible y citoplasma (C) de aspecto esponjoso distribuido uniformemente en la célula.

#### 4.3.2. Esporogonia

Oquistes (n=34 de 6 hospederos) (Fig. 6a):

Presentan forma ovoide, con un promedio de  $508 \pm 143$  (min. 293 y máx. 835)  $\mu\text{m}$  de longitud y  $400 \mu\text{m} \pm 134$  (177-688) de ancho. Contienen  $307 \pm 150$  (min. 135 y máx. 674) esporoquistes.

Esporoquistes (n=180 de 6 hospederos) (Fig. 6b, c y d):

Los esporoquistes maduros presentaron forma esférica, midieron  $18 \pm 2.28$  (min. 12 y máx. 24)  $\mu\text{m}$  de longitud y  $17 \pm 2.7$  (min. 11 y máx. 22)  $\mu\text{m}$  de ancho, el grosor de la pared fue de  $0.76 \pm 0.16$  (min. 0.4 y máx. 1.2)  $\mu\text{m}$ . El análisis ultraestructural mostró la presencia de una sutura que divide a los esporoquistes en dos valvas, así como una superficie revestida de proyecciones tubulares que miden  $1.2 \pm 0.381$  (min. 0.55 y máx. 2.19)  $\mu\text{m}$  de longitud y se distribuyen de forma desigual en la superficie de los esporoquistes.

Esporozoítos (n=35 de 5 hospederos) (Fig. 6e y f):

El número de esporozoítos en cada esporoquiste fue de 11-13. Presentan forma vermiforme con una longitud promedio de  $21 \pm 2.8$  (min. 16 y máx. 26)  $\mu\text{m}$ . El ancho apical, central y contra apical fue de  $2 \pm 0.34$  (min. 1.2 y máx. 3),  $2.5 \pm 0.36$  (min. 1.9 y máx. 3.7)  $\mu\text{m}$  y  $2.5 \pm 0.51$  (min. 1.5 y máx. 3.9)  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Cada esporozoíto presentó el núcleo situado en el extremo apical (Fig. 7).

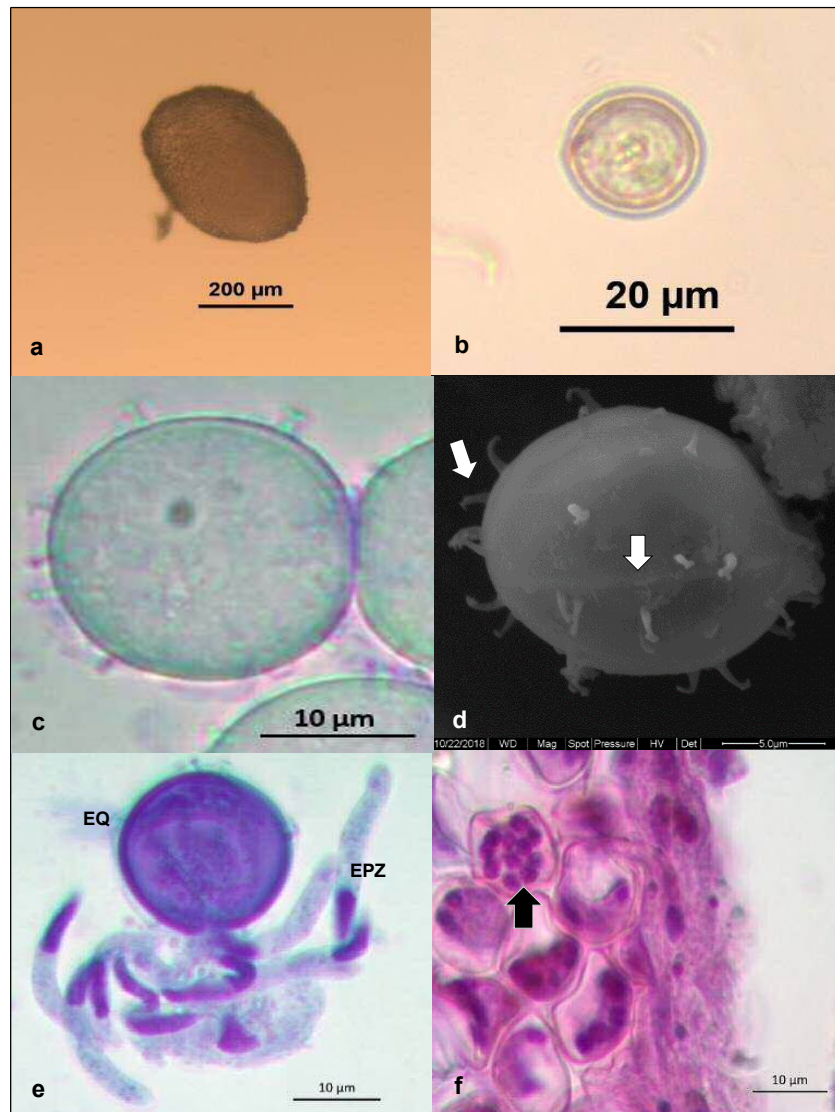


Figura 7. Micrografías del coccidio *Aggregata* sp. aislado del ciego de *Octopus bimaculatus*. a) Oquiste observado bajo un microscopio de luz. b) Observación de un esporoquiste en fresco mostrando el grosor de la pared del mismo. c) Esporoquiste observado en fresco mostrando las proyecciones tubulares que cubren la superficie del mismo. d) MEB de un esporoquiste. Nótese la sutura que divide a la estructura en dos valvas (flecha blanca) y las proyecciones tubulares (flecha blanca) en la pared del esporoquiste. e) Observación en fresco de un esporoquiste (EQ) teñido con Giemsa del cual se liberan 11 esporozoítos (EPZ). f) Sección histológica del ciego mostrando esporoquistes que contienen 11 esporozoítos (flecha negra).

#### 4.4. Resumen Taxonómico

Material tipo: Oquistes y esporoquistes en formol 4%. Corte histológico de ciego con las fases de gamogonia y esporogonia. Holotipo: será depositado en la Colección de Invertebrados de la Universidad Nacional Autónoma de México (CI-IBUNAM); Paratipos: serán depositados en la Colección Helmintológica del CINVESTAV-Mérida (CHCM) y Colección Helmintológica del Museo de Historia Natural de la Universidad Autónoma de Baja California Sur (CPMHN-UABCS). La asignación de números de catálogo está en trámite. Las secuencias de ADN serán depositadas en la base de datos GenBank.

Hospedero: *Octopus bimaculatus*, Verrill, 1883 (Mollusca: Octopodidae).

Localidad: Bahía de los Ángeles, Baja California, Golfo de California, México (29°00'N, 113°30'W).

Sitio de infección: Parásitos alojados en la submucosa del ciego digestivo.

Patología: Macroscópicamente, los oquistes se observaron como puntos blanquecinos. A nivel histológico, se observaron los estadios de gamogonia (macrogametos y microgametos), así como el estadio de esporogonia, (oquistes y esporoquistes maduros). A nivel histopatológico se observó distensión e inflamación del tejido, también ulceración del ciego en los hospederos más infectados.

Prevalencia: 100% (n = 34) de los pulpos *O. bimaculatus* presentaron infección por el coccidio *Aggregata* sp.

Intensidad de la infección:  $1.92 \times 10^6 \pm 2.07 \times 10^6$  (intervalo:  $2.29 \times 10^5 - 1.04 \times 10^7$ ) esporoquistes por gramo de tejido infectado.

Etimología: *Aggregata* sp.

#### **4.5. Análisis filogenético de *Aggregata* sp.**

Del coccidio *Aggregata* sp. que infecta a *O. bimaculatus* se obtuvieron tres secuencias parciales de tres individuos distintos, tomando como referencia una secuencia completa de 1795 pb del gen 18S ARNr del parásito apicomplejo, *Toxoplasma gondii* (Gagnon et al. 1996). Cada secuencia obtenida del gen 18S RNAr del coccidio fue de 1,533 pb las cuales, al ser comparadas con las secuencias disponibles en la base de datos GenBank, se confirmó que éstas pertenecen al género *Aggregata*, presentando 14 a 16% de disimilitud, respecto a *Aggregata eberthi* que infecta a *S. officinalis* en el Mar Adriático y Atlántico NE. En relación a las especies de coccidios que infectan a pulpos, *Aggregata* sp. de *O. bimaculatus* presentó una divergencia genética del 12% respecto a *Aggregata octopiana* del Mar Adriático y del Atlántico NE. Asimismo, el porcentaje de disimilitud varió de 9-12% entre *Aggregata* sp. de *O. bimaculatus* y las secuencias parciales de *A. octopiana* del Mediterráneo.

Para todas las secuencias obtenidas en este estudio, el mejor modelo de sustitución seleccionado por jModeltest fue el Modelo General de Tiempo Reversible con distribución gamma (GTR+G). El árbol filogenético de inferencia bayesiana mostró un clado mayor (probabilidad posterior alta, PP=1), conformado por especies de la familia Aggregatidae, y en el cual, las especies

del género *Aggregata* se agruparon en tres clados distintos (Fig. 7). Por un lado, *A. eberthi* que presenta un esporoquiste de superficie lisa, formó un clado diferenciado del resto de las especies de *Aggregata*. Por su parte, los coccidios que infectan exclusivamente hospederos pulpos conformaron un clado distinto. En este clado, el parásito *Aggregata* que infecta a *O. bimaculatus*, y que muestra proyecciones tubulares en la pared del esporoquiste, formó un clado independiente al conformado por *A. octopiana*, parásito de *O. vulgaris* del Atlántico NE y Mar Mediterráneo. *A. octopiana* mostró dos grupos diferenciados por su origen geográfico y características de la ultraestructura del esporoquiste (Fig. 8).



## 5. OBSERVACIONES TAXONÓMICAS GENERALES

La identificación y caracterización de especies de coccidios *Aggregata* en cefalópodos se basa en caracteres taxonómicos como tamaño de oquistes y esporoquistes, ultraestructura y número de esporozoítos de este último. Además, es posible considerar especificidad hospedatoria del coccidio hacia su hospedero definitivo como una característica ecológica y evolutiva de clasificación taxonómica (Gestal et al. 2005). Basado en los caracteres descritos anteriormente, a la fecha se han descrito 10 especies del género *Aggregata* en cefalópodos (Tabla 3). Al contrastar las características morfológicas de *Aggregata* sp. de *O. bimaculatus* con las especies descritas previamente, se observa que *Aggregata* sp. muestra características similares a las de *Aggregata millerorum* y *Aggregata dobelli* (ambas especies infectan a pulpos del Pacífico Oriental) (Tabla 3). *Aggregata* sp. es similar a *Aggregata millerorum* en el tamaño de los esporoquistes (12-24 vs 12-20  $\mu\text{m}$ , respectivamente) y a *Aggregata dobelli* en la longitud de los esporozoítos (21  $\mu\text{m}$  en ambas especies). Sin embargo, *Aggregata* sp. se distingue de *A. millerorum* porque presenta un mayor número de esporozoítos por esporoquiste (11-13 vs 8-10, respectivamente) y por el tamaño de los esporozoítos de ambas especies (21 vs 24  $\mu\text{m}$ , respectivamente). En cambio, *Aggregata* sp. presenta esporoquistes más pequeños que *A. dobelli* (12-24 vs 18-31  $\mu\text{m}$ , respectivamente) y un menor número de esporozoítos por esporoquiste (11-13 vs 9-22, respectivamente). Uno de los caracteres más conspicuos para diferenciar especies del género *Aggregata* es la

presencia/ausencia de ornamentaciones en la pared del esporoquiste y actualmente sólo se conocen dos tipos: lisa o espinosa. Con base en estos caracteres, *Aggregata* sp. de *O. bimaculatus* difiere de todas las especies descritas hasta ahora (Tabla 3), puesto que la pared de sus esporoquistes presenta numerosas proyecciones tubulares (Figura 6c y d).

Tomando en cuenta las características morfológicas de *Aggregata* sp. de *O. bimaculatus*, se observa una notable diferencia entre su coccidio y los previamente descritos para otras especies de parásitos de cefalópodos (Tabla 3). A su vez, estas diferencias son sustentadas con datos moleculares ya que presentan una divergencia mayor al 10% entre las secuencias del gen 18S ARNr de *Aggregata* sp. respecto a las de *A. octopiana* y *A. eberthi*, respectivamente.

Tabla 3. Especies de *Aggregata* descritas en hospederos cefalópodos. Datos morfométricos de los coccidios en intervalos y/o promedio ( $\pm$  desviación estándar) según los datos disponibles. Los guiones (-) indican los datos no están disponibles. Tabla obtenida y modificada de Castellanos-Martínez et al. (2013a).

Especies de <i>Aggregata</i>	Hospedero	Localidad	Oquistes			Esporoquistes			Esporozoitos			Referencias
			Longitud	Ancho	Longitud	Ancho	Ultraestructura	Grosor pared	Número	Longitud	Ancho	
<i>sp.</i>	<i>Octopus bimaculatus</i>	Bahía de los Angeles, B.C., México.	293 - 835 (508 $\pm$ 143)	177 - 688 (400 $\pm$ 134)	12-24 (18 $\pm$ 2.28)	11-22 (17 $\pm$ 2.7)	Proyecciones	0.4-1.2 (0.76 $\pm$ 0.16)	11-13	16-26 (21 $\pm$ 2.8)	1.3-3.9 (2.2 $\pm$ 0.48)	En este estudio
<i>octopiana</i>	<i>Octopus vulgaris</i>	Mar Mediterráneo, Océano del Noroeste Atlántico	100 - 1000	-	11 - 15	11 - 15	Espinosa	0.25 - 0.35	8	16 - 24	-	Gestal et al. (1999)
<i>octopiana</i>	<i>Octopus vulgaris</i>	Mar Tirreno	300 - 1300	300 - 1300	15 - 18	15 - 18	Espinosa	0.4 - 0.5	8	-	-	Tedesco et al. (2017)
<i>octopiana</i>	<i>Octopus vulgaris</i>	Mar Adriático	250 - 300	250 - 300	11 - 13	11 - 13	Lisa	0.3 - 0.4	8	-	-	Tedesco et al. (2017)
<i>octopiana</i>	<i>Octopus vulgaris</i>	Mar Jónico	250 - 500	250 - 500	10 - 12	10 - 12	Espinosa/lisa	0.3 - 0.4	8	-	-	Tedesco et al. (2017)
<i>aggregata sp.</i>	<i>Octopus vulgaris</i>	Mar Adriático, Mediterráneo	-	-	-	-	-	-	4 - 5, 8	-	-	Mladineo y Bočina (2007); Mladineo y Jozic (2005)
<i>eberthi</i>	<i>Sepia officinalis</i>	Noroeste Atlántico, Oeste Atlántico	-	-	8-9	-	Lisa	-	3	15 - 17	-	Labbé (1895)
<i>dobelli</i>	<i>Enterocotopus doffeini</i>	Océano Pacífico, Nororiental	506 - 1023 (736 $\pm$ 153)	219-471 (312 $\pm$ 88)	18 - 31 (23 $\pm$ 4)	15 - 27 (21 $\pm$ 3)	Lisa	-	9 - 22	18 - 23 (21 $\pm$ 2)	2	Poynton et al. (1992)
<i>millerorum</i>	<i>Octopus bimaculoides</i>	Noroeste Pacífico	308 - 770 (441 $\pm$ 108)	127-455 (269 $\pm$ 96)	12 - 20 (16 $\pm$ 2)	11 - 17 (14 $\pm$ 1)	Lisa	-	8 - 10	18 - 31 (24 $\pm$ 3)	2	Poynton et al. (1992)
<i>patagonica</i>	<i>Enterocotopus megalocyatus</i>	Atlántico suroeste	519 $\pm$ 133	346 $\pm$ 84	<sup>13</sup> (12.60 $\pm$ 0.86)	12 (11.70 $\pm$ 1.01)	Lisa	-	8	<sup>18</sup> (17.60 $\pm$ 0.71)	1.50 $\pm$ 0.16	Sardella et al. (2000)
<i>valdesensis</i>	<i>Octopus tehuelchus</i>	Suroeste Atlántico	250 $\pm$ 75	169 $\pm$ 39	<sup>10</sup> (9.12 $\pm$ 0.36)	<sup>10</sup> (8.5 $\pm$ 4.6)	-	-	4 - 8	<sup>17</sup> (16.73 $\pm$ 1.09)	2.65 $\pm$ 0.29	Sardella et al. (2000)
<i>bathytherma</i>	<i>Vulcanoctopus hydrothermalis</i>	Noroeste Pacífico	163 - 356 (245.6)	219 - 313 (255)	27 - 32 (27.9)	24 - 32	Lisa	1	14 - 17	49	5	Gestal et al. (2010)
<i>sagittata</i>	<i>Todarodes sagittatus</i>	Noroeste Atlántico	225 - 333 (286.6 $\pm$ 31.1)	20 - 323 (280.7 $\pm$ 30.3)	16 - 18 (17 $\pm$ 30.3)	15 - 17 (15.3 $\pm$ 0.7)	Lisa	1	4 - 8	11 - 13 (12.2 $\pm$ 0.8)	2 (2 $\pm$ 0.0)	Gestal et al. (2000)
<i>andresi</i>	<i>Martalia hyadesi</i>	Atlántico sudoeste	170 - 590 (430.8 $\pm$ 186.2)	200 - 530 (390.8 $\pm$ 97.8)	9.5 - 10 (9.7 $\pm$ 0.3)	8 - 8.5 (8.2 $\pm$ 0.3)	Lisa	1	3	16 - 20 (17.8 $\pm$ 1.3)	2-2.5 (2.1 $\pm$ 0.2)	Gestal et al. (2005)
<i>kudoi</i>	<i>Sepia elliptica</i>	Noroeste de la India	-	-	9 - 14	-	Lisa	-	6 - 12	16 - 18	-	Narasimhamurti (1979)

## 6. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se describe por vez primera uno de los grupos de parásitos considerados más peligrosos para la salud de los pulpos y que puede ocasionar pérdidas significativas en organismos de cultivo: coccidios *Aggregata* sp. (Gestal et al. 2007).

Los coccidios del género *Aggregata* son considerados el agente etiológico más importante en cefalópodos puesto que es habitual registrar una alta prevalencia de infección (80-100%) e intensidad de parasitismo de hasta  $82 \times 10^6$  E/G (Pascual et al. 2007; Mayo-Hernández et al. 2013). Un resultado similar se obtuvo en este trabajo en *O. bimaculatus*, ya que todos los organismos analizados presentaron coccidios (Prevalencia=100%) con una intensidad promedio  $1.92 \times 10^6$  E/G (Tabla 2). De acuerdo con los datos registrados en el Atlántico NE (Gestal et al. 2002a), la infección por *A. octopiana* en *O. vulgaris* es considerada alta cuando presentan  $\geq 1 \times 10^5$  E/G, mientras en el Mediterráneo, Baldascino et al. (2017) consideran alta a la infección cuando los individuos presentan  $\geq 1 \times 10^6$  E/G (en promedio) en la misma especie de hospedero. Tomando en cuenta los registros existentes, tanto si se considera un valor promedio o la presencia de al menos,  $\geq 1 \times 10^5$  E/G, en el caso de *O. bimaculatus* se puede decir que todos los pulpos analizados presentaron una alta infección. Cabe mencionar que el presente estudio se centró en el ciego digestivo; sin embargo, también se observaron individuos (<10%) con infección en las branquias e inclusive en los brazos. Este proceso de infección parasitaria se le

conoce como infección extraintestinal, y se atribuye a la reducción del espacio disponible en el tracto digestivo para el establecimiento de la infección (Ibáñez et al. 2005; Pascual et al. 2006).

En el ciclo de vida de *Aggregata* spp., los cefalópodos son su hospedero definitivo, por tanto es en el molusco donde se observan las fases de gamogonia y esporogonia (Dobell, 1925; Tenter, 2002) que habitualmente se observaron en la submucosa del ciego de *O. bimaculatus*. Es durante la fase de esporogonia donde se originan los oquistes y esporoquistes. Ambos estados presentan los caracteres taxonómicos para la identificación de *Aggregata* spp. tales como la estructura del esporoquiste (forma, tamaño, grosor y ultraestructura de la pared) y número de esporozoítos contenidos dentro de los mismos. Además, la especie de hospedero a la que infectan es una característica ecológica importante para su identificación dado que se considera que presentan especificidad hospedatoria a nivel del hospedero definitivo (Hochberg, 1983; Poynton et al. 1992).

Con base en lo anterior, se observaron notables diferencias entre el coccidio *Aggregata* sp. que infecta a *O. bimaculatus* y aquellas especies previamente descritas (Tabla 3). Sin embargo, la diferencia morfológica más destacada de *Aggregata* sp. con sus congéneres, además del hospedero al que infectan, es la presencia de estructuras tubulares sobre la superficie del esporoquiste (Tabla 3). Por otra parte, los análisis filogenéticos moleculares basados en el marcador molecular 18S ARNr apoyan que *Aggregata* sp. del pulpo

*O. bimaculatus* de Bahía de los Ángeles es un linaje de la familia Aggregatidae con evolución independiente.

Actualmente, de las 10 especies de *Aggregata* descritas en distintos cefalópodos, sólo dos han sido descritas con base en información morfológica y molecular; i.e., *A. octopiana* que infecta a *O. vulgaris* y *A. eberthi* que infecta a *S. officinalis* (ver Tabla 3) (Kopečná et al. 2006; Castellanos-Martínez et al. 2013a; Tedesco et al. 2017). En el presente estudio, se caracterizó a nivel morfológico, molecular y sobre un contexto filogenético a una tercera especie de coccidio *Aggregata* de cefalópodos (potencialmente nueva especie para la ciencia), la cual se incluyó dentro de la familia Aggregatidae (Fig. 7). Esta familia se caracteriza por incluir especies parásitas que infectan a invertebrados marinos, especialmente moluscos, crustáceos y anélidos (Kristmundsson y Freeman, 2018). Asimismo, el análisis filogenético también mostró que *Aggregata* sp. formó un grupo hermano con *A. octopiana*. A su vez, *A. octopiana* infecta a *O. vulgaris* en el Atlántico NE y Mediterráneo (Kopečná et al. 2006; Castellanos-Martínez et al. 2013a; Tedesco et al. 2017), pero se mantiene como un clado distinto de coccidios y, de manera interesante, difiere del resto de especies *Aggregata* por la ultraestructura de la pared del esporoquiste (Fig. 7).

Tomando en cuenta que la evaluación de caracteres morfológicos ha sido la herramienta de base para describir especies de coccidios, i.e., esporoquistes espinosos y lisos (Gestal et al. 1999; Sardella et al. 2000), las estructuras tubulares presentes en *Aggregata* sp. de *O. bimaculatus* son descritas por vez

primera en parásitos de cefalópodos. Por ello, se propone usar este caracter para distinguir especies de coccidios (Tabla 3) y a su vez, para distinguir especies crípticas de hospederos. Es decir, *O. bimaculatus* y *O. bimaculoides*, las cuales son dos especies que sostienen pesquerías importantes de pulpo en la Península de Baja California y que son muy similares morfológicamente (Jereb et al. 2014). Ambas especies presentan una mancha azul debajo de cada ojo y su distribución se traslapa en la costa de California y la Península de Baja California (Jereb et al. 2014; Domínguez-Contreras et al. 2018). Para distinguir entre ambas especies, es imprescindible conocer la diferencia en su patrón de manchas (López-Rocha et al. 2012; Hanlon et al. 2018). Por otra parte, puede resultar confuso discriminar juveniles de ambas especies de pulpos. Sin embargo, si se asume una relación coccidio-cefalópodo de tipo específica, sería factible identificar ambas especies de hospederos con base en la especie de coccidio que las infecta. Entonces, en términos de especificidad hospedatoria por parte de *Aggregata* spp., sería posible usar las estructuras tubulares de *Aggregata* sp. (aquí registradas) para diferenciar su asociación con especies de hospederos que aparentemente son crípticas; i.e., *O. bimaculatus* y *O. bimaculoides*. Algo similar fue planteado por Pickford y McConnaughey (1949) mediante el uso de los parásitos diciémidos, ya que *O. bimaculatus* y *O. bimaculoides* son infectados por especies distintas de estos parásitos desde etapas tempranas de su ciclo de vida (Pickford y McConnaughey 1949; Stunkard 1954). No obstante, los diciémidos no soportan daño mecánico y son destruidos mediante congelación (Hochberg, 1983). En cambio, los esporoquistes de los coccidios son estructuras de resistencia

capaces de soportar daño mecánico, químico e incluso cambios drásticos de temperatura (Mai et al. 2009; Tenter 2002; Berto et al. 2014). Además, la identificación del parásito no requiere de protocolos complicados ni equipo costoso ya que, la diferencia (presencia/ausencia de proyecciones en la pared del esporoquiste) entre las especies de *Aggregata* que infectan a *O. bimaculatus* y *O. bimaculoides* (Tabla 3) son fácilmente distinguibles por microscopía óptica de luz (con y sin tinción Giemsa). Por tanto, las estructuras tubulares en la pared del esporoquiste, podrían ser útiles como una aproximación rápida de discriminación entre ambas especies de hospederos pulpo.

## 7. CONCLUSIONES

1. Con base en los caracteres morfológicos, el coccidio que infecta al pulpo *Octopus bimaculatus* de Bahía de Los Ángeles, B.C. pertenece al género *Aggregata*.
2. El análisis filogenético realizado mediante la amplificación del gen 18S ARNr confirma que *Aggregata* sp. que infecta a *O. bimaculatus* pertenece a la familia Aggregatidae.
3. Con base en las características morfológicas y moleculares, el coccidio descrito en el presente estudio, representa una especie nueva para la ciencia y para el acervo del grupo de coccidios parásitos de cefalópodos.
4. *Aggregata* sp. corresponde al primer registro de coccidios descritos en un hospedero cefalópodo (*Octopus bimaculatus*) en México y el segundo en Latinoamérica.

## 8. LITERATURA CITADA

- Ambrose, R. F. 1984. Food preferences, prey availability, and the diet of *Octopus bimaculatus* Verrill. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 77: 29-44.
- Berto, B. P., D. McIntosh, y C. W. G. Lopes. 2014. Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 23: 1-15.
- Betancor, M. B., J. Estefanell, J. Socorro, J. Roo, y M. J. Caballero. 2010. Infestación por *Aggregata octopiana* en pulpo (*Octopus vulgaris*) durante su engorde en las Islas Canarias. *Revista Canaria de las Ciencias Veterinarias* 6 y 7: 31-34.
- Brusca R.C. 1980. Common Intertidal Invertebrates of the Gulf of California. 2da (ed). University of Arizona Press, Tucson, Arizona, 427 p.
- Bush, A. O., K. D. Lafferty, J. M. Lotz, y A. W. Shostak. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. Revisited. *The Journal of Parasitology* 83: 575.
- Castellanos-Martínez, S., M. Pérez-Losada, y C. Gestal. 2013a. Molecular phylogenetic analysis of the coccidian cephalopod parasites *Aggregata octopiana* and *Aggregata eberthi* (Apicomplexa: Aggregatidae) from the NE Atlantic coast using 18S rRNA sequences. *European Journal of Protistology* 49: 373-80.
- Castellanos-Martínez, S., y C. Gestal 2013b. Pathogens and immune response of cephalopods. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 447: 14-22.
- Castresana, J. 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution* 17: 540-52.
- CONAPESCA. 2018. Baja California Sur 1er lugar en captura de pulpo del litoral del océano Pacífico y 3er a nivel nacional. Disponible en: [www.gob.mx/sader/bajacaliforniasur/articulos/baja-california-sur-1er-lugar-en-captura-de-pulpo-del-litoral-del-océano-pacifico-y-3er-a-nivel-nacional?idiom=es](http://www.gob.mx/sader/bajacaliforniasur/articulos/baja-california-sur-1er-lugar-en-captura-de-pulpo-del-litoral-del-océano-pacifico-y-3er-a-nivel-nacional?idiom=es). Consultado el 19 de junio de 2019.
- Culling, C. F. A., R. T. Allison, y W. T. Barr. 1985. *Cellular Pathology Technique*. Cuarta (ed). Butterworths-Heinemann, Londres, 650 p.
- Dobell, C. F. R. S. 1925. The life-history and chromosome cycle of *Aggregata eberthi* [Protozoa: Sporozoa: Coccidia]. *Parasitology* 17:1-136.
- Domínguez-Contreras, J. F., A. Munguía-Vega, B. P. Ceballos-Vázquez, F. J. García-Rodríguez, y M. Arellano-Martínez. 2015. The Complete mitochondrial genome of *Octopus bimaculatus* Verrill, 1883 from the Gulf of California. *Mitochondrial DNA Part A* 27: 4584-4585.

- Domínguez-Contreras, J. F., A. Munguia-Vega, B. P. Ceballos-Vázquez, M. Arellano-Martínez, F. J. García-Rodríguez, M. Culver, y H. Reyes-Bonilla. 2018. Life histories predict genetic diversity and population structure within three species of octopus targeted by small-scale fisheries in Northwest Mexico. *PeerJ* 6: 1-25.
- Gagnon, S., D. Bourbeau, y R. C. Levesque. 1996. Secondary structures and features of the 18S, 5.8S and 26S ribosomal RNAs from the Apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Gene* 173: 129–35.
- Gestal, C., S. Pascual, L. Corral, y C. Azevedo. 1999. Ultrastructural aspects of the sporogony of *Aggregata octopiana* (Apicomplexa, Aggregatidae), a coccidian parasite of *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda) from NE Atlantic Coast. *European Journal of Protistology* 35: 417–425.
- Gestal, C., M. Páez de la Cadena, y S. Pascual. 2002a. Malabsorption syndrome observed in the common octopus *Octopus vulgaris* infected with *Aggregata octopiana* (Protista: Apicomplexa). *Diseases of Aquatic Organisms* 51: 61-65.
- Gestal, C., A. Guerra, S. Pascual, y C. Azevedo. 2002b. On the life cycle of *Aggregata eberthi* and observations on *Aggregata octopiana* (Apicomplexa, Aggregatidae) from Galicia (NE Atlantic). *European Journal of Protistology* 37: 427-435.
- Gestal C., E. Abollo, y S. Pascual. 2002c. Observations on associated histopathology with *Aggregata octopiana* infection (Protista: Apicomplexa) in *Octopus vulgaris*. *Diseases of Aquatic Organisms* 50: 45-49.
- Gestal, C., C. M. Nigmatullin, F. G. Hochberg, A. Guerra, y S. Pascual. 2005. *Aggregata andresi* n. sp. (Apicomplexa: Aggregatidae) from the ommastrephid squid *Martialia hyadesi* in the SW Atlantic Ocean and some general remarks on *Aggregata* spp. in cephalopod hosts. *Systematic Parasitology* 60: 65-73.
- Gestal, C., S. Pascual, y F. G. Hochberg. 2010. *Aggregata bathytherma* sp. nov. (Apicomplexa: Aggregatidae), a new coccidian parasite associated with a deep-sea hydrothermal vent octopus. *Diseases of Aquatic Organisms* 91: 237-242.
- Guillén-Hernández, S., A. López-Struck, C. González-Salas, y M. L. Aguirre-Macedo. 2018. *Octopus maya* parasites off the Yucatán Peninsula, Mexico. I. Faunal Assemblages. *Diseases of Aquatic Organisms* 130: 37-43.
- Hanlon, R., M. Vecchione, y L. Allcock. 2018. *Octopus, Squid, and Cuttlefish: A Visual, Scientific Guide to the Oceans' Most Advanced Invertebrates*. University of Chicago Press 31, 224 p.
- Hochberg F. G. 1983. The Parasites of cephalopods: A review by F. G. Hochberg. *Memoirs of the National Museum Victoria* 44:109-45.
- Ibáñez, C. M., M. C. Pardo-Gandarillas, y M. George-Nascimento. 2005. Uso del microhábitat por el protozoo parásito *Aggregata patagonica* Sardella, Ré y Timi, 2000 (Apicomplexa: Aggregatidae) en su hospedador definitivo, el pulpo *Enteroctopus megalocyathus* (Gould, 1852) (Cephalopoda:

- Octopodidae) en el sur de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 78: 441-450.
- Jereb, P., C. F. E. Roper, M. D. Norman, y J. K. Finn. 2014. *Cephalopods of the World: An Annotated and Illustrated Catalogue of Cephalopod Species Known to Date 3*. FAO, Roma, 398 p.
- Kopečná, J., M. Jirků, M. Oborník, Y. S., Tokarev, J. Lukeš, y D. Modrý. 2006. Phylogenetic analysis of coccidian parasites from invertebrates: search for missing links. *Protist* 157: 173–83.
- Kristmundsson, Á., y M. A. Freeman. 2018. Harmless sea snail parasite causes mass mortalities in numerous commercial scallop populations in the northern hemisphere. *Scientific Reports* 8: 1-12.
- López-Peraza, D. J., M. Hernández-Rodríguez, B. Barón-Sevilla, L. F. Bückle-Ramírez, y M. I. Grano-Maldonado. 2017. First record of *Stibarobdella moorei* (Annelida, Hirudinea, Piscicolidae) a marine leech parasitizing *Octopus bimaculatus* (Mollusca: Octopodidae) from the Mexican Pacific coast. *Helminthologia* 54: 322-329.
- López-Rocha, J. A., M. Arellano-Martínez, B. P. Ceballos-Vázquez, I. Velázquez-Abunader, S. Castellanos-Martínez, y E. Torreblanca-Ramírez. 2012. Use of length: frequency analysis for growth estimation of the California two-spotted *Octopus bimaculatus* Verrill 1883 of the Gulf of California. *Journal of Shellfish Research* 31: 1173-1181.
- Mai, K., P. A. Sharman, R. A. Walker, M. Katrib, D. De Souza, M. J. McConville, M. G. Wallach, S. I. Belli, D. J. P. Ferguson, y N. C. Smith. 2009. Oocyst wall formation and composition in coccidian parasites. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 104: 281-289.
- Mayo-Hernández, E., E. Barcala, E. Berriatua, A. García-Ayala, y P. Muñoz. 2013. *Aggregata* (Protozoa: Apicomplexa) infection in the common octopus *Octopus vulgaris* from the West Mediterranean Sea: the infection rates and possible effect of faunistic, environmental and ecological factors. *Journal of Sea Research* 83: 195–201.
- Padial, J. M., A. Miralles, I. De la Riva, y M. Vences. 2010. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology* 7: 1-14.
- Pardo-Gandarillas, M. C., K. B. Lohrmann, A. L. Valdivia, y C. M. Ibáñez. 2009. First record of parasites of *Dosidicus gigas* (d' Orbigny, 1835) (Cephalopoda: Ommastrephidae) from the Humboldt current system off Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 44: 397-408.
- Pardo-Gandarillas, M. C., K. B. Lohrmann, M. George-Nascimento, y C. M. Ibáñez. 2014. Diet and parasites of the jumbo squid *Dosidicus gigas* in the Humboldt current system. *Molluscan Research* 34: 10-19.
- Pascual, S., C. Gestal, J. M. Estévez, H. Rodríguez, M. Soto, E. Abollo, y C. Arias. 1996. Parasites in commercially-exploited cephalopods (Mollusca, Cephalopoda) in Spain: an updated perspective. *Aquaculture* 142: 1–10.
- Pascual, S., A. F. González, y A. Guerra. 2006. Unusual sites of *Aggregata octopiana* infection in octopus cultured in floating cages. *Aquaculture* 254: 21–23.

- Pascual, S., A. González, y A. Guerra. 2007. Parasites and cephalopod fisheries uncertainty: towards a waterfall understanding. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 17 (2–3): 139–44.
- Pickford, G.E., y B. H. McConnaughey. 1949. The *Octopus bimaculatus* Problem: A Study in Sibling Species. 12va (ed). New Haven Conn. Bull. Bingham Oceanographic Coll., 66 p.
- Poynton, S. L., R. Reimschuessel, y M. K. Stooskopf. 1992. *Aggregata dobelli* n. sp. and *Aggregata millerorum* n. sp. (Apicomplexa: Aggregatidae) from two species of *Octopus* (Mollusca: Octopodidae) from the Eastern North Pacific Ocean. *The Journal of Protozoology* 39: 248-56.
- Roumbedakis, K., M. Drábková, T. Tylm, y C. di Cristo. 2018. A perspective around cephalopods and their parasites, and suggestions on how to increase knowledge in the field. *Frontiers in Physiology* 9: 1573.
- Sardella, N. H., M. E. Ré, J. T. Tim. 2000. Two new *Aggregata* species (Apicomplexa: Aggregatidae) infecting *Octopus tehuelchus* and *Enteroctopus megalocyathus* (Mollusca: Octopodidae) in Patagonia, Argentina. *Journal of Parasitology* 86: 1107-1113.
- Stunkard, H. W. 1954. The life-history and systematic relations of the Mesozoa. *The Quarterly Review of Biology* 29: 230-244.
- Sykes, A. V., E. Almansa, G. M. Cooke, G. Ponte, y P. L. R. Andrews. 2017. The digestive tract of cephalopods: a neglected topic of relevance to animal welfare in the laboratory and aquaculture. *Frontiers in Physiology* 492: 1-16.
- Tedesco, P., C. Gestal, K. Begic, e I. Mladineo. 2017. Morphological and molecular characterization of *Aggregata* spp. Frenzel 1885 (Apicomplexa: Aggregatidae) in *Octopus vulgaris* Cuvier 1797 (Mollusca: Cephalopoda) from Central Mediterranean. *Protist* 168: 636-48.
- Tenter, A. M., J. R. Barta, I. Beveridge, D. W. Duszynski, H. Mehlhorn, D. A. Morrison, R. C. A. Thompson, y P. A. Conrad. 2002. The conceptual basis for a new classification of the coccidia. *International Journal for Parasitology* 32: 595-616.
- Villegas, E. J. A., B. P. Ceballos-Vázquez, U. Markaida, A. Abitia-Cárdenas, M. A. Medina-López, y M. Arellano-Martínez. 2014. Diet of *Octopus bimaculatus* Verrill, 1883 (Cephalopoda: Octopodidae) in Bahía de Los Ángeles, Gulf of California. *Journal of Shellfish Research* 33: 305-314.
- WoRMS. s/f. World Register of Marine Species - Aggregatidae Labbé, 1899. Disponible: [www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=391853](http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=391853). Consultado el 26 de julio de 2019.