

Protocolo de recolecta y tinción para el estudio taxonómico de los policládidos (Platyhelminthes: Polycladida)

Mariela Ramos-Sánchez* 

Resumen

El estudio taxonómico de los policládidos (orden Polycladida) se remonta al siglo XIX. La taxonomía tradicional de estos organismos requiere una combinación de la morfología externa e interna del cuerpo y del sistema reproductor hermafrodita, en donde la técnica histológica es una herramienta indispensable que desempeña un papel clave en este proceso. Este protocolo abarca los procesos de recolección hasta la preparación de las muestras para el análisis histológico, adaptando y mejorando técnicas previamente establecidas por otros autores para una visualización clara y precisa de las estructuras anatómicas. Los ejemplares se recolectan manualmente utilizando pinceles de cerdas finas, son fotografiados dorsal y ventralmente, se fijan en formalina congelada al 10 % neutralizada con borato de sodio y son preservados en etanol al 70°. Para la clasificación taxonómica, se emplean montajes completos de los organismos y secciones sagitales del sistema reproductor hermafrodita; para cada uno de ellos se realiza un protocolo histológico de cinco pasos que incluye la hidratación, tinción, deshidratación/diferenciación, limpieza/transparencia y montaje en portaobjetos. Esta técnica estandarizada complementa estudios morfológicos y taxonómicos del taxón.

Palabras clave: Cotylea, carmalum de Mayer, estudio taxonómico, gusanos planos, secciones sagitales.

Recibido: 11 de marzo de 2024.

Abstract

The taxonomic study of polyclads (order Polycladida) dates back to the 19th century. The traditional taxonomy of these organisms requires a combination of the external and internal morphology of the body and the hermaphroditic reproductive system, where the histological technique is an indispensable tool that plays a key role in this process. This protocol covers the collection processes up to the preparation of the specimens for histological analysis, adapting and improving techniques previously established by other authors for clear and precise visualization of the anatomical structures. Specimens are collected manually using fine paintbrush, photographed dorsally and ventrally, fixed in 10% frozen formalin neutralized with sodium borate and preserved in 70° ethanol. For taxonomic classification, complete mounts of the organisms and sagittal sections of the hermaphroditic reproductive system are used; a five-step histological protocol including hydration, staining, dehydration/differentiation, cleaning/transparency, and slide mounting is performed for each. This standardized technique complements morphological and taxonomic studies of the taxon.

Key words: Cotylea, flatworms, Mayer's carmalum, sagittal sections, taxonomic study

Aceptado: 05 de junio de 2024.

¹ Laboratorio de Sistemática de Invertebrados Marinos (LABSIM), Universidad del Mar, campus Puerto Ángel, Ciudad Universitaria, Apdo. Postal 47, Puerto Ángel, Oaxaca, 70902, México.

* **Autor de correspondencia:** rmariela220@gmail.com

Introducción

El orden Polycladida, conocidos como gusanos planos marinos, son invertebrados, hermafroditas simultáneos y pertenecen al filo Platyhelminthes Minot, 1876 (Hyman 1951). El orden alberga una amplia diversidad de organismos marinos distribuidos desde las zonas tropicales hasta las polares, abarcando el intermareal hasta la zona batial a 2660 metros de profundidad (Newman & Cannon 2003, Quiroga *et al.* 2006). Aunque son organismos principalmente bénticos (Hyman 1951), también incluyen especies pelágicas, simbiontes e intersticiales (Faubel 1984a, Faubel *et al.* 2007, Westheide 1991), con algunas excepciones, como el género *Limnostylochus*, que habita en agua dulce (Faubel 1983) y *Myoramyxa*, de hábitos semiterrestres (Newman & Cannon 1997).

Los policládidos desempeñan múltiples roles ecológicos, ya sea, como depredadores de organismos sésiles (*e.g.* esponjas, ascidias, moluscos, etc.) y móviles (*e.g.* poliquetos) (Newman & Cannon 2003, Tsuyuki *et al.* 2020), eliminadores de desechos biológicos de los pólipos de corales escleractinios, bioindicadores de la salud de los arrecifes (Lee *et al.* 2006, Lin *et al.* 2017) y reservorios de compuestos tóxicos (*e.g.* tetrodotoxina) y microorganismos (Lin *et al.* 2017) con diversas aplicaciones prácticas en campos como la toxicología, en el desarrollo de productos farmacéuticos y la regeneración (Quiroga *et al.* 2015, McNab *et al.* 2022).

A pesar de lo anterior, la riqueza específica de los policládidos es poco conocida. En todo el mundo se han descrito ~977 especies, distribuidas en 181 géneros, 43 familias y dos subórdenes (Tyler *et al.* 2006-2024); sin embargo, este número se estima infravalorado, debido, a la dificultad para estudiar apropiadamente a los policládidos. Entre las dificultades más

resaltantes para el estudio de estos organismos se reconocen las complicaciones en los métodos de recolección, fijación (daño o autólisis de los especímenes), identificación taxonómica (reconocimiento de la anatomía externa e interna) y la inestabilidad sistemática (Aguado *et al.* 2017, Bahia *et al.* 2017, Dittmann *et al.* 2019, Goodheart *et al.* 2023) que han generado poco interés entre los investigadores de los invertebrados marinos.

La taxonomía tradicional de los policládidos a partir de la morfología, requiere de una combinación de la información de caracteres externos e internos, tales como la ausencia/presencia de la ventosa ventral que definen a los subórdenes Acotylea y Cotylea, respectivamente; la coloración y patrón de coloración, la disposición de los ocelos, tentáculos, faringe, el número de gonoporos masculinos y femeninos y la organización del sistema reproductor hermafrodita, como la presencia/ausencia de la vesícula seminal, vesícula prostática, papila peneal, del estilete, la disposición de la vagina, las glándulas de cemento, la presencia/ausencia de la vesícula de Lang, etc., que permiten la diferenciación a nivel de superfamilia hasta especie (Faubel 1983, 1984b, Prudhoe 1985, Newman & Cannon 2003, Goodheart *et al.* 2023), en donde la técnica histológica es una herramienta indispensable y juegan un papel clave en el estudio taxonómico de los policládidos (Newman & Cannon 2003).

El estudio taxonómico e histológico de Polycladida se remonta al siglo XIX. La monografía de Lang (1884) marcó el comienzo de un esfuerzo concertado para estudiar el grupo; a partir del cual se desarrollaron diversos métodos de anestesia, fijación, preservación y tinción de secciones seriadas histológicas del sistema reproductor hermafrodita (*e.g.* Lang

(1884), Laidlaw (1903), Knudsen (1966) Faubel (1983), etc.). Los métodos empleados resultaron ser complejos y laboriosos lo que condujo a la obtención de organismos que no lograban conservar su forma completamente plana; en lugar de ello, se obtenían organismos enrollados, fragmentados o simplemente rotos, lo que generaba especímenes no identificables o dificultaba el estudio anatómico (Newman & Cannon 1995).

Por un lado, autores como Newman *et al.* (1993) y Newman & Cannon (1995, 2003) han establecido metodologías completas para el estudio taxonómico de los policládidos; mientras que Quiroga *et al.* (2004), Cuadrado *et al.* (2017) y Pérez-García *et al.* (2018) han propuesto modificaciones en las soluciones fijadoras utilizadas, como la formalina al 10% (Quiroga *et al.* 2004), el Bouin o la formalina al 4% (Cuadrado *et al.* 2017, Pérez-García *et al.* 2018), todas ellas en estado sólido, lo que ha permitido conservar intactos a los especímenes y facilitar la obtención exitosa de muestras y el trabajo de identificación taxonómica.

Sin embargo, las metodologías propuestas por Newman & Cannon (1993, 1995, 2003) implican el uso de una mezcla de soluciones fijadoras, como la formalina mezclada con acetato de calcio anhidro, propilenglicol y propilfenoxetol (especialmente para el suborden Acotylea y especies templadas), lo que complica el proceso. Además, emplean tinciones en los montajes de organismos completos con hematoxilina de Mayer y aclarados con Xilol (Newman & Cannon 1995), pero este último dificulta la visualización de las estructuras internas de los ejemplares (observación personal). Por ello, el presente trabajo tiene como objetivo proporcionar una técnica estandarizada de los procesos de fijación, la realización de montajes completos teñidos y la preparación

de secciones seriadas del sistema reproductor hermafrodita, con el fin de facilitar la visualización de los ejemplares en el estudio taxonómico y anatómico.

Método de recolección

A nivel cuantitativo sólo se ha analizado la distribución y diversidad de los policládidos bentónicos de siete regiones del Gran Caribe, en donde se ha encontrado que en la mayoría de las especies (34 de 67) tienden a presentar una baja incidencia en términos de densidades, dichas especies estaban representadas por uno o dos individuos (Rawlinson 2008), por ello, se recomienda hacer estudios ecológicos por unidad de tiempo (*e.g.* ~1 o 2 h) (Rawlinson 2008, Tosetto *et al.* 2023) y adecuarlos al tipo de sustrato muestreado, profundidad, estacionalidad y periodicidad del área de muestreo (Tosetto *et al.* 2023); y no otros métodos que restrinjan las zonas de muestreo a un transecto determinado.

La recolección de los gusanos se realiza de manera directa, extrayendo los especímenes del sustrato (*e. g.* rocas coralinas, debajo de piedras, entre algas, moluscos, arena, etc.) y utilizando un pincel de cerdas finas del #5 o 10. Posteriormente, se transfieren en un bote de plástico de aproximadamente 250 ml o en una bolsa de plástico hermética, previamente llenado con agua marina. Los organismos recolectados deberán ser depositados individualmente para reducir el estrés y evitar el canibalismo (Newman & Cannon 1995), ser protegidos de la luz solar y transportados al laboratorio.

Una vez en el laboratorio, la observación se lleva a cabo utilizando un microscopio estereoscópico (Figura 1). Los gusanos se fotografían en vivo dorsal y ventralmente, para registrar el color y los patrones de

coloración (Newman & Cannon 1995).

Se recomienda recolectar un mínimo de tres a cuatro especímenes por morfotipo (especie). Uno de estos especímenes se destinará para la elaboración de un montaje completo, otro para las secciones sagitales seriadas del sistema reproductor y otro más para ser preservado en una solución de etanol a 70° para tener una muestra que preserve el patrón de coloración de los ejemplares. Estos pasos permiten obtener observaciones detalladas, caracterizaciones precisas y una correcta identificación taxonómica de los organismos.

Método de anestesia

Para la relajación de los policládidos se han recomendado el uso de diversas soluciones, como el uso del etanol al 5% (Newman & Cannon 1993), cloruro de magnesio ($MgCl_2$) al 7.5% (Marquina *et al.* 2014, Pérez-García *et al.* 2018) y una mezcla de agua de mar y $MgCl_2$ al 7% congelada (Cuadrado *et al.* 2017). Sin embargo, estos métodos fueron probados en este trabajo con organismos que habitan en zonas tropicales (temperaturas de $\pm 28^\circ C$), métodos que no resultaron ser exitosos, ya que aceleraban el proceso de autólisis de los organismos; debido a ello, no se recomienda utilizar ningún método químico de relajación.

Si la fijación no puede llevarse a cabo de inmediato después de tomar las fotografías, se recomienda colocar los especímenes en frascos de plástico con agua marina, en un entorno oscuro, sin aireación y de forma individual para minimizar el estrés (Newman & Cannon 1995, 2003) durante un periodo de entre 3 y 12 horas dependiendo del tamaño y coloración de los ejemplares. Aquellos especímenes con coloraciones opacas (*e.g.* blancos o translúcidos) y de tamaño < 2 cm pueden ser

dejados en reposo por hasta 12 horas. En cambio, aquellos con coloraciones más llamativas (*e.g.* negros, naranjas, azules, etc.) y de tamaño > 2 cm, pueden ser dejados en reposo por un período de 3 a 6 horas como máximo (observación personal).

Método de fijación y preservación

Al menos 24 horas antes de la recolección, se debe congelar agua marina y la solución fijadora (una mezcla de agua marina y formalina al 10%, neutralizada con borato de sodio hasta la saturación). De manera independiente las soluciones se verterán en cajas de Petri, ocupando aproximadamente 1/3 de la capacidad de la caja (Newman & Cannon 1995, 2003) y congeladas para su uso ($\sim -18^\circ C$).

Previo al proceso de fijación y para fines moleculares (Fig. 1), se sugiere cortar un pequeño trozo del extremo posterior de los ejemplares; después de la toma de fotografías estos deberán ser colocados sobre trozos de papel filtro o absorbente humedecido que rebasen el tamaño de los ejemplares y ser depositados en la placa de agua marina congelada (modificado de Cuadrado *et al.* 2017) y proceder a cortar un pequeño trozo del ejemplar para el análisis molecular, el cual será preservado en etanol a 95° o 100° (Newman & Cannon 2003).

Posterior al procedimiento anterior, se continuará con la fijación de los ejemplares en la solución fijadora de formalina al 10% congelada; los ejemplares deben colocarse sobre un trozo de papel filtro o absorbente humedecido ligeramente más grande que la longitud total del gusano, inmediatamente se colocan sobre la placa de formalina congelada y se espera unos minutos hasta que la formalina alcance el estado líquido (Fig. 1). Este proceso permite que el espécimen se relaje y fije en

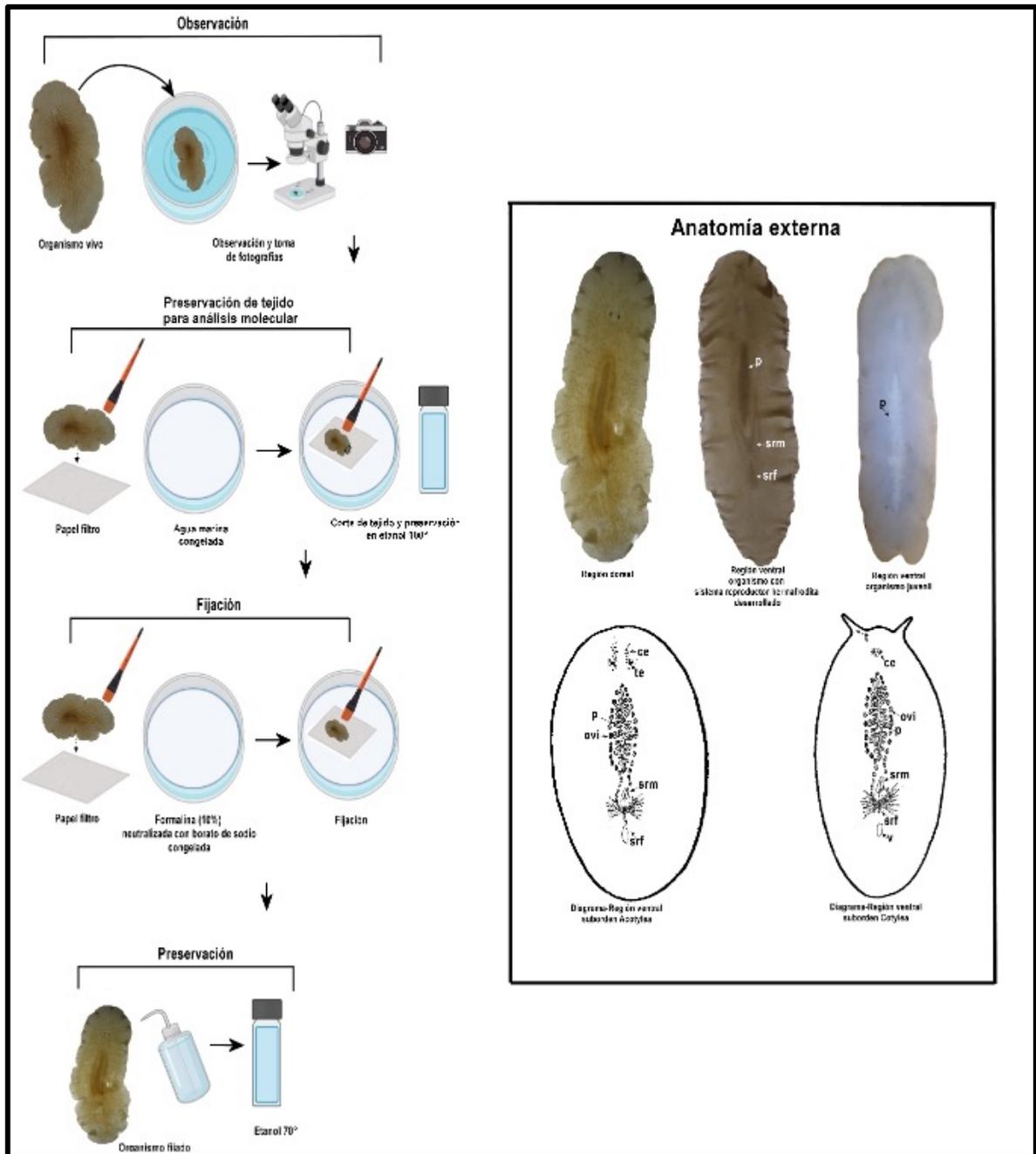


Figura 1. Diagrama de los pasos que se siguen durante la observación y preservación de los policládidos. En este se muestra los procedimientos de observación, preservación del tejido seccionado para análisis moleculares, fijación y preservación de los organismos completos y la anatomía externa de los ejemplares fijados, así como un diagrama de general de la anatomía externa e interna (Los instrumentos de laboratorio fueron tomados de la plataforma de BioRender® de la versión gratuita).

una posición apropiada para posteriores observaciones. Si el animal se contrae, se puede alargar el cuerpo del animal con mucha delicadeza usando pinceles de cerdas final del # 5. A continuación, una vez que el animal se deja de mover, se

lleva a refrigeración ($\sim 10^{\circ}\text{C}$) durante un periodo de 12 (mínimo para ejemplares < 2 cm) a 24 h (máximo para ejemplares > 2 cm) para que penetre el fijador (modificado de Quiroga *et al.* 2004). Tras este periodo, los especímenes se colocan en

una caja Petri con agua destilada durante una hora para eliminar el exceso de fijador. Por último, los policládidos deben etiquetarse y conservarse en etanol a 70° (Fig. 1).

Proceso de tinción y montaje

Tinción de organismos completos

En policládidos se ha sugerido el montaje de organismos completos con el fin de facilitar la visualización de los ejemplares en el estudio taxonómico y anatómico, empleando como colorante la hematoxilina de Mayer y el xilol como solución aclarante (Newman & Cannon 1995), mismo que no dieron resultados favorables en los ejemplares utilizados en este trabajo (observación personal).

El procedimiento empleado en la tinción de organismos completos en este trabajo, fue modificado a partir del método propuesto por Pritchard & Kruse (1982), técnica empleada en los platelmintos parásitos; el método utiliza la tinción de carmalum de Mayer y como solución aclarante el salicilato de metilo, combinación que permite la observación exitosa de las estructuras externas e internas que no son visibles en los ejemplares vivos, por los colores o patrones de coloración que ostentan o que se tornan opacos por el proceso de fijación (*e.g.* disposición de los ocelos, faringe, gonoporos y el sistema reproductor hermafrodita en vista dorsal y ventral (Fig. 1).

El proceso consta de cinco pasos: hidratación, tinción, deshidratación/diferenciación, limpieza/transparencia y montaje (Fig. 2) (estos pueden ser pausados entre cada paso, sin embargo, se recomienda completar el proceso una vez iniciado). Los especímenes se introducen en etanol, a concentraciones decrecientes (70°, 50° y

35°) durante 1 h en cada concentración de etanol. Por último, se sumergen en agua destilada durante 1 h. Para la tinción, se utiliza carmalum de Mayer (6 gr de sulfato de aluminio y potasio, 5 ml de carmín, 25 ml de ácido acético glacial y 100 ml de agua destilada) donde los especímenes se sumergen durante 1 min e inmediatamente se lavan con agua destilada hasta eliminar el exceso de colorante, durante 30 min aproximadamente.

La deshidratación se realiza en etanol a concentraciones ascendentes (35°, 50° y 70°) durante una hora en cada concentración. Para que el colorante se fije a nivel celular; las muestras se introducen en etanol-ácido (9:1) al 70% (mezcla 9 partes de etanol con 1 parte de ácido clorhídrico concentrado), hasta eliminar el exceso de colorante (hasta que el ejemplar deje de desprender colorante). Después, se sumergen en etanol básico al 70% (mezclar con carbonato de litio a saturación) durante 1 h para restablecer el pH de las células. A continuación, se lleva a cabo el proceso de deshidratación con etanol a concentraciones ascendentes (70°, 80°, 96°, y dos veces en 100°) durante una hora en cada concentración. En el proceso de limpieza/transparencia del tejido, se utiliza salicilato de metilo-etanol en concentraciones graduales (25, 50 y 75%) durante 1 h en cada concentración. Por último, los especímenes se sumergen en salicilato de metilo absoluto durante una hora más (modificado de Pritchard & Kruse 1982) (Fig. 2).

Montaje

Para montar las muestras de especímenes completos, se utiliza bálsamo de Canadá. Debido al proceso de fijación, el cuerpo de los policládidos se vuelve grueso y turgente. Para montarlos correctamente entre el portaobjetos y el cubreobjetos,

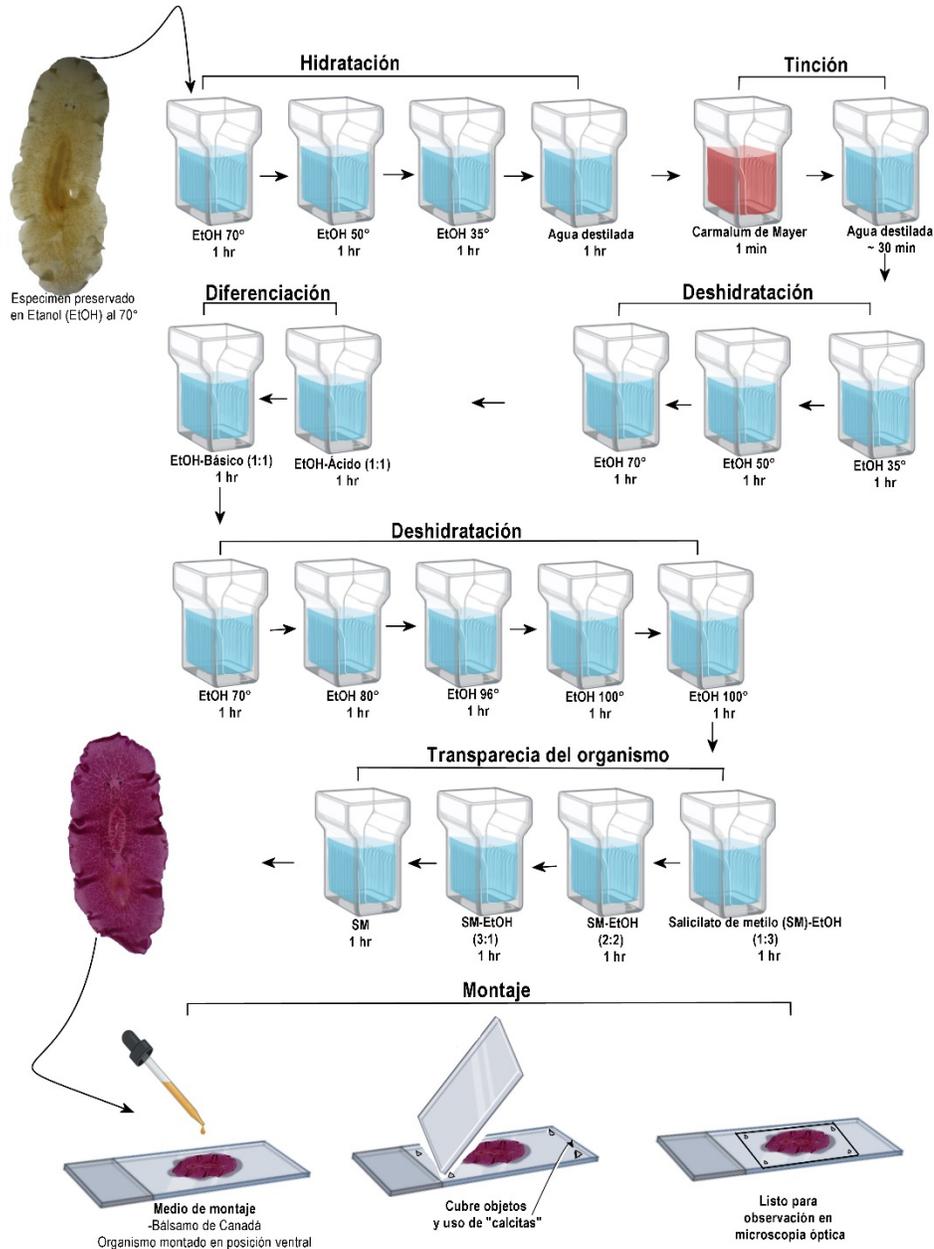


Figura 2. Diagrama de los pasos que se siguen durante el proceso de tinción y montaje de organismos completos. Los tiempos son aproximados, estos dependen del grosor del organismo. Tras el montaje y secado (evaporación del citosol), las secciones se pueden observar con el microscopio óptico (Diagrama modificado de Megías *et al.* 2024, los instrumentos de laboratorio fueron tomados de la versión gratuita de la plataforma de BioRender®).

es necesario utilizar pequeños triángulos (“calcitas”) de portaobjetos alojados en las esquinas de los cubreobjetos (Fig. 2). Una vez seco, el bálsamo nos permite rellenar los espacios vacíos formados tras el secado del medio de montaje, esto se hace con la

ayuda del bálsamo diluido (80% aprox.) en xilol o citosol (modificado de Pritchard & Kruse 1982). Tras el montaje, relleno y secado (evaporación del solvente orgánico ~ dos semanas), los ejemplares se pueden observar con el microscopio óptico.

Tinción del aparato reproductor masculino y femenino

Bloques de tejido y secciones seriadas

Se deben seleccionar especímenes preservados, con órganos reproductores desarrollados de cada morfotipo (especie) (Fig. 1). Se utiliza un bisturí, para seccionar la porción de tejido perteneciente al sistema reproductor masculino y femenino, los cuales se ubican en la región posterior de la faringe (Fig. 3). Una vez obtenido el tejido, se somete a deshidratación en etanol en concentraciones ascendente (70°, 80°, 90° y 100°) durante 20 min en cada uno, hasta llegar a una solución de citrosol-etanol (1:1) durante 20 min (el citrosol puede sustituirse por cualquier otro solvente orgánico como el xilol, etc., que sea compatible con el etanol y la parafina). Posteriormente, el tejido se sumerge en citrosol absoluto durante 25 min (dos veces). A continuación, el tejido es infiltrado con Paraplas®-citrosol (58-60 °C) durante 1 h, posteriormente en Paraplas® (58-60 °C) (Modificado de Humason 1962) durante 1 h y, por último, se realiza una inclusión en Paraplas® (58-60 °C) (Fig. 3), el tejido es dispuesto en posición sagital para hacer los bloques (Newman & Cannon 1995), adicional a este proceso Ramos-Sánchez *et al.* (2020), han sugerido el seccionamiento del tejido en un plano frontal para el análisis detallado de algunas estructuras como el caso de la familia Boniniidae.

Una vez que los bloques realizados se hayan endurecido, son seccionados de manera seriadas (grosor de 6-8 µm) (Fig. 4); estas son recogidas y se someten a un baño de flotación (5 a 10 min) para la adhesión del tejido sobre los portaobjetos (a los portaobjetos se les puede adicionar albumina o al agua se le puede adicionar grenetina); después se dejan secar antes de teñirlas (Humason 1962).

Tinción del corte histológico

Las secciones histológicas del aparato reproductor, se somete a los procesos de desparafinado, hidratación, tinción, deshidratación, limpieza/transparencia del tejido y montaje. La eliminación de la parafina del tejido se realiza en soluciones absolutas de citrosol durante 5 min (dos veces). Para la hidratación se utiliza etanol en soluciones descendentes (100, 96°, 80°, 70° y 50°) y finalmente en agua destilada durante 5 min en cada solución (Fig. 4).

En la tinción se utiliza como colorante inicial la hematoxilina durante 5 min e inmediatamente se lava con agua destilada hasta eliminar el exceso de colorante; para fijar el colorante se emplea etanol-ácido (70%) durante 6 s y después se lava con agua destilada hasta eliminar el exceso de colorante; se somete en agua-amoniacal (30%) durante 4 s y finalmente se emplea la tinción de eosina durante 2 s (Fig. 4).

La deshidratación se realiza en etanol ascendente (50°, 70°, 80°, 96°, y dos veces al 100°) y citrosol (modificado de Humason 1962) durante 5 min en cada concentración y se utiliza en solución absoluta de citrosol durante 5 min para la limpieza y aclarado del tejido. Las secciones se montan en cytosel® (puede sustituirse por cualquier otro medio de montaje como resina, bálsamo de Canadá, etc.) (Fig. 4) y se dejan secar unos días antes de ser revisadas (~ una semana); transcurrido este tiempo, las secciones pueden observarse con microscopía óptica (Fig. 5).

El presente trabajo proporciona una valiosa contribución al entendimiento de los policládidos marinos, un grupo de organismos que ha sido históricamente subestimado (Tosetto *et al.* 2023) debido a la complejidad de su recolección, manipulación e identificación. A través de un protocolo detallado, hemos establecido

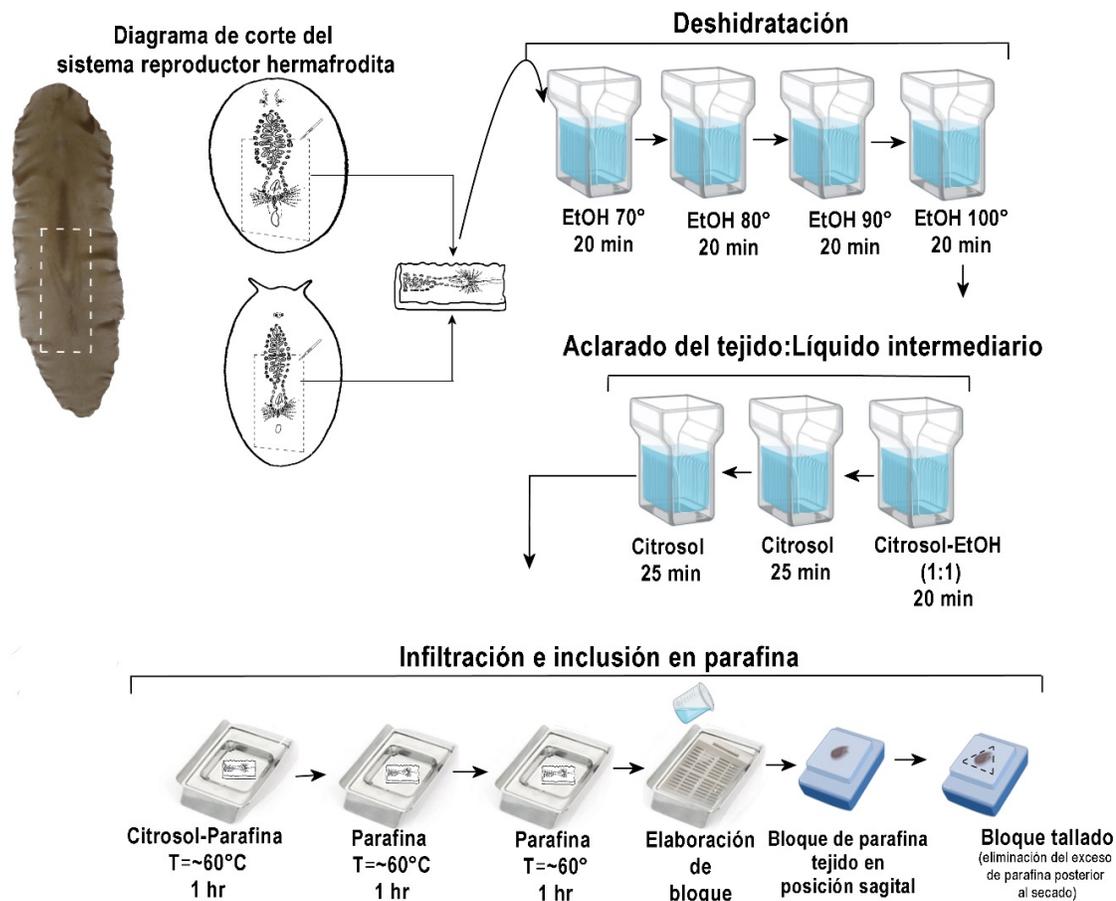


Figura 3. Esquema de la inclusión en parafina de una muestra de tejido previamente fijada, en donde se realiza el seccionamiento sagital seriado del sistema reproductor hermafrodita de un policládido. Los tiempos de incubación en cada paso pueden variar en función del tamaño de la muestra (Diagrama modificado de Megías *et al.* 2024, los instrumentos de laboratorio fueron tomados de la versión gratuita de BioRender®).

una base sólida para investigaciones futuras sobre estos organismos, resaltando la importancia continua de las herramientas histológicas en el estudio de la biodiversidad marina.

Los policládidos, como invertebrados hermafroditas marinos, desempeñan diversos roles ecológicos, desde la depredación hasta la regulación de la salud de los arrecifes de coral. Sin embargo, la riqueza específica de estos organismos sigue siendo poco conocida debido a las dificultades asociadas con su estudio, que incluyen la recolección, fijación, identificación taxonómica y la falta de interés entre los investigadores

de invertebrados marinos (Quiroga *et al.* 2004, Tosetto *et al.* 2023).

Nuestro protocolo proporciona un enfoque completo para abordar estas dificultades, desde la recolección directa de especímenes hasta la fijación y preparación de muestras para análisis histológicos. Hemos modificado y mejorado técnicas previas para adaptarlas a las necesidades específicas de los policládidos, lo que permite una visualización más precisa de las estructuras anatómicas internas y externas. Al ofrecer un método estandarizado y detallado, esperamos facilitar futuras investigaciones sobre la taxonomía, ecología y

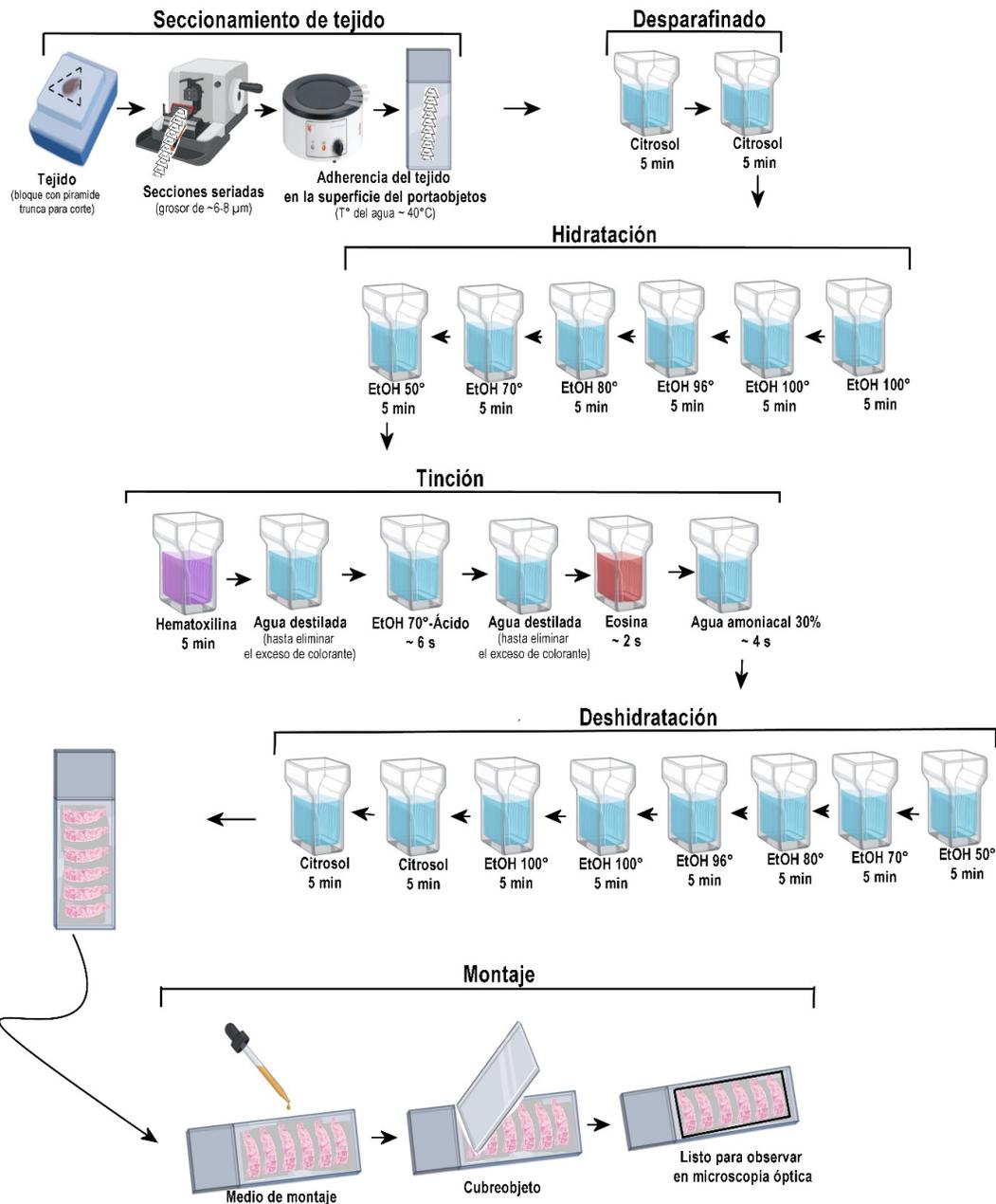


Figura 4. Diagrama del seccionamiento sagital seriado y tinción del tejido del sistema reproductor hermafrodita de un policládido. Una vez se ha retallado y desbastado el bloque se obtienen las secciones en tiras que serán colocadas sobre un portaobjetos, tratado previamente con soluciones adhesivas; una vez secas, se siguen con los pasos de tinción general de hematoxilina-eosina. Tras el montaje y secado, las secciones se pueden observar con el microscopio óptico (Diagrama modificado de Megías *et al.* 2024, los instrumentos de laboratorio fueron tomados de la versión gratuita de BioRender®).

diversidad de los policládidos marinos. Este protocolo tiene el potencial de convertirse en un recurso fundamental para los estudiosos de este grupo, contribuyendo al avance del conocimiento y la comprensión de la vida marina.

Agradecimientos

Agradezco a Rosario Cid Rodríguez (UMAR, Puerto Ángel) por proporcionar los reactivos para el procesamiento histológico de las muestras; a Rolando Bastida-Zavala, Ma. del Socorro García-Madrigal

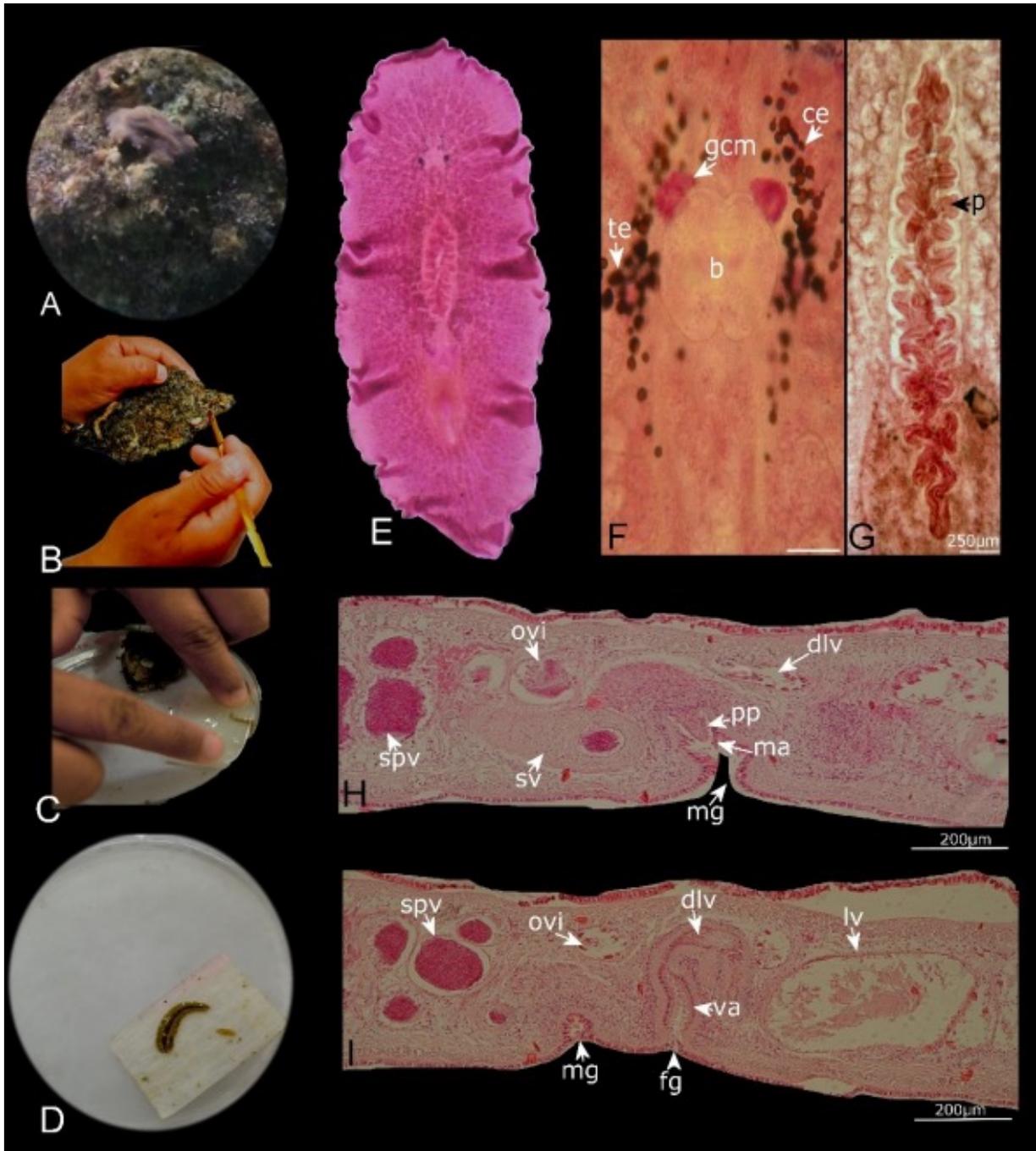


Figura 5. Ejemplos del protocolo para la recolecta y fijación, así como resultados obtenidos en los montajes completos y cortes histológicos a partir de la técnica propuesta. A. policládido sobre roca; B. recolecta de un policládido con el uso de pinceles suaves para evitar dañar al animal; C. policládido sobre papel filtro (en placa Petri); D. fijación en formalina congelada dónde se debe garantizar que el animal quede plano; E. Montaje completo de *Euplanoida* cf. *pacificola*, espécimen teñido en carmalum de Mayer y aclarado en salicilato de metilo; F. región anterior del cuerpo (distribución de ocelos); G. región faríngea; H-I. aparato reproductor masculino y femenino en vista sagital. Estructuras: b= ganglio cerebral, ce= ocelos cerebrales, dlv=ducto de la vesícula de Lang, fg= gonoporo femenino, gcm=masas del ganglio cerebral, lv= vesícula de Lang, ma= atrio masculino, mg=gonoporo masculino, ovi= oviductos, p= faringe, pp= papila peneal, sd= ductos espermiducales, sv=vesícula seminal, spv= vesícula espermiducal, te= ocelos tentaculares, va= vagina.

y Francisco Benítez-Villalobos (UMAR, Puerto Ángel) por facilitar el uso del espacio en los laboratorios; a Yessica Chávez-López (ECOSUR), Adriana Cortés Gómez y a Carlos Rodríguez por la revisión del manuscrito.

Referencias

- Aguado, M.T., C. Noreña, L. Alcaraz, D. Marquina, F. Brusa, C. Damborenea, B. Almon, C. Bleidorn & C. Grande. 2017. Phylogeny of Polycladida (Platyhelminthes) based on mtDNA data. *Organisms diversity & Evolution*: 1-13.
- Bahia, J., V. Padula & M. Schrödl. 2017. Polycladida phylogeny and evolution: integrating evidence from 28 s rDNA and morphology. *Organisms Diversity & Evolution* 1-26.
- Cuadrado, D., L. Moro & C. Noreña. 2017. The Polycladida (Platyhelminthes) of the Canary Islands. New genus, species and records 4312 (1):038-068.
- Dittmann, I.L., D. Cuadrado, M. T. Aguado, C. Noreña & B. Egger. 2019. Polyclad phylogeny persists to be problematic. *Organisms Diversity & Evolution*. 19:585-608.
- Faubel, A. 1983. The Polycladida, *Turbellaria* proposal and establishment of a new system part I. The Acotylea. *Mitteilungen aus dem Hamburgischen Zoologischen Museums und Instituts* 80: 17-121.
- Faubel, A. 1984a. On the geographical occurrence of pelagic polyclad turbellarians. *Cahiers de Biologie Marine* 25: 153-168.
- Faubel, A. 1984b. The Polycladida, *Turbellaria* proposal and establishment of a new system part. II. The Cotylea. *Mitteilungen aus dem Hamburgischen Zoologischen Museums und Instituts* 81: 189-259.
- Faubel, A., R. Sluys & D G. Reid. 2007. A new genus and species of polyclad flatworm found in the mantle cavities of gastropod mollusks in the high-intertidal zone of the Pacific coast of Central America. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 87: 429-434.
- Goodheart J.A., A.G. Collins, M.P. Cummings, B. Egger, & K.A. Rawlinson. 2023. A phylogenomic approach to resolving interrelationships of polyclad flatworms, with implications for life-history evolution. *Royal Society Open Science*. 10:1-15.
- Humason, G.L. 1962. *Animal tissue techniques*. W. H. Free Co. San Francisco, 661 pp.
- Hyman, L.H. 1951. *The Invertebrates: Platyhelminthes and Rhynchooela. The Acoelomate Bilateria*. Vol II. MCGraw-Hill, Book Company, Inc. New York U.S.A. 434 pp.
- Hyman, L.H. 1953. The polyclad flatworm of the Pacific coast of North America. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 100(2): 265-392.
- Knudsen, J.W. 1966. *Biological techniques*. Harper & Row, New York, 525 pp.
- Laidlaw, F.F. 1903. On a collection of *Turbellaria Polycladida* from the Straits of Malacca. (Skeat Expedition 1899-1900). *Proceedings of the Zoological Society of London* 1903: 301-318.
- Lang, A. 1884. *Die Polycladen (Seeplanarien) des Golfes von Neapel und der angrenzenden Meeresabschnitte. Eine Monographie. Fauna und Flora des Golfe von Neapel und der Angrenzenden Meeresabschnitte*, Verlag von Wilhelm Engelkmann, Leipzig, 688 pp.
- Lee, K.M., M. Beal & E.L. Johnston. 2006. A new predatory flatworm (Platyhelminthes, Polycladida) from Botany Bay, New South Wales, Australia. *Journal of Natural History* 39: 3987-3995.
- Lin, H.N., K.L. Wang, Z.H. Wu, R.M. Tian, G.Z. Liu & Y. Xu. 2017. Biological and chemical diversity of bacteria associated with a marine flatworm. *Marine Drugs* 15: 1-14.
- Marquina, D., F. A. Fernández-Álvarez, & C. Noreña. 2014. Five new records and one new species of Polycladida (Platyhelminthes) for the Cantabrian coast (North Atlantic) of the Iberian Peninsula. *Marine Biological Association of the United Kingdom*: 1-12.
- McNab, J.M., J. Rodríguez, P. Karuso & J.E. Williamson. 2021. Natural products in polyclad flatworms. *Marine Drugs* 19 (47): 1-15.
- Megías, M, P. Molist, M.A. Pombal. 2024. Atlas de histología vegetal y animal. Consultado: el 5 de abril de 2024: <http://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/1-introduccion.php>.
- Newman, L.J. & L.R.G. Cannon. 1995. The importance of the fixation of colour, pattern and form in tropical Pseudocerotidae (Platyhelminthes, Polycladida). *Hydrobiology* 305: 141-143.
- Newman, L.J. & L.R.G. Cannon. 1997. A new semi-terrestrial acotylean flatworm, *Myoramyxa pardalota* gen. et sp. nov. (Plehniiidae, Polycladida) from

- southeast Queensland and Australia. *Memoirs of the Queensland Museum* 42(1):311-314.
- Newman, L.J. & L.R.G. Cannon. 2003.** Marine flatworms, the world of Polyclads. Csiro Publishing, Australia 97 pp.
- Newman, L.J., L.R.G. Cannon & H. Govan. 1993.** *Stylochus (Imogene) matatasi* n. sp. (Platyhelminthes, Polycladida): pest of cultured giant clams and pearl oysters from Solomon Islands. *Hidrobiologia* 257: 185-189.
- Pérez-García P., C. Noreña & J. L. Cervera. 2018.** Two new acotylean flatworms (Polycladida) of two genera unrecorded in the Eastern Atlantic. *Marine Biodiversity*: 1-9.
- Pritchard, M.H. & G.O.W. Kruse. 1982.** The collection and preservation of animal parasites. University of Nebraska Press, Lincoln. 141 pp.
- Prudhoe, S. 1985.** A monograph on Polyclad Turbellaria. Oxford University Press, Oxford, 125 pp.
- Quiroga, Y.S., D.M. Bolaños & M.K. Litvaitis. 2004.** A checklist of polyclad flatworms (Platyhelminthes: Polycladida) from the Caribbean coast of Colombia, South America. *Zootaxa* 633: 1-12.
- Quiroga, Y.S., M. Bolaños & M.K. Litvaitis. 2006.** First description of deep-sea polyclad flatworms from the North Pacific: *Anocellidus* n. gen. *profundus* n. sp. (Anocellidae, n. fam.) and *Oligocladus voightae* n. sp. (Euryleptidae). *Zootaxa* 1317: 1-19.
- Quiroga, Y.S., E.C. Bonilla, D.M. Bolaños, F. Carbayo, M.K. Litvaitis & D. Brown. 2015.** Evolution of flatworm central nervous systems: Insights from polyclad. *Genetics and Molecular Biology* 38: 233-248.
- Ramos-Sánchez, M., J. Bahia & J.R. Bastida-Zavala. 2020.** Five new species of cotylean flatworms (Platyhelminthes: Polycladida: Cotylea) from Oaxaca, southern Mexican Pacific. *Zootaxa* 4819 (1):049-083.
- Rawlinson, K.A. 2008.** Biodiversity of coastal polyclad flatworm assemblages in the wider Caribbean. *Marine Biology* 153: 769-778.
- Tosetto, L., J.M. McNab, P.A. Hutchings, J. Rodríguez & J. E. Williamson. 2023.** Fantastic flatworms and where to find them: insights into intertidal polyclad flatworm distribution in southeastern Australian boulder beaches. *Diversity* 15 (393): 1-15.
- Tsuyuki, A., Y. Oya, N. Jimi & H. Kajihara. 2020.** Description of *Pericelis flavomarginata* sp. nov. (Polycladida: Cotylea) and its predatory behavior on a scaleworm. *Zootaxa* 4894 (3): 403-412.
- Tyler, S., T. Artois, S. Schilling, M. Hooge & L.F. Bush (eds) 2006-2024.** World List of turbellarian worms: Acoelomorpha, Catenulida, Rhabditophora. Polycladida. Accessed through: World Register of Marine Species at: <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=2853> on 2024-01-17.
- Westheide, W. 1991.** The Meiofauna of the Galapagos. Cap. 2, pp: 37-73, In: Matthew J. J. Galapagos Marine Invertebrates Taxonomy, Biogeography, and Evolution in Darwin's Islands. Topics in Geobiology.