

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES COSTERAS

TESIS

ESTUDIO CITOGÉNÉTICO DE LA
METACERCARIA

Clinostomum complanatum
(DIGENEA: CLINOSTOMIDAE)

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**LIC. EN BIOLOGÍA MARINA Y MANEJO
INTEGRAL DE CUENCAS.**

PRESENTA:

MARIA DEL PILAR PEREZ VAZQUEZ

Tonalá, Chiapas, Marzo del 2015.



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES COSTERAS

TESIS

ESTUDIO CITOGÉNÉTICO DE LA
METACERCARIA

Clinostomum complanatum
(DIGENEA: CLINOSTOMIDAE)

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
**LIC. EN BIOLOGÍA MARINA Y MANEJO
INTEGRAL DE CUENCAS**

PRESENTA:
MARIA DEL PILAR PEREZ VAZQUEZ

DIRECTOR:
MC. ARKADY USCANGA MARTÍNEZ

CO-DIRECTOR
DR. LENIN ARIAS ROGRIGUEZ

ASESORES:
MC. LETICIA GARCIA MAGAÑA
DR. ALEJENDRO NETTEL HERNANZ



ÍNDICE	Pag.
RESUMÉN-----	1
1.- INTRODUCCIÓN-----	2
2.- ANTECEDENTES-----	5
2.1 Importancia de la Clinostomiasis en la Acuicultura-----	5
2.2 Ciclo de vida del <i>C. complanatum</i> -----	7
2.3 Clasificación Taxonómica-----	8
2.4 Descripción del organismo -----	8
2.5 Importancia de la citogenética en parásitos-----	9
2.6 Estudio en el parásito <i>C. complanatum</i> -----	10
3.- JUSTIFICACIÓN-----	13
4.- OBJETIVO-----	14
3.1 Objetivo general -----	14
3.2 Objetivo particulares -----	14
5.- MATERIALES Y MÉTODOS-----	15
5.1 Obtención de muestras -----	15
5.2 Análisis de muestras -----	16
6.- RESULTADOS-----	18
7.- DISCUSIÓN-----	22
8.- CONCLUSIÓN -----	26
9.- GLOSARIO-----	27
10.- BIBLIOGRAFIA-----	29

RESUMÉN

La identificación de trematodos en estadios larvales es difícil de identificar, con la herramienta de la citogenética se obtiene información de las características de los cromosomas para estudios futuros de citotaxonomía. La técnica utilizada en la determinación del complemento cromosómico de la metacercaria *Clinostomum complanatum* fue a través del medio de cultivo, hidrólisis con buffer de lisis y proteinasa "K" y tinción con Orceína PFL (Ácido Propionico, Fórmico, Láctico). Como resultado se presenta que el número diploide de cromosomas de esta especie es $2n=20$. La estructura del cariotipo es de 20 cromosomas monorrámeos tipo telocéntrico. La longitud promedio total de complemento diploide ($2n$) fue de $38.73 \mu\text{m}$, los cromosomas mantuvieron una variación constante pero no significativa para clasificarlo por grupos, midiendo el primer par cromosómico $2.31 \pm 0.09 \mu\text{m}$ y los últimos dos pares $1.40 \pm 0.19 \mu\text{m}$, se tiene una diferencia de $0.91 \mu\text{m}$ del primer par al último par cromosómico. Descartándose la presencia de cromosomas sexuales debido a que la metacercaria es hermafrodita. Esta información podrá ser usada en el área de citotaxonomía, para realizar la clasificación correcta de este parásito y así dentro de acuicultura tener un eficaz control.

1. – INTRODUCCIÓN

Actualmente la acuicultura ha tenido un aumento considerable debido a la producción de alimentos ricos en proteína, en los que se incluyen peces, crustáceos y moluscos entre otros organismos acuáticos destinados al consumo. En este sentido, la acuicultura alcanzó los 60 millones de toneladas en el 2010 (FAO, 2012) y en el año 2012 ha incrementado a 90.4 millones de toneladas, sin duda seguirá siendo uno de los sectores de producción de alimento de origen animal de más rápido crecimiento (FAO, 2014). Sin embargo, la presencia de agentes patógenos reduce el crecimiento de la piscicultura y el aprovechamiento industrial de las especies que tienen importancia económica, debido al efecto desmedido de agentes patógenos como son los virus, bacterias, hongos, parásitos, etc., que afectan a los peces de interés comercial y los peces de acuario u ornamentales (FAO, 2005).

Los parásitos, entre los cuales podemos encontrar a los helmintos (monogéneos, trematodos digenéticos, cestodos, nematodos, acantocéfalos) o crustáceos (Espinosa, 1988); que pueden parasitar distintas especies piscícolas debido a malas prácticas de sanidad en el cultivo, lo que favorece la aparición e incremento de la parasitosis, por lo que la importancia de muchos parásitos patógenos en la acuicultura es indiscutible (Sitjà-Bobadilla y Álvarez-Pellitero, 1993).

Los parásitos como agente patógenos de peces constituyen una de las principales fuentes de bioagresión y por ello las condiciones de explotación intensiva favorecen la aparición de enfermedades (Kinkelin *et al.*, 1985) que son una limitante porque frenan el crecimiento de los peces y reducen la tasa de fertilidad (Cable *et al.*, 2002). Los parásitos han tenido gran importancia en aspectos médicos, biológicos y económicos; mientras que en poblaciones de peces causan afectaciones leves, aunque existe evidencia de parásitos que han provocado la muerte en sus hospederos (García-Magaña y López-Jiménez, 2008; Pérez-Ponce de León *et al.*, 1996).

Los grupos de parásitos que han ocasionado enfermedades de mucha relevancia en los centros de producción acuícolas, sobresalen los botriocefalosis, diplostomiasis, centrocestiasis, postodiplostomiasis, ligulosis, clinostomiasis, contraeaciiasis y dactilogirosis (Pérez-Ponce de León *et al.*, 1996). Las infecciones por trematodos en peces tiene importancia médica, los agentes etiológicos más importante son los trematodos digeneos, que causa alto nivel de infección en la mayoría de los peces la transmisión viene a través de la ingestión de metacercarias (Santo, 1995; Ferre, 2001).

La presencia de tales parásitos en el medio acuático es muy común debido a las altas posibilidades de encontrar hospederos del mismo medio acuático, lo que facilita la transmisión de un organismo a otro, de hecho es común también la interacción con organismos del resto del ecosistema como son las aves, anfibios reptiles y hasta plantas. En el sureste de México, la presencia de cuerpos de agua como los ríos, lagunas, arroyos, entre otros es frecuente sobre todo durante la temporada de lluvias, por ello hay reportada gran diversidad de especies animales y vegetales asociadas al medio acuático; y con alta relación con el medio terrestre.

En tales organismos, los estudios biológicos y de carácter ecológico son prácticamente inexistentes sobre todo en el caso de organismos microscópicos como algunas especies de parásitos. El desconocimiento biológico imposibilita el aprovechamiento/control de algunas especies animales y vegetales, lo que hace recomendable se realicen estudios en primera instancia en especies de importancia económica. La alta diversidad de organismos acuáticos, como los peces que han sido reportados para la región sureste de México, también ha permitido el hallazgo de una amplia diversidad de organismos parásitos en los cuales también el desconocimiento de su biología es prácticamente una incógnita sobre todo por tratarse de organismos microscópicos que son difíciles de observar y por ello de estudiar.

Bajo dicho contexto la presente tesis tiene como objetivo principal, contribuir con la biología básica de la metacercaria *Clinostomum complanatum* (Digenea: Clinostomidae) mediante el establecimiento del número de cromosomas y la descripción de la estructura cromosómica en estadio mitótico a partir de especímenes recolectados de organismos infectados del cíclido nativo *Petenia splendida*.

2. - ANTECEDENTES

2.1. Importancia de la Clinostomiasis en la Acuicultura

La Clinostomiasis es causada por las metacercarias del género *Clinostomum* (Digenea: Clinostomidae), misma que propicia la enfermedad de la mancha amarilla (Thatcher, 1991; Szalai y Dick, 1988), dichos organismos son parásitos frecuentes de peces, que son los segundos huéspedes intermediarios que albergan las metacercarias enquistadas en varios órganos (Lo *et al.*, 1980, 1981, 1982).

La metacercaria del *C. complanatum*, en peces se localiza principalmente en piel, músculos, aletas, cabeza y viseras (Kagei *et al.*, 1984; Eiras, 1994; Mitchell, 1995), en los sistemas de cultivos afectan al crecimiento, supervivencia, cambio de comportamiento en su hospedero, aspecto desagradable, dar entrada a otras patologías y causar la muerte (Paperna, 1991; Vianna, 2001). Sin embargo, esto genera pérdidas económicas en los sistemas de cultivos y se hace inadecuado para el consumo humano (Chung *et al.*, 1995; Deardoff y Overstre *et al.*, 1991; Isobe *et al.*, 1994; Kifune *et al.*, 2000). Cabe destacar que también este grupo de parásitos genera afectaciones en humanos infectando la cavidad oral (Kitagawa *et al.*, 2003), causa laringofaringitis (Erias, 1994), inflamación en ocular (Tiewchaloern *et al.*, 1999) e incluso la muerte por asfixia (Kamo *et al.*, 1962).

Los primeros huéspedes intermediarios para el *C. complanatum* son los moluscos pertenecientes a varias especies: *Radix auricularia Coreana* (Chung *et al.*, 1998), *R. auricularia* y *R. swinhoei* (Lo *et al.*, 1981), *Helisoma antrosum* y *H. campanulatum* (Hunter y Hunter, 1935), *Lymnaea stagnalis* y *R. ovata* (Grabdakazubska, 1974), *L. japonica* y *L. ollula* reportados como huésped experimentales (Aohagi *et al.*, 1993). Se han registrado gran diversidad de peces como segundos hospederos intermediarios los cuales se presentan en la (Tabla 1), y en la que se

puede apreciar que el parasito también tiene la capacidad de infectar cíclidos como del que trata este estudio, *P. splendida*.

Tabla 1. Listado de varias especies de Peces como segundos hospederos de metacercarias.

Hospederos	Sitio de infección	Referencia
<i>Rustilus rutilus</i> <i>Aphanius dispar</i>	Musculo, opérculo Base de aletas	Grabda–kazubaska, 1974 Kalantan <i>et al.</i> , 1978 Gholami <i>et al.</i> , 2011
<i>Trichogaster fasciatus</i> <i>Plecoglossus altivelis</i>	Opérculo y musculo Bases de aletas, cavidad visceral.	Siddiqui y Nizami, 1982. Lo <i>et al.</i> , 1987.
<i>Rhamdia guatemalensis</i>	Opérculo y musculo	Pérez-Ponce de León <i>et al.</i> , 1992.
<i>Carassius spp</i> <i>Lateolabrax japonicus</i> , <i>Leuciscus hakonensis</i> <i>Carassius auratus</i> <i>Alophorus robustus</i>	Base de aletas Cabeza, piel, opérculo Base de aletas Musculo, cavidad oral	Aohagi y Shibahara, 1994. Aohagi <i>et al.</i> , 1995. Chung <i>et al.</i> , 1995 Guzmán-Cornejo y García-Pietro, 1999.
<i>Capoeta capoeta gracilis</i>	Opérculo, musculatura, aletas.	Malek y Mobedi, 2001.
<i>Hoplias malabaricus</i> , <i>Loricaria sp.</i> , <i>Hoplosternum littorale</i> , <i>Loricariichthys platymetopon</i> , <i>Parauchenipterus galeatus</i> .	Base del opérculo, base de aletas, musculo, cavidad visceral, cavidad oral.	Días <i>et al.</i> , 2003.
<i>Centropomus paralelus</i> , <i>Cichlasoma urophthalmus</i> , <i>Herichthys pearsei</i> , <i>Petenia splendida</i> , <i>Theraps symspilum</i> , <i>T. fenestratum</i> , <i>T. synspilum</i> , <i>T. helleri</i> , <i>Thorichthys pasionis</i> , <i>Parachromis managuensis</i> , <i>Atractosteus tropicus</i> , <i>Dormitor maculatus</i> , <i>Gobiomorus dormitor</i> , <i>C. friedrichsthalii</i> , <i>C. sp.</i> <i>Cichlasoma paranaense</i> , <i>Gymnotus carapo</i>	Cavidad craneana, piel, musculatura, aletas, vísceras y cabeza.	Salgado-Maldonado <i>et al.</i> , 2005.
	Rayos de aletas, cabeza, parte ventral, base del opérculo.	Silva-Souza y Ludwig, 2005.

Los hospederos definitivos del *C. complanatum* son las aves piscívoras que pertenecen a la familia Ardeidae: *Ardea purpurea*, *A. cinerea*, *Nycticorax nycticorax*, *Egretta alba*, *E. garzetta*, *E. intermedia*, *N. caledonicus*, causándoles inflamación aguda en la submucosa de la cavidad oral, en el esófago puede conducir a un deterioro de la deglución y la mal alimentación puede debilitar el sistema inmunológico (Lo *et al.*, 1982; Shamsia *et al.*, 2013).

En México, no se ha registrado el primer hospedero intermediario de esta especie. Sin embargo, en los estados de Chiapas, Michoacán y Oaxaca se han reportado en estadio adulto en el esófago de las garzas (*Butorides virescens*, *Casmerodius albus*, *E. thula*) (Ramos, 1995; Lamothe-Argumedo *et al.*, 1997).

2. 2. Ciclo de vida del *C. complanatum*

Los huevos se dispersan en las heces de aves ictiófagas que son su hospedero definitivo. El huevo da origen a un miracidio cubierto de cilios que nada libremente e infecta aun caracol, dando lugar a un esporocisto que migra al intestino o el hígado del caracol. Una vez que el esporocisto madura da lugar a cercarías que salen del caracol, para penetrar y enquistarse en un pez transformándose a metacercaria. El ciclo se completa cuando el pez es ingerido por algún ave ictiófaga, en donde la metacercaria se desenquista y migra al esófago y se aloja en la cavidad bucal para completar su maduración en aproximadamente tres días (Olsen, 1986).

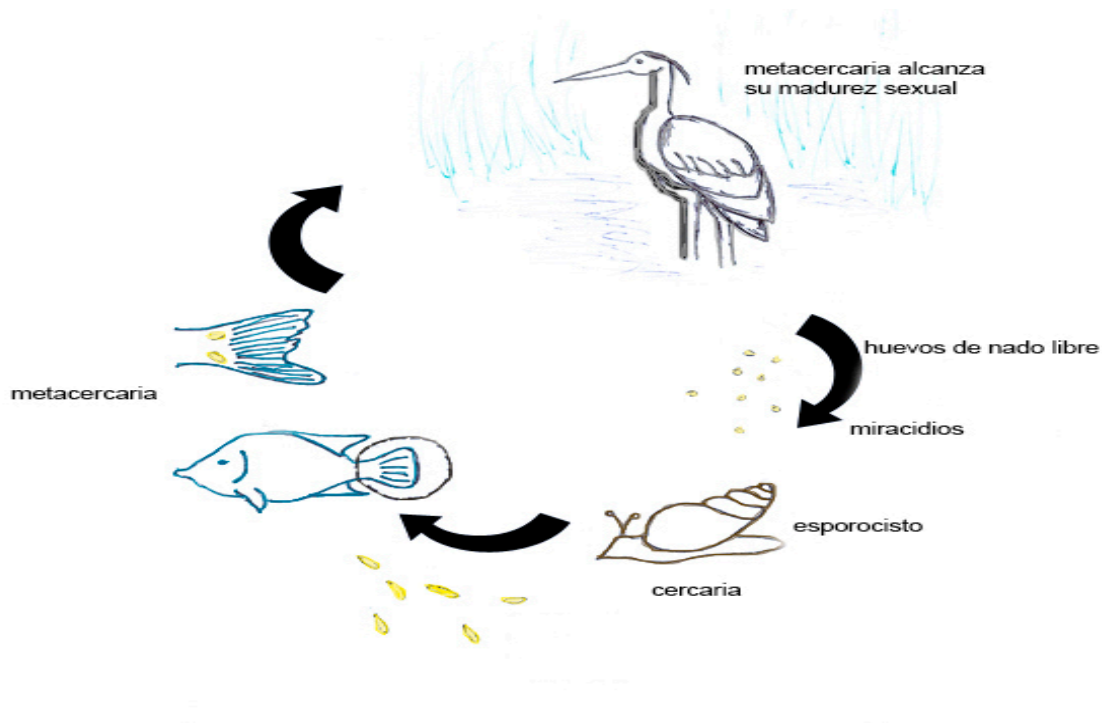


Figura 1. Ciclo de vida del parásito *C. complanatum* según Olsen, 1986

2.3. Clasificación Taxonómica

Reino: Animalia

Phylum: Platyhelminthes

Clase: Trematoda

Subclase: Digenea

Orden: Strigotida Parker, 1982

Familia: Clinostomatidae Lühe, 1901

Género: *Clinostomum* Leidy, 1856

Epíteto específico: *Complanatum*

Nombre científico: *C. complanatum*

2.4. Descripción del Organismo

Quiste esférico, grande y amarillento. Cuerpo aplanado dorsoventralmente, alargado, dividido en dos porciones por una constricción a nivel del acetábulo. Extremo anterior truncado y posterior redondeado. Ventosa oral pequeña, subterminal, situada en medio del anillo tegumental. Acetábulo conspicuo, preecuatorial y más grande que la ventosa oral. Ciegos intestinales largos y anchos, sinuosos en la parte postacetabular. Testículos irregulares en su forma, uno abajo del otro y no en contacto. Ovario intertesticular e intracecal. Útero formando rizos entre los testículos. Vesícula excretora en forma de Y. Poro excretor terminal (Figura 2) (Vidal-Martínez et al., 2002).

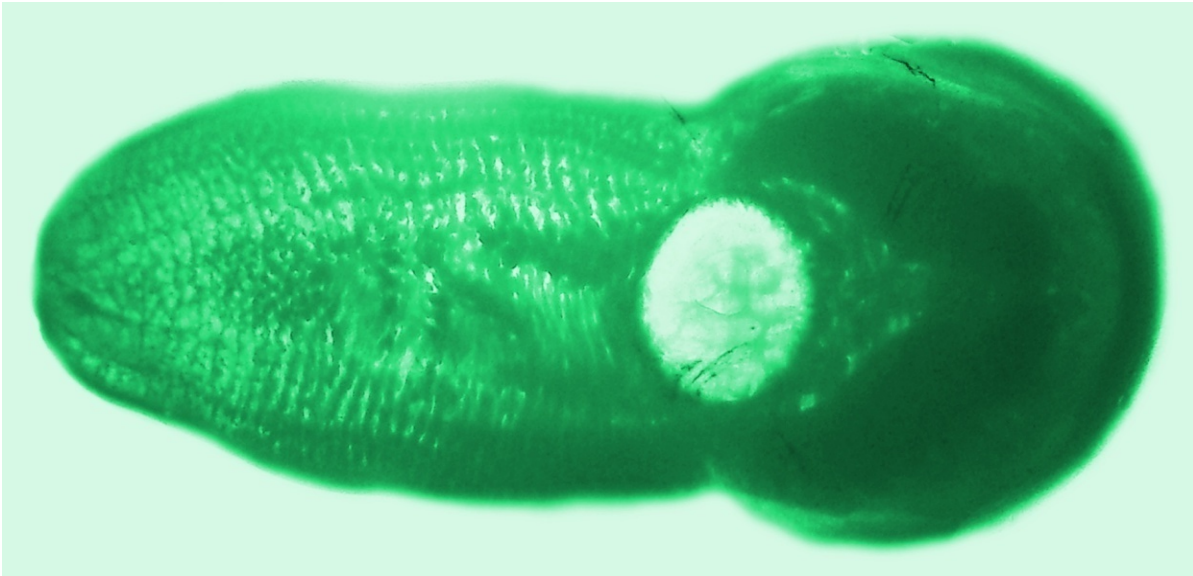


Figura 2. Espécimen en estadio de metacercaria de *C. complanatum* obtenido de la mojarra *P. splendida*.

2. 5. Importancia de la Citogenética en los Parásitos

La citogenética estudia los cromosomas y sus variaciones en número/ forma (el material hereditario organizado) bajo cualquier nivel o dimensión (Lacadena, 1996). Los cromosomas se organizan esquemáticamente en un cariotipo que contiene la suma de todos los rasgos estructurales de los cromosomas, incluyendo el número, tamaño y forma, que al ser constante proporciona una característica más del material biológico de una especie.

Los estudios citogenéticos, también son importantes porque aportan información para la diferenciación citotaxonomica de las especies, tiene aplicación en la filogenia y en análisis de la estructura poblacional (Córdova y Lamas, 1997). Además los rasgos citológicos puede ser usados como un complemento que ayuda en la caracterización e identificación de algunas especies (Eisenback, 1981).

Con los estudios cariológicos, se han desarrollado información básica sobre el número, tamaño y morfología de los cromosomas (Khanet *et al.*, 2000; Tan *et al.*, 2004) y ha contribuido en la comprensión de los mecanismos evolutivos (Fredga, 1977; Tripathy y Das, 1988), que pueden detectar cambios que se han modificado en un cariotipo ancestral, ya que han evolucionado a nuevas líneas (Winkler *et al.*, 2004). El análisis de cromosomas es de interés para el control genético, taxonomía, y los estudios evolutivos (Macgregor y Varly, 1993; Fister *et al.*, 1999; Suleyman *et al.*, 2004).

Los estudios de citogenética en los parásitos han revelado importantes aspectos de su biología tales como reproducción, procesos de maduración de los oocitos y número de cromosomas, así mismo esta información puede ser usada como un complemento o ayuda en la caracterización e identificación de las especies (Eisenback *et al.*, 1981).

2. 6. Estudios en el parásito *C. complanatum*

Los estudios que se han realizado en referencia al *C. complanatum* han sido muy pocos y algunos se han orientado en conocer su biología y ecología. Bajo dicho contexto, cabe mencionar que Segovia-Salinas *et al.*, (1993) describen la morfología de la especie, donde determinaron la estructura de la superficie tegumentaria de la metacercaria, juvenil y adulto de 8 días post-infección. Por otro lado, Malek y Mobedi (2001) investigaron la incidencia de *C. complanatum* en *C. capoeta gracilis* en el río Shiroud Iran, los datos demostraron que este parásito se encuentra mayormente en la zona de la boca y detrás de los opérculos, no se encuentra susceptibilidad en machos y hembras, en cuanto a la talla muestra que los de talla grande fue más baja la prevalencia, además que el estudio hispatológico reveló que la metacercaria causa miositis en los peces. De igual forma, Kaur *et al.*, (2012) analizaron las alteraciones histopatológicas y hematológicas que causa la metacercaria de *C. clinostomum* en *Nandus nandúes*,

las principales alteraciones hepatológicas se observaron en el hígado y las alteraciones hematológica demostraron disminución en el contenido de hemoglobina y de eritrocitos, el aumento de linfocitos y granulocitos.

En lo que respecta a los trabajos realizados desde el punto de vista citogenético en los miembros de la familia Clinostomidae, se han logrado observar a partir de una extensa revisión bibliográfica que hay extenso desconocimiento en la temática; y solo se han realizado estudios en algunos miembros de la familia Diplostomidae. (Barsiene *et al.*, 1990; Barsiene, 1991; Barsiene; 1992; Barsiene, 1993; Barsiene y Staneviciute, 1991; Kaewkong *et al.*, 2012; Petkevičiute y Staneviciute, 1999; Mutafova y Niewiadomska, 1988; Staneviciute y Barsiene, 1989; Staneviciute, 1991; Romanenko y Shigin, 1977).

Staneviciute *et al.*, (1998) realizó el análisis comparativo de los cromosomas de dos especies del genero *Posthodiplostomum*, utilizando la técnica de secado al aire y la tinción con giemsa. El número de cromosomas para las dos especies fue de $2n=20$ cromosomas, con fórmula cromosómica para *P. cuticola* de $1-5a+6-8st-sm+9sm+10sm-m$, con longitud promedio total de complemento diploide ($2n$) de $42.98\mu m$, *P. brevicaudatum* con formula cariotípica de $1,4,8st+2,3,5,6a+7,10sm+9st-sm$ con longitud promedio total de complemento diploide($2n$) de $39.46\mu m$, mostrando cariotipo con menor grado de evolución.

En otros trematodos se han realizado diversos estudios de citogenética como la comparación de cariotipos, análisis de cariotipo y estudios citogenéticos. Petkevičiute y Staneviciute (1999). Realizó la caracterización del cariotipo de *Apatemon gracilis*, usando la técnica secado al aire y detectó que esta especie el número de cromosomas es $2n=20$, que fueron clasificados en dos grupos: cinco pares relativamente grandes y cinco pares pequeños, $1sm-m$ (submetacéntico-metacéntrico), $2st$ (subtelocéntrico), $3,5a$ (acrocéntrico), $4, 9,10m, 6sm, 7,8sm-st$. Mencionan también la aparición de un cromosoma "B". Sin embargo estos estudios se han utilizado como comparación de cariotipo entre especies como lo

realizado por Kira *et al.*, (2012), quienes realizaron la comparación de los cariotipos de especies de la familia Opisthorchiidae, usando la técnica de FISH con bandeo "C". Los cariotipos de *Opisthorchis felineus*, *O. viverrini*, *Metorchis xanthosomus*, *M. bilis* y *Clonorchis sinensis* consisten de $2n=14$, con dos pares grandes de cromosomas msm y cinco pares msm pequeños de cromosomas, solo *O. viverrini* mostró $2n=12$, lo que indica la fusión de dos cromosomas del cariotipo ancestral de los opisthorchiidae. Así mismo Kaewkong *et al.*, (2012) realizaron el análisis del cariotipo *O. viverrini*, con la técnica FISH. El número cromosómico haploide fue de $1n=6$ cromosomas y el diploide de $2n=12$. Compuesto por 1-3m, 4sm-st, 5st-a, 6a. Con esta investigación dieron a conocer el primer análisis del cariotipo completo de *O. viverrini* por microscopía electrónica de barrido.

3. – JUSTIFICACIÓN

En la acuicultura, un tema de importancia es el control de la afectación del parasitismo. Debido a que es una limitante en el crecimiento y reproducción de los peces, generando pérdidas económicas; además de causar enfermedades en los humanos a consecuencia de los parásitos presentes en los peces. Los trematodos han causado daños importantes dentro del sector acuícola, como es el caso del *C. complanatum*, en su estadio de metacercaria puede ser observada a simple vista sobre la piel, musculo, viseras y branquias de los peces. Las afectaciones de este parasito en gran cantidad, genera condiciones de estrés en los peces y pueden llegar a provocar mortalidad en los sistemas de cultivos. Mientras que en el hombre puede ser utilizado como hospedero definitivo causándole afectaciones a su calidad de vida.

Es bien conocido el amplio desconocimiento biológico que existe en muchas especies de parásitos, esta problemática incluye también a las metacercarias de *C. complanatum*. En este caso se hace uso de la citogenética para agregar caracteres que permitan realizar la descripción y caracterización de los cromosomas para la determinación del cariotipo del *C. complanatum*. Esta información podrá ser aplicada en las áreas de taxonomía y citotaxonomía, ya que se ha observado que algunas especies de parásitos han sido clasificadas erróneamente, cabe destacar que la correcta identificación y clasificación de parásitos que afectan a los organismos cultivados nos permitirá mejorar el control en los sistemas de producción acuícola.

4. – OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Describir el cariotipo del parasito *C. complanatum* en la etapa de metacercaria.

4.2 Objetivos particulares

- a) Determinar el número cromosómico modal diploide *C. complanatum*.
- b) Determinar la posición del centrómero en cada uno de los cromosomas del *C. complanatum*.
- c) Determinar el número fundamental o número total de brazos de los cromosomas de la *C. complanatum*.

5. - MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Obtención de muestras

Los adultos de *Petenia splendida* (Günther, 1862) (Cichlidae), conocida comúnmente como Tenguayaca, con peso promedio 230 ± 20 g, se obtuvieron del Laboratorio de Genética de la División Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Los peces fueron mantenidos en tanques de 3000 l dentro de un sistema de recirculación que dispuso de agua libre de cloro a una temperatura entre 28-29 °C y aireación continua que permitió que el oxígeno se mantuviera en 6.40 ± 0.28 mg/l. También, el 10 % del volumen total de agua, fue reemplazado diariamente, todo ello dentro de las instalaciones del Instituto de Ciencias Biológicas, en el Centro de Investigaciones Costeras (CEICO).

Se sacrificaron cinco peces con una sobredosis del anestésico MS-222 (metanosulfonato tricaina, Argent, Laboratories, Inc., Redmond, WA, USA), con la concentración de 1 g/L de agua y fueron mantenidos a temperatura ambiente durante la extracción de los parásitos (Arias-Rodriguez, 2014 comunicación personal). Por otro lado, los procedimientos de manipulación de los peces cumplieron con los términos del Comité para el Uso Ético de los Animales Experimentales.

Todos los ejemplares fueron revisados externamente (aletas dorsal, pélvica, pectoral, caudal, anal) e internamente (branquias, musculo, cavidad cefálica y órganos), para la colecta de las muestras se utilizó una aguja de disección, los quistes fueron colocados en cajas de petri con agua destilada durante 5 minutos con el fin eliminar restos de sangre y tejido muscular del pez. Posteriormente, se adoptó el procedimiento recomendado por (Arias-Rodriguez *et al.* 2008), para ello las metacercarias fueron colocadas en microtubos de 1.5 ml y allí se les agrego 500 µl de medio de cultivo para leucocitos (Kreatech, Diagnostics®) y 100 µl de

colchicina al 0.005%. Posteriormente, los tubos fueron colocados durante seis horas en una incubadora que se mantuvo a $38.0\pm 1.0^{\circ}\text{C}$, dicho medio permitió que las metacercarias se mantuvieran vivas y que llevaran a cabo sus actividades metabólicas normales, debido a que este medio de cultivo posee nutrientes similares a los que provee el plasma sanguíneo del hospedero (Arias-Rodriguez, 2014 comunicación personal).

Se retiraron las metacercarias de los microtubos en incubación y se colocaron en nuevos microtubos limpios para hidratar con agua destilada durante 2 horas a $38.0\pm 1.0^{\circ}\text{C}$, la hidratación es importante porque les da un mayor volumen a las células, así poderse romper con facilidad con el choque mecánico (Arias-Rodriguez, 2014 comunicación personal).

Se realizó el ablandamiento de las metacercarias colocándolas en microtubos de 1.5 ml, se les agrego 50 μl de buffer de lisis (2 ml de Tris-Cl 1mM con pH 7.5 + 4 ml de EDTA 0.5 M+ 10 ml SDS al 10%+48 gr de urea 4 M) y 50 μl de proteínasa K durante 30 minutos, luego se extrajeron las metacercarias y se lavaron con agua destilada para quitar el excedente de sales (Arias-Rodriguez, 2007).

Posteriormente, se colocó una metacercaria por portaobjeto, agregando luego 3 gotas de ácido acético al 50 % y 2 gotas de Orceína FLP al 20% (33.33 ml ácido fórmico + 33.33 ml ácido láctico + 33.33 ml ácido propionico + 1gr de Orceína) por último, se colocó un cubreobjetos realizando un ligero aplastado (Squash) y sellándolas con esmalte de acrílico transparente (Arias-Rodriguez, 2014 comunicación personal).

5.2 Análisis de muestras

Los análisis de microscopia se realizaron en el Laboratorio de Acuicultura Tropical en la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, mediante un microscopio Axio Scope.A1 (Carl Zeiss®)

adaptado con una cámara AxioCam ERc5s (Carl Zeiss®) y con el empleo del programa SEN/2011 (Carl Zeiss® Microscopy GmbH, 2011).

Las mejores fotos de las dispersiones cromosómicas fueron digitalizadas con el objetivo 100X+1.25X del optovar (Arias-Rodriguez *et al.* 2008). La frecuencia del número de cromosomas o número modal diploide, se determinó por conteo directo sobre las imágenes empleando los programas SEN/2011 (Carl Zeiss® Microscopy GmbH, 2011) y Photoshop® cs 8.0 (Adobe®).

De las mejores dispersiones cromosómicas los brazos de los cromosomas individuales fueron medidos en micrómetros con las herramientas del programa SEN/2011 (Carl Zeiss® Microscopy GmbH, 2011) y manualmente en foto impresos de alta resolución (Arias-Rodriguez *et al.* 2008). Dichos valores fueron empleados para calcular el promedio y desviación estándar a cada brazo cromosómico largo (q) y por par homólogo.

También se calcularon los parámetros citogenéticos propuestos por Levan *et al.* (1964), siendo ellos, la longitud relativa [longitud en micrómetros de cada cromosoma/Longitud en micrómetros del complemento cromosómico diploide en micrómetros (100)] y la clasificación cromosómica se basó en el criterio de Levan *et al.* (1964) y para armar el cariotipo los cromosomas individuales, fueron recortados con el programa Photoshop CS 8.0.1 (Adobe®) y estos fueron insertados en base en su longitud para ensamblar el cariotipo con las herramientas de dibujo del programa Microsoft Word 2011® (Arias-Rodriguez *et al.* 2008).

Se estableció el número fundamental (NF), conforme al total de brazos cromosómicos del complemento cromosómico diploide. Se generó el histograma fundamentado en la longitud de brazos q en μm .

6. - RESULTADOS

Se obtuvieron 50 preparaciones cromosómicas, las cuales se revisaron exhaustivamente bajo el microscopio óptico, encontrándose 150 metafases cromosómicas de alta resolución en mitosis, de ellas fueron seleccionadas 67 dispersiones metafásicas bien dispersas y sin cromosomas traslapados.

El conteo correspondiente de las 67 campos mitóticos en metafases se encontró variación en el número cromosómico que fue de 10 (1.4%) y hasta 26 elementos cromosómicos (10.45%). El análisis de frecuencias indicó que el número cromosómico modal diploide corresponde a $2n=20$ cromosomas, con el 59.70% del total de células analizadas (Figura.3).

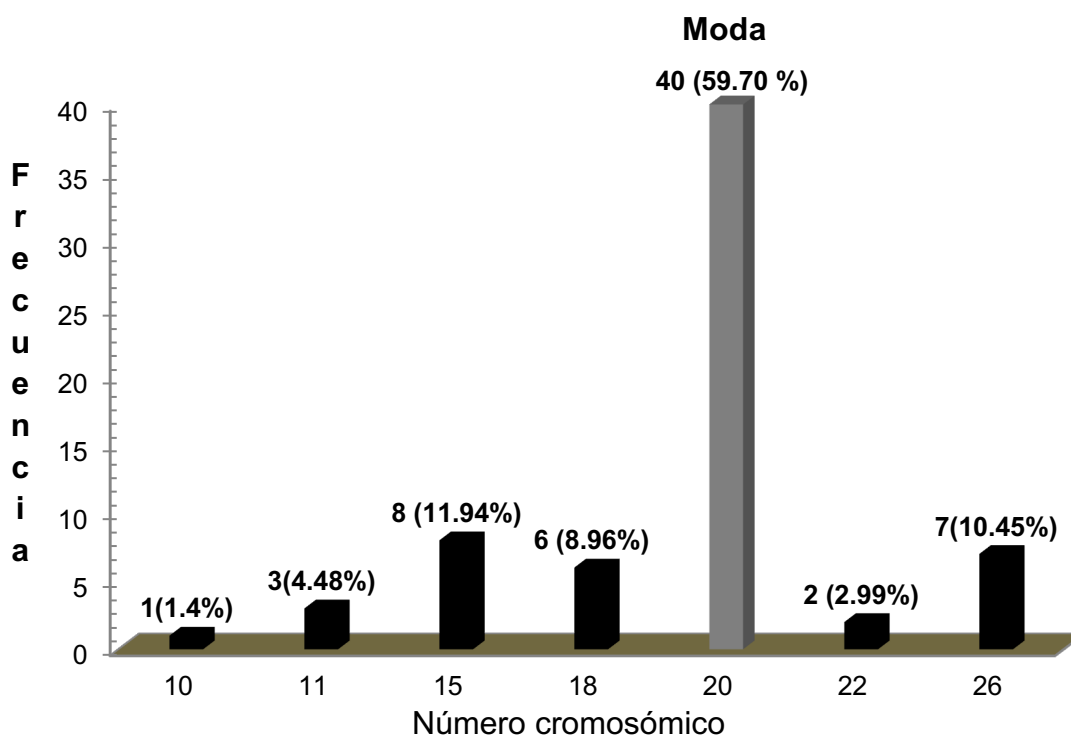


Figura 3. Frecuencia del número de cromosomas, porcentajes que representan y la moda en mitosis de la metacercaria *C. complanatum*

Se seleccionaron siete de las mejores metafases (Fig. 4 B, C y D), de las cuales se observó claramente la morfología cromosómica y de ellas se ensambló el cariotipo promedio de la especie. Las células en mitosis del parásito *C. complanatum*, está conformado por un cariotipo que se compone de 20 cromosomas monorráneos de tipo telocéntrico "T" (Figura 4). El centrómero de cada cromosoma se ubicaba en la región telocéntrica en acuerdo con Levan *et al.* (1964).

En la longitud promedio por par cromosómico del cariotipo *C. complanatum*, se encontró variación constante de un par cromosómico a otro, midiendo el primer par cromosómico $2.31 \pm 0.09 \mu\text{m}$ y el último par $1.40 \pm 0.19 \mu\text{m}$ (Tabla 2). La longitud promedio total del complemento diploide ($2n$) de *C. complanatum* es de $38.73 \pm 1.89 \mu\text{m}$.

Con la clasificación realizada según Levan *et al.*, (1964), se elaboró el ideograma (Figura 5), en el cual muestra el acomodo de los cromosomas que van de mayor a menor en función del índice centromérico. El número total de brazos cromosómicos o número fundamental (NF), fue de 20 brazos cromosómicos.

Por otro lado, no fue posible identificar diferencias heteromórficas que correspondan a cromosomas sexuales entre las metafases del parásito que fueron analizados.

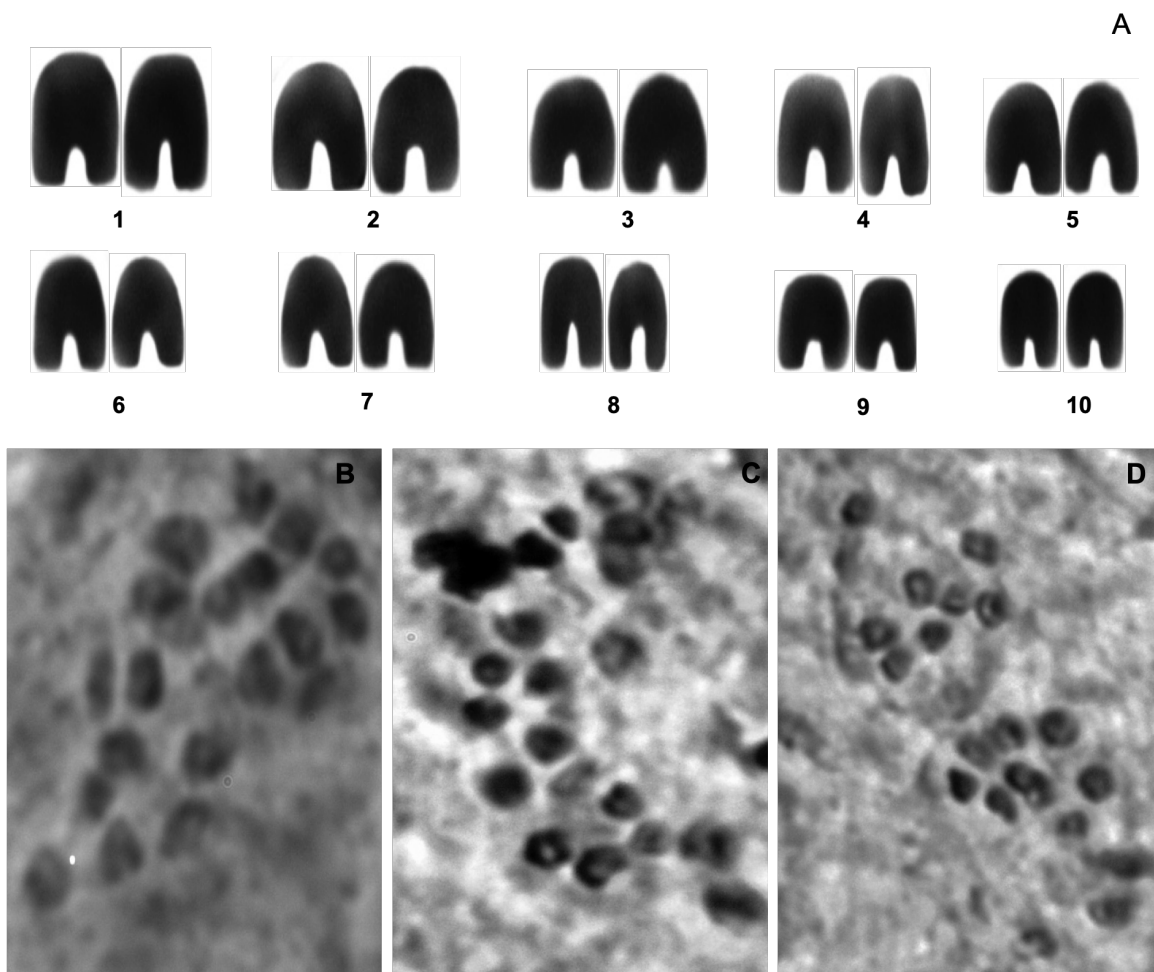


Figura 4. Cariotipo de la metacercaria *C. complanatum*, se caracteriza por mostrar $2n=20$ cromosomas (A), siendo todos de tipo telocéntrico. Las fotografías B, C y D muestran los cromosomas mitóticos en metafase de células somáticas.

Tabla 2. Parámetros citogenéticos del cariotipo en mitosis de la metacercaria tropical *C. complanatum* (Digenea: Clinostomidae).

Par cromosómico	Longitud promedio en μm de q \pm D.E.	Longitud promedio relativa de q \pm D.E.	Clasificación
1	2.31 \pm 0.09	5.97 \pm 0.31	T
2	2.20 \pm 0.12	5.68 \pm 0.22	T
3	2.16 \pm 0.15	5.57 \pm 0.22	T
4	2.08 \pm 0.14	5.36 \pm 0.24	T
5	1.98 \pm 0.12	5.12 \pm 0.25	T
6	1.95 \pm 0.09	5.05 \pm 0.19	T
7	1.86 \pm 0.15	4.80 \pm 0.23	T
8	1.79 \pm 0.15	4.62 \pm 0.21	T
9	1.64 \pm 0.20	4.23 \pm 0.34	T
10	1.40 \pm 0.19	3.60 \pm 0.38	T

q=brazo largo, μm = micrómetros, D.E.=desviación estándar, T = cromosoma telocéntrico.

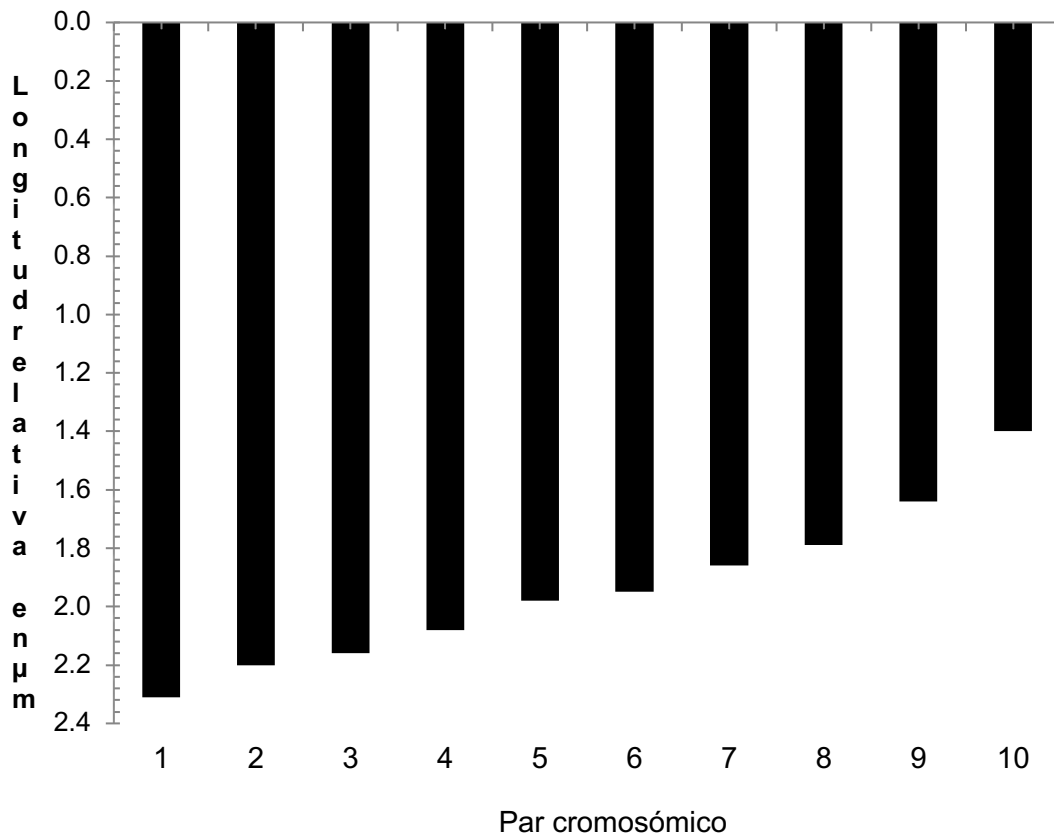


Figura 5. Ideograma representativo del cariotipo en mitosis por par cromosómico de metacercaria *C. complanatum*.

7. - DISCUSIÓN

El estudio citogenético de una especie permite conocer las relaciones evolutivas, determinar el origen de una especie o género y los eventos que se han dado en el camino de la especiación, por lo que se le considera una herramienta importante en las investigaciones sistemáticas (White, 1957).

Así mismo permite a futuro sentar las bases para identificar en algún gen de la especie para luego ubicarlos en el mapa cromosómico. Las características cariológicas son generalmente específicos de las especies y en consecuencia podría estar relacionado con la distancia evolutiva entre categorías taxonómicas (Dudin, 1976).

Por lo anterior, en el presente trabajo se determinó el cariotipo de *C. complanatum*, encontrándose que el número de cromosomas es de $2n=20$ cromosomas todos monorrámeos. Dichos resultados son congruentes con la literatura actual, que señala que los trematodos digeneos se caracterizan por poseer un número de cromosomas de $2n=20-22$ (Brooks *et al.* 1985) (Tabla 3). Aunque con variaciones en su morfología y probablemente tamaño, ello atiende a diferencias en su calificación.

Ello es congruente con el hecho de que en algunas especies de trematodos, existe la tendencia evolutiva desde el punto de vista citológico en disminuir el número cromosómico debido a fusiones y translocaciones (Puente y Short, 1985). Mientras que en otras, el fenómeno es contrario al aumentar el número cromosómico diploide mediante la fisión centromérica (Birstein y Mikhailova, 1990).

Tabla 3. Número de cromosomas y estructura de los cariotipos de trematodos según el esquema filogenético de Brooks *et al.* (1985).

Especie	2n=	Estructura del cariotipo	Autor
Fasciolidae			
<i>Fasciola</i> sp.	20	4sm + 2 s mst +2 stsm+ 10 st+2 t	Moriyama <i>et al.</i> , 1979.
<i>F. hepatica</i>	20	sm	Romenenko y Pleshanova 1975.
<i>F. gigantica</i>	20	a	Romenenko y Pleshanova 1975.
Opisthorchiidae			
<i>Opisthorchis felineus</i>	14	-----	Romenenko, 1973.
<i>Metorchis intermedius</i>	14	10 m + 2 sm + 2 a	Baršiene, 1993.
Diplostomatidae			
<i>Diplostomum spathaceum</i>	20	8 m + 2 sm + 2 a + 8 t	Romenenko y Shigin, 1977
<i>D. indistinctum</i>	20	8 m + 4 sm + 8 t	Romenenko y Shigin, 1977.
<i>D. mergi</i>	20	10 m + 10 t	Romenenko y Shigin, 1977.
<i>D. pseudospathaceum</i>	20	2 m + 8 st + 10 t	Mutafova, Niewiadomska, 1988.
<i>D. paracaudum</i>	20	6 m + 6 sm + 8 st	Baršiene <i>et al.</i> , 1990; Baršiene y Staneviciute, 1991.
Strigeidae			
<i>Apatemon gracilis</i>	20	6 m + 4sm + 4sm-st + 2 st +4 a	Petkevičiute, 1991.
<i>A. minor</i>	20	2 m + 6 sm + 4st + 2a-st + 6 a	Baršiene, 1987.
<i>A. fuligulae</i>	20	4 m + 8 sm + 4 st + 6 a + cromosoma B-t	Baršiene, 1990.
Notocotylidae			
<i>Notocotylus attenuatus</i>	20	4 m + 4 sm-m + 4 sm + 8 a	Petkevičiute y Baršiene 1988.
<i>N. imbricatus</i>	20	2 m + 10 sm + 2 st + 6 a	Petkevičiute y Baršiene 1988.
<i>N. ephemera</i>	20	2 m + 6 smm + 4 sm + 2 st + 6 a	Petkevičiute y Baršiene 1988.
<i>N. noyeri</i>	20	2 m + 2 msm + 4 sm -+ 4 st+ 8 a	Petkevičiute <i>et al.</i> , 1989a.
<i>Notocotylus sp</i>	20	2 m + 6 sm + 4 st + 8 a	Baršiene <i>et al.</i> , 1990.
Cyclocoelidae			
<i>Cyclocoelum oculum</i>	20	4 m + 6 sm + 8 st + 2 a	Taft, Le Grande, 1979
<i>C. bivesiculatum</i>	20	-----	Dhingra, 1954.
Philophthalmidae			
<i>Philophthalmus megalurus</i>	20	-----	Kahlil y Cable, 1968.
<i>Ph. indieus</i>	20	2 sm + 2 a + 16 t	Subramanyam <i>et al.</i> , 1977.
<i>Ph. gralli</i>	20	8 sm + 12 a	Lo Verde, 1978; Grossman y Cain, 1981.
Echinostomatidae			
<i>Parorchis acanthus</i>	22	-----	Rees, 1939
<i>Echinostoma revolutum</i>	22	-----	Churchill, 1950
<i>E. revolutum</i>	22	2 m + 4sm + 2 st-sm + 10 st + 4 a	Baršiene y Kiseliene, 1991
<i>E. revolutum</i>	22	2 m + 2 sm-m + 4 sm + 14 st	Baršiene, 1993

El *C. complanatum*, presentó cromosomas que midieron desde $2.31\pm 0.09\mu\text{m}$ en el par más grande y hasta $1.140\pm 0.19\mu\text{m}$ el par más pequeño, mantuvieron una variación constante, pero no significativa para poderlas agruparlos por tamaños grandes y pequeños.

La estructura de agrupar cinco pares cromosomas grandes y cinco pares pequeños es una característica para trematodos, presenta en el género *Apatemon*, *A. cotylurus* (Baršiene *et al.*, 1990; Baršiene; 1992) *A. gracilis* (Petkevičiute y Staneviciuté, 1999), en la familia de Diplostomidae (Romanenko y Shigin, 1977; Mutafova y Niewiadomska, 1988; Staneviciuté y Baršiene, 1989; Baršiene *et al.*, 1990; Baršiene, 1991; Baršiene *et al.*, 1991; Baršiene y Staneviciuté, 1991; Staneviciuté, 1991; Baršiene, 1993).

El parasito *C. complanatum* presenta 20 cromosomas monorrámeos clasificados como de tipo telocéntrico, este tipo de cromosomas está presente en los *Diplostomidae*: *Diplostomum indistinctum* $8m+4sm+8t$, *D.mergi* $10m+10t$, *D. pseudospathaceum* $2m+8st+10t$, *D. spathaceum* $8m+2sm+2a+8t$. (Brook *et al.*, 1985). En los *diplostomidae*, se asumen que el conjunto de cromosomas subteloicéntrico, submetacéntrico y metacéntricos es fundamental dentro de la familia.

Han sugerido que a partir de un cariotipo 10 o 11 pares cromosomas monorrámeos de tipo telocéntrico o subteloicéntrico es una característica primitiva de trematodos y del suborden strigeidos (Benazzi y Benazzi-Lentati, 1976; Grossman y Cain, 1981; Grossman *et al.*, 1981).

Los trematodos son organismos que mantienen características conservadoras y sus cariotipos tienden a tener el mismo número de cromosomas estrechamente relacionado con la morfología cromosómica sobre el género e incluso de la familia del nivel taxonómico (Baršiene, 1993).

En los estudios que se han realizado en los trematodos (Baršiene *et al.*, 1990; Baršiene, 1991; Baršiene, 1992; Baršiene, 1993; Baršiene y Staneviciuté, 1991; Kaewkong *et al.*, 2012; Petkevičiute y Staneviciute, 1999; Mutafova y Niewiadomska, 1988; Staneviciuté y Baršiene, 1989; Staneviciute, 1991; Romanenko y Shigin, 1977), no han identificado cromosomas sexuales debido al tipo de reproducción que presenta de hermafroditas.

8. - CONCLUSIONES

El cariotipo típico de la metacercaria *C. complanatum*, está formado por $2n=20$ cromosomas todos monorráneos y de tipo (t) telocéntrico, los cuales fueron clasificados basado en las longitudes relativas y los cálculos de parámetros citogenéticos establecidos por Levan *et al.* (1964).

En los trematodos digeneos, este número de cromosomas es una tendencia evolutiva para mantener el número diploide igual o aproximadamente, lo que parece ser que presenta características ancestrales, así mismo señalan que la disminución del número de cromosomas por fusiones centroméricas; es decir presencia de cromosomas birráneos o con dos brazos cromosómicos describen a grupos relativamente avanzados desde el punto de vista cariológico.

No se encontraron cromosomas sexuales para el *C. complanatum* ya que estos organismos son hermafroditas.

9. – GLOSARIO

Buffer de lisis: Es una solución que tiene la función de romper la membrana para liberar al núcleo.

Cariotipo: Es el conjunto de cromosomas de una célula en metafase, ordenados de acuerdo a su morfología y tamaño, que caracterizan una especie.

Citotaxonomía: Ciencia que establece la identificación en base a características cromosómicas, tales como el número de cromosomas, su tamaño, la posición del centrómero, la forma y comportamiento de los cromosomas.

Colchicina: Compuesto alcaloide que inhibe la formación del huso mitótico durante la división celular.

Diploide: Número de cromosomas de la mayoría de las células somáticas y que es el doble del número de cromosomas de los gametos.

Cromosomas: Son estructuras que se encuentran en el centro (núcleo) de las células que transportan fragmentos largos de ADN.

Cromosomas homólogos: Pareja igual de cromosomas, uno proveniente de cada progenitor, que muestra los mismos loci genéticos en idéntico orden.

Hermafrodita: Organismo que presenta órganos sexuales masculinos y femeninos.

Hidrólisis: Proceso de la degradación de la pared celular y la pectina de las uniones intercelulares.

Hospedero: Organismo que alberga a otro en su interior o que lo porta sobre sí.

Ideograma: Es la representación gráfica de un cromosoma, se muestra la relación existente entre el brazo corto y el largo, posición del centrómero.

Medio de cultivo: Es un sustrato o una solución de nutrientes que permite el desarrollo de microorganismos

Metacercaria: Una de las etapas de los trematodos.

Metafase: Estadio de la división celular en el que los cromosomas han logrado su máxima condensación. Es la etapa en que se estudian los cromosomas con más facilidad.

Mitosis: División de las células somáticas de la que resulta la formación de dos células hijas; cada una de éstas posee el mismo complemento de cromosomas que la célula madre.

p: Brazo corto de un cromosoma.

Orceína: Es una sustancia que se utiliza para teñir y ver las distintas fases de los cromosomas en la división celular.

Proteínasa K: Es una enzima que degrada las proteínas de las membranas celulares.

Telocéntrico: Cromosoma que tiene el centrómero en un extremo, este cromosoma solo tiene el brazo largo.

10. – BIBLIOGRAFÍA

- Arias-Rodriguez, L. (2007). Genetic differentiation of Japanese *Misgurnus* loach inferred from microsatellite variation, marker-centromere map and reproduction of hybrids between two populations. *PhD thesis*. Hokkaido University, Hokkaido, Japan. 187 p.
- Arias-Rodriguez, L., Ibarra-Castro, L. y Páramo-Delgadillo, S. (2008). Los cromosomas mitóticos y meióticos del pez tropical *Petenia splendida* (Cichlidae). *Revista de Biología Tropical*, 56, 2: 895-907.
- Álvarez-Pellitero, P. & Sitjà-Bobadilla, A. (1993). *Ceratomyxa* spp. (Protozoa: Myxosporrea) infections in wild and cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax*, from the Spanish Mediterranean area. *Journal of fish biology*, 42, 889-901.
- Aohagi, Y. & Shibahara, T. (1994). *Clinostomum complanatum* infection in *Carassius* sp. collected from some ponds and rivers in Tottori and Shimane Prefecture, Japan. *Japanese Journal Parasitology*, 43, 129- 135.
- Aohagi, Y., Shibahara, T. & Kagota, K. (1993). Experimental infection of some species of freshwater snails with *Clinostomum complanatum* (Trematoda: Clinostomatidae). *Japanese Journal Parasitology*, 42, 493-498.
- Aohagi, Y., Shibahara, T. & Kagota, K. (1995). Metacercariae of *Clinostomum complanatum* found from new fish hosts, *Lateolabrax japonicus* and *Leuciscus hakonensis*. *Japanese Journal of Parasitology*, 44, 340-342.
- Aohagi, Y., Shibahara, T., Machida, N., Yamaga, Y. & Kagota, K. (1992). *Clinostomum complanatum* (Trematoda: Clinostomatidae) in five fish hosts in Japan. *Journal of Wildlife Disease*, 28, 467–469.
- Argumedo, R. L. (1997). *Catálogo de la colección nacional de helmintos*. UNAM.
- Baršiene, J. (1991). Chromosome sets of *Tylodelphys clavata*, *T. excavata* and *Posthodiplostomum cuticola* (Diplostomidae: Trematoda) from freshwater snails. *Angew.Parasitol*, 32, 87-92.
- Baršiene, J. (1992). The chromosome set of *Apatemon minor* and *A.* sp. (Trematoda) with a description of tetraploid embryos. *Angewandte Parasitologie*, 32, 87–92.

- Baršienė, J. (1993). The karyotypes of trematodes. Vilnius: Academia, 370 pp. (In Russian).
- Baršienė, J., Petkevičiūtė, R. B., Stanevičiūtė, G. J. & Orlovskaya, O. M. (1990). Karyological investigation of trematodes of the families *Notocotylidae*, *Echinostomatidae* and Strigeidae of North West Chukotka. *Parazitologiya*, 24, 3–10. (In Russian).
- Baršienė, J. & Stanevičiūtė, G. (1991). A comparative karyological study of trematodes within the genus *Diplostomum*. *Helminthol*, 28, 31-36.
- Baršienė, J., Stanevičiūtė, G. & Kiseliene, V. (1991). A new data on karyotype of *Diplostomum pseudospathaceum* (Trematoda: Diplostomatidae). *Parasitology*, 25, 18-24.
- Baršienė, J., Stanevičiūtė, G., Niewiadomska, K. & Kiseliene, V. (1990). Chromosome sets of *Diplostomum paracaudum*. *Acta Parasitology Polonia*, 35, 107-112.
- Benazzi, M. & Benazzi-Lentati, G. (1976). Animal Cytogenetics, Vol. 1. Platyhelminthes. *Borntraeger, Berlin-Stuttgart*. 182 pp.
- Birstein, V. J. & Mikhailova, N. A. (1990). On the karyology of trematode of the genus *Miscrophallus* and intermediate gastropod host, *Littorina saxatilis*. *Genetica*, 80, 165-165.
- Brooks, D. R., O'Grady, R. T. & Glen, D. R. (1985). Phylogenetic analysis of the Digenea (Platyhelminthes: Cercaria) with comments on their adaptive radiation. *Canadian Journal of Zoology*, 63, 411-443.
- Chung, D., I. Kong, H. H. & Joo, C. Y. (1998). *Radix auricularia coreana*: natural snail host for *Clinostomum complanatum* (Rudolphi). *Korean Journal of Parasitology*, 36, 1–6.
- Chung, D. I. Kong, H. H. & Moon, C. H. (1995). Demonstration of the second intermediate hosts of *Clinostomum complanatum* Korea. *Korean Journal of Parasitology*, 33, 305-312.

- Chung, D. I., Moon, C. H., Kong, H. H., Choi, D. W. & Lim, D. K. (1995). The first human case of *Clinostomum complanatum* (Trematoda: Clinostomatidae) infection in Korea. *Korean Journal Parasitology*, 33, 219-223.
- Cable, J., Tinsley, R. C. & Haarris, P. D. (2002). Survival and embryo development of *Gyrodactylus gastereostei* (Monogenea: Gyrodactylidae). *Parasitology*, 124, 53-68.
- Córdova, J. y Lamas G. Citogenética, filogenia, clasificaciones naturales y evolución de las especies. (1997) *Alma Mater* 13, 95-111.
- Das, S. M. & Subla, B. A. (1963). The ichthyofauna of Kashmir: Part 1. History, topography, origin, ecology and general distribution. *Ichthyologica*, 2, 87-106.
- Deardorff, T. L. & Overstreet, R. M. (1991). Seafood-transmitted zoonoses in the United States: the fishes, and the worms. In: WARD, D. R. & HACKENEY, C. (Eds) *Microbiology o marine food products*. Van Reinold, New York.
- Dias, M. L. (2002). Ciclo de vida e aspectos ecológicos de *Clinostomum complanatum* (Rudolphi, 1814) (Trematoda: Clinostomidae). *Doctoral thesis, University of Maringá Maringá*.
- Dias, M. L., Eiras, J. C., Machado, M. H., Souza, G. T. & Pavanelli, G. C. (2003). The life cycle of *Clinostomum complanatum* (Rudolphi, 1814) (Digenea, Clinostomidae) on the floodplain of the high Paraná river, Brazil. *Parasitology Research*, 89, 506-508.
- Dubinín, C. P. (1976). *Genetica general*. Traducida al español por Noemi Diaz Vilches. Moscu, URSS. Editorial MIR. 480 p.
- Dubois, G. (1968). Synopsis des Strigeidae et des Diplostomatidae (Trematoda). *Memoires de la Societé Neuchateloisedes Sciences Naturelles* 10:260–727.
- Eiras, J. C. (1994). *Elementos de Ictioparasitologia*. Fundacao Eng. Antonio de Almeida, Porto, Portugal, 339p.
- Eisenback, J. D., Hirschmann, H., Sasser, J. N. & Triantaphyllou, A. C. (1981). A Guide to the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). International *Meloidogyne* Project. Departments of Plant Pathology and Genetics North Carolina State University. 48 pp.
- Espinosa de los Monteros, J. y Labarta U. (1988). *Patología en Acuicultura*.

- FAO. (2005). Estadística de pesca. Productos. Vol. 97. Rome/Roma, FAO 235 p.
Página Web: www.fao.org.mx.
- FAO. (2012). El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura Roma.
- FAO. (2014). El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura Roma.
- Ferre, I. (2001). Anisakiosis y otras zoonosis parasitarias transmitidas por consumo de pescado. *Revista Aquatic*, 14, 1-20.
- Fister, S., Cakic, P. & Kataranovski, D. (1999). Karyotype analysis of *Barbus barbus* and *Barbus peloponnensius*. (Cyprinidae) and frequencies of breaks and gap type structural chromosome changes in fishes from river Vapa. *Acta Veterinaria (Belgrade)*, 49, 385-392.
- Flores, Crespo, J. y Flores Crespo, R. (2012). Monogeneos, parásitos de peces en México: estudio recapitulativo. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 41, 2.
- García Magaña, L. y López Jiménez, S. (2008). Parásitos de peces de la reserva de la biosfera "Pantanos de Centla", Tabasco: algunas recomendaciones para su prevención y control. División Académica de Ciencias Biológicas. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. V044. México D.F.
- García, M. L. J., Osorio, S. D. y Constantino, F. (1993). Prevalencia de los parásitos y las alteraciones histológicas que producen las Tilapias de la Laguna de Amela, Tecomán, Colima. *Veterinaria México*. 24, 199-2053
- Gholami, Z., Mobedi, I., Esmaeili, H.R. & Kia, E.B. (2011). Occurrence of *Clinostomum complanatum* in *Aphanius dispar* (Actinopterygii: Cyprinodontidae) collected from Mehran River, Hormuzgan Province, South of Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1, 189-192.
- Grabda-kazubaska, B. (1974). *Clinostomum complanatum* (Rudolphi, 1819) and *Euclinostomum heterostomum* (Rudolphi, 1819) (Trematoda,

- Clinostomatidae), their occurrence and possibility of acclimatisation in artificially heated lakes in Poland. *Acta Parasitology*, 22, 285-293.
- Grossman, A. I. & Cain, G. D. (1981). Karyotypes and chromosome morphologies of *Megalodiscus temperatus* and *Philophthalmus gralli*. *Helminthol*, 55, 71-78.
- Grossman, A. I., Short, R. B. & Cain G. D. (1981). Karyotype evolution and sex chromosome differentiation in schistosomes (Trematoda, Schistosomatidae) *Chromosoma*. 84, 413-430.
- Guzmán-Cornejo, M. D. C. y García-Prieto, L. (1999). Trematodiasis en algunos peces del lago del Cuitzeo, Michoacán, México. *Revista Biología Tropical*, 47, 593-596.
- Hunter, W. S. & Hunter, G. W. (1935). Studies on *Clinostomum*. The miracidium of *Clinostomum marginatum*. *Journal Parasitology* 21, 186.
- Isobe, A., Kinoshita, S., Hojo, N., Fukushima, T., Shiwaku, K. & Yamane, Y. (1994). The 12th human case of *Clinostomum complanatum* sp. Infection in Japan. *Japanese Journal Parasitology*, 43, 193-198.
- Kaewkong, W., Choochote, W., Kanla, P., Maleewong, W., Intapan, P. M., Wongkham, S., & Wongkham, C. (2012). Chromosomes and karyotype analysis of a liver fluke *Opisthorchis viverrini* by scanning electron microscopy. *Parasitology international*, 61, 504-507.
- Kagei, N., Yanohara, Y., Uchikawa, R. & Sato, S. (1984). On the yellow grubs, metacercariae of *Clinostomum complanatum* (Rudolphi, 1819) found in the cultured loach. *Japanese Journal Parasitology*, 33, 59-62.
- Kalantan, A. M., Arfin, M. & Nizami, W. A. (1987). Seasonal incidence and pathogenicity of the metacercariae of *Clinostomum complanatum* in *Aphanius dispar*. *Japanese Journal Parasitology*, 36, 17-23.
- Kamo, H., Ogino, K. & Hatsushika, A. R. A. (1962). Unique infection of man with *Clinostomum* sp., a small Trematoda causing acute laryngitis. *Yonago Acta Medica*, 6, 37-40.
- Kaur, P., Qureshi, T. A., Shrivastav, R., Manohar, S. & Bilal, A. (2012). Histopathological and Haematological investigations on *Nandus nandus*

- (Ham.) parasitized by metacercariae of *Clinostomum complanatum* (Rudolphi, 1819). *International Journal of Environmental Sciences*, 2, 1324-1330.
- Khan, T. A., Bhise, M. P. & Lakra W. S. (2000). Chromosome manipulation in fish - a review. *Indian Journal of Animal Science* 70, 213-221.
- Kifune, T., Ogata, M. & Miyahara, M. (2000). The first case of human infection with *Clinostomum* (Trematoda: Clinostomidae) in Yamaguchi Prefecture, Japan. *Medice Bull Fukuoka University*, 27, 101-105.
- Kinkelin, P., Michel. C. H. y Ghittino, P. (1985). Tratado de las enfermedades de los peces. Zaragoza España. Acribia. 25-30 p.
- Kitagawa, N., Oda, M., Totoki, T., Washizaki, S. & Kifune, T. (2003). Lidocaine spray used to capture a live *Clinostomum* parasite causing laryngitis. *American Journal of otolaryngology*, 24, 341-343.
- Lacadena, J. R. (1996). Citogenética. 1ra Edición. Editorial Complutense S.A. Madrid. España.
- Levan, A., Fredga, K. & Sandberg, A. A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes, *Hereditas*, vol. 52, pp. 201-220.
- Lo, C. F., Huber, F., Kou, G. H. & Lo, C. J. (1981) Studies of *Clinostomum complanatum* (Rudolphi., 1814). *Fish Pathology*, 15, 219-227.
- Lo, C. F., Huber, F., Kou, G. H. & Wang, C. H. (1982). The study of *Clinostomum complanatum* (Rudolphi, 1814). *Fish Disease Research Taiwan* 14, 26-56.
- Lo, C. F., Kou, G. H., Hubert. F, & Liu, F. G. (1980). The study of *Clinostomum complanatum* (Rudolphi, 1814). *Fish Disease Research Taiwan* 3, 9-16.
- Lo, C. F., Kou, G. H., Huber, F. & Liu, F. G. (1987). The study of *Clinostomum complanatum* (Rudolphi, 1814). The metacercaria of *C. complanatum* in the sweet fish (*Plecoglossus altivelis*). *The memoir of parasitology in fish disease*, 2, 56-63.
- Macgregor, H. & Varly, M. J. (1993). Working with animal chromosomes. 1st. Ed. New York: John Wiley.

- Malek, M. & Mobedi, I. (2001). Occurrence of *Clinostomum complanatum* (Digenea: Clinostomidae) in *Capoeta gracilis* (Osteichthys: Cyprinidae) from Shiroud River, Iran. *Iranian Journal of Public Health*, 30, 95-98.
- Mitchell, A. J. (1995). Yellow grub and other problems associated with aquatic birds. *Journal of Aquatic Animal Health*, 21: 93-97.
- Mutafova, T. & Niewiadomska, K. (1988). The morphology of chromosomes of *Diplostomum pseudospathaceum* (Diplostomidae) karyotype. *Acta Parasitology Polonia*, 33, 83-88.
- Nakamura, H. K. (1985). A review of molluscan cytogenetic informations based on the CISMOCH - computerised index system for molluscan chromosomes. Bivalvia, Polyplacophora and Cephalopoda. *Japanense Journal Malacol*, 44: 193-225.
- Niewiadomska, K. (1973). Some aspects of the biology and evolution of Strigeata. La Rue and their importance in systematics of this group of Trematoda. *Acta Parasitologica Polonica* 21, 21-62.
- Olsen, O. W. (1986). Animal parasite: Their Life Cycles and Ecology. Courier Dover Publications. 562 pp.
- Paperna, I. (1991). Diseases caused by parasites in the aquaculture of Warm fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 1, 155-194.
- Pérez-Ponce de León, G., García-Prieto, L., Osorio-Sarabia D. y León-Règagnon, V. (1996). Listados Faunísticos de México VI. Helmintos parásitos de peces de aguas continentales de México. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 78-100 p.
- Pérez-Ponce de León, G., Osorio-Sarabia, D. y García-Prieto, L. (1992). Helminthofauna del "Juile" *Rhamdia guatemalensis* (Pisces: Pimelodidae), del lago de Catemaco, Veracruz. *Revista de la Sociedad Mexicana de Hististoria Natatural*, 43, 25-31.
- Petkevičiute, R., Kiseliene, V. & Stenko, R. P. (1989). Cytogenetic analysis of two populations of *Diplodiscus subclavatus* (Trematoda, Diplodiscidae). *Parazitologiya* 23, 489-495.

- Petkevičiute, R. & Staneviciute, G. (1999). Karyotypic characterization of *Apatemon gracilis*. *Journal of helminthology*, 73, 73-77.
- Puente, H. S. & Short, R. B. (1985). Redescription of chromosome of *Schistomatum douthitti* (Trematoda: Schistosomatidae). *Journal Parasitology*, 71, 345-348
- Ramos, P. R. (1995). Algunos tremátodos de vertebrados de la presa Miguel Alemán, en Temascal, Oaxaca, México. *Anales del Instituto de Biología serie Zoología*, 66, 002.
- Saksena, J. N. (1969). Chromosome studies in fifteen species of Indian digenetic trematodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences. India B*, 39, 81-110.
- Santos, E. A. L. (1995). Prevention and control of food borne trematodes in cultured fish. *International Journal*, 2, 57-62.
- Shamsi, S., Halajian, A., Tavakol, S., Mortazavi, P. & Boultona, J. (2013) Patogenicidad de *Clinostomum complanatum* (Digenea: Clinostomidae) en aves piscívoras. *Research in veterinary science*, 95, 537-539.
- Siddiqui, A. & Nizami, W. A. (1982). Seasonal population dynamics of the metacercariae of *Clinostomum complanatum* (Trematoda: Digenea) in relation to sex of the host. *Revista diseases Parasitologia*, 43, 275-279.
- Silva-Souza, A. T. & Ludwig, G. (2005). Parasitism of *Cichlasoma paranaense* (Kullander, 1983) and *Gymnotus carapo* (Linnaeus, 1814) by *Clinostomum complanatum* (Rudolphi, 1814) metacercaria in the taquari river. *Brazilian Journal of Biology*, 65, 513-519.
- Staneviciute, G. (1991). Karyological studies of *Posthodiplostomum cuticola* (Nordmann, 1832) (Trematoda: Diplostomidae). III Intern at. *Symposium Problems of fish parasitology, Petrozavodsk*, 78 p.
- Staneviciute, G. (1993). The investigation of the karyotype of *Cercaria globocaudata* 1940 (Trematoda). *Biology, Vilnius*, 1, 46-47.
- Subramanyam, S. & Venkat Reddy, P. (1977). The role of chromosomes in the taxonomy of some digenetic trematodes. *The Nucleus* 20, 128-138.

- Suleyman, G., Ahmet, C., Ilhan, S. & Bertal, K. (2004). Karyotype analysis in *Alburnus heckeli* (Battalgil, 1943) from Lake Hazer Turkish. *Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 28, 309-314.
- Szalai, A. J. & Dick, T. A. (1988). Helminths of stocked rainbow trout (*Salmo gairdneri*) with reference to *Clinostomum complanatum*. *Journal Wildlife Disease*, 24, 456-60.
- Tan, X., Jian, G. Q., Chen, B., Chen, L. & Li X. (2004). Karyological analysis on redclaw cray fish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). *Aquaculture*, 234, 65-76.
- Thatcher, V. E. (1991). Amazon fish parasites. *Amazoniana*, 11, 263-571.
- Tiewchaloern, S., Udomkijdech, S., Suvouttho, S., Chunchamsri, K. & Waikagul, J. (1999). *Clinostomum* trematode from human eye. *SoutheastAsian. Journal Tropical Medecina.Public Health*, 30, 382–384.
- Tripathy, N. K. & Das, C. C. (1988). Karyotypes of five Indian Perciform fishes *Copeia*, 231-233.
- Vianna, R. T. (2001). *Clinostomum complanatum* (Rudolphi, 1814) *Rhamdia quelen* (Quoy y Gaimard, 1824), no Arroio Sarandi, Rio Grande, RS. M.S. Thesis, Universidade Federal de Santa María, Santa María, RS.
- Vidal–Martínez, V. M., M. L. Aguirre–Macedo, T. Sholz, D. González–Solís y Mendoza–Franco. E. F. (2002). Atlas de los helmintos parásitos de cíclidos de México. Instituto Politécnico Nacional. México, D. F. 183 p.
- White, M. J. D. (1957). Modes of Speciation, San Francisco, W.H. Freeman y Co, pp. 55.
- Winkler, F. M., Garcia-Melys, D. & Palma-Rojas, C. (2004). Karyotypes of three South East Pacific Flounder species of the family *Paralichthyidae*. *Aquaculture Research*, 35, 1295-1298.
- Zadesenets, K. S., Katokhin, A. V., Mordvinov, V. A. & Rubtsov, N. B. (2012). Comparative cytogenetics of opisthorchid species (Trematoda, Opisthorchiidae). *Parasitology International*, 61, 87-89.