



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología  
Universidad Nacional Autónoma de México



Ciclo de vida de *Heterobothrium ecuadori* (Meserve, 1938)  
Sproston, 1946 (Monogenea:Diclidophoridae) ectoparásito  
del botete diana *Sphoeroides annulatus* (Jenyns, 1842).

# T E S I S

que para obtener el grado académico de

Maestro en Ciencias

(Biología Marina)

p r e s e n t a

Biol. Mayra Ixchel Grano Maldonado

Director de Tesis: Dra. Emma Josefina Fajer Avila

Comité Tutorial: Dr. Ramiro Román Contreras

Dra. Ana Roque Trigo de Sousa



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



*A mis Padres*

*Por su apoyo constante para seguir superándome*

*A mis Hermanos*

*Por ser grandes amigos, por estar siempre conmigo*

*Y para que sigan adelante*



*Mis ojos se han vuelto claros*

*De tanto mirar el mar;*

*De tanto verlo en mi vida;*

*Las olas vienen y van*

*Y hay horizontes sin límites,*

*De severa majestad*



*Amado Nervo*

*En formación Vocacional...*

Con gran cariño a mi Universidad, y al Instituto de Ciencias del mar y Limnología UNAM.

Con un profundo agradecimiento a mi Directora de tesis, Dra Emma Fajer por ser una persona extraordinaria, quien me brindo su generosa amistad, apoyo incondicional y absoluto en todas las etapas de mi trabajo, personales y estancia en los laboratorios. *Gracias Asere ¡!*

A mis sinodales, al Dr. Ramiro Román, Dra. Ana Roque, Dr. Gerardo Pérez, y Dr. Neil Duncan quienes con sus conocimientos y apoyo constante dieron el vínculo necesario para la integración de esta tesis.

Al Dr. Rafael Lamothe, quien siempre me ha brindado su apoyo como asesor taxonómico y para acceder a la bibliografía imprescindible en este trabajo.

Al M en C. Luis García, quien siempre estuvo dispuesto para ayudarnos en la búsqueda de artículos. De la misma manera a mis compañeros del Laboratorio de Helminología Rogelio y Alejandro por el envío de información.

Al Dr. Martín Merino, Coordinador del Posgrado ICMYL, por ser una persona que se preocupara por los estudiantes, que nos brindó siempre una ayuda constante durante los años previos y durante la maestría. Así también a Normita y Lupita sorprendentemente humanas, generosas y pacientes personas con los estudiantes. Gracias ¡!

A la Dra. Cristina Chávez directora del Ciad Mazatlán, por su disposición continua, ayuda relacionada a los extenuantes de trámites académicos.

A la M en C. Roxana Rinohuye y al M en C. Juan Carlos Rodríguez por generosa amistad, su accesoria y apoyo durante mi estancia para la colecta de material biológico en la Paz, BCS.

Al CICIMAR-La Paz. Al M en C. Marcial Arellano y M en C. Patricia Ceballos por su ayuda en la captura y transporte de peces.



Al Dr. Miguel Betancour por su apreciable amistad y apoyo en los agotadores análisis estadísticos, por su disposición y paciencia.

Al Laboratorio de Poliquetos de la Estación Académica Mazatlán, al Dr. Samuel Gómez y Dra. Nuria Méndez quienes me brindaron su amistad, un espacio físico, préstamo de material y equipo del laboratorio.

A la técnico del Laboratorio de Parasitología del CIAD, Rosy Medina, quien me apoyó en la parte experimental, alimentar a mis peces y por ser una gran compañera en el trabajo.

A Gabriela Aguilar por su linda amistad, apoyo constante en las dudas sobre los análisis estadísticos y préstamo de material. A Isabel Abdo, Crisantema Hernández e Irma Martínez por sus constantes donaciones de peces. Al laboratorio de Reproducción por el préstamo de equipo.

A todo el personal de la Unidad Académica ICMYL Mazatlán y al CIAD Mazatlán, por su ayuda constante.

A German y Carlos por su apoyo en el centro de computo y lo que se relacionaba a el. También a Nacho por su super apoyo en la impresión de las tesis y su siempre disposición para ayudar a los demás.

A la M en C. Berenit Mendoza por su valiosa ayuda en la toma de fotografías en el microscopio de barrido.

Al Dr. Jorge Romero, porque siempre nos brindó una linda y apreciada amistad, por su genial e inigualable forma de ser.

A mis buenos y malos maestros.



*Mis amigos...*

A Ramón, por ser un amigo admirable y cómplice fenomenal, dispuesto siempre a escucharme. Con quien conviví y compartí experiencias de superación personal e intelectual inolvidables, instantes insólitos e increíbles, porque siempre seguimos la aventura como un reto, por esos buenos y no tan buenos momentos,  
*Gracias amigo!*

A Jhonny, por ser un amigo fuera de lo común, quien hizo mi estancia estupenda en el laboratorio, por escucharme siempre que lo necesitaba, por toda su ayuda en muchas etapas de mi trabajo, por compartir tradiciones y por sus sabios consejos.

*Gracias Parce!!*

A Sofía y Erica, quienes fueron mis grandes compañeras de butaca que hicieron de las clases una aventura incomparable. Por ser unas amigas que siempre nos motivamos a seguir adelante. A Sofía, porque compartimos experiencias insuperables y estuvimos al pendiente de nuestras vidas, por ser cómplices en muchas peripecias. *Las quiero Amigas!*

A Ana, por hacer de mis viajes escolares insuperables y extraordinariamente divertidos. Por escucharme, compartir aventuras de juventud. Pero sobre todo a un niño sorprendente y fantástico que enriqueció mi espíritu infantil con mil anécdotas... *Gracias Alfonso!*

A Karla, por ser una amiga y compañía estupenda, con quien pasé momentos de reflexión interesantes, por ser increíblemente noble. Por que compartimos una amistad *super chila machin*.

A Hugo y a Memo, porque solo los visualizo juntos, uno por ser un vecino siempre presto a cualquier evento comunicativo. Memo, por ser una persona desinteresada, por tener un gran corazón y nobleza suprema. Por compartir grandiosas pláticas, diversión sana y continua.

*Gracias...porque siempre estuvieron ahí...!*



A Samuel, quien siempre estuvo dispuesto a escuchar a todo el mundo que entraba con un problema al laboratorio, sino estaba cerrada su puerta. Por ser un excelente amigo, que siempre estuvo al pie del cañón y veía la forma de ayudarnos.

A Pepe Salgado, quien siempre saludaba con una admirable y linda sonrisa, a pesar de lo que fuera. Con quien tuve momentos de desahogo espiritual y siempre estaba ahí para dialogar.

A Angélica, quien es una mujer de destacada fortaleza emocional y una gran amiga, con quien compartí momentos muy interesantes. A mis compañeros de la Maestría, que tuvieron que soportar nuestra forma de ser; a Alex E., Iván, Claudia, Manuel, Alex G, Miguel, Nacho, Chucho, Pablo, Sorompo, Yolanda Saldivar y diversas personas q se congregaban en las fiestas del Instituto que hicieron momentos inolvidables.....etc.etc.etc.....

A todos mis amigos quien hicieron de mi estancia en Mazatlán, la mejor de las experiencias a mis amiguis de parrandas: Ramón, Jhony, Karla, Ele, Hugo, Memo, Samuel, Pepe, Nefta, Eloy, Arturo, Manuel, Nora y Dilian. A mis compañeros de Laboratorio en orden cronológico... Adriana, Roberto, Ana, Manuel, Fernando, Sandra y Paul quienes me ayudaron de todas las formas posibles.

A mis amigos, q siempre han estado conmigo, en la Universidad (Erick, Carlos, Margarita, etc.etc), Prepa, Secundaria y Primaria, a quienes sigo viendo y son parte importante de mi vida.

A Herlinda y Octavio, quien siempre estuvieron cuando necesitaba de un “descanso” durante esas largas horas en el laboratorio. Por ser personas extraordinariamente generosas.

A Isabel y su hermosa familia, quien me dio un gran apoyo moral y compañía, a Gloria.

A CONACYT y Becas nacionales, por el apoyo brindado

**A todos mis amigos y personas que por descuido omito, pero no olvido.**

**RESUMEN**  
**ABSTRACT**

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>6</b>
2.1 Generalidades sobre Monogeneos	6
2.2 Monogeneos causantes de infecciones en peces de cultivo	13
2.3 Estudios sobre parásitos de peces marinos tetraodóntidos en México	14
2.4 Cultivo <i>in vitro</i> y ciclos de vida de monogeneos	18
<b>3. BIOLOGÍA DEL HOSPEDERO</b>	<b>22</b>
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>24</b>
<b>5.OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>26</b>
6.1 Colecta de material biológico y sistema experimental para detección de hospederos con <i>Heterobothrium ecuadori</i>	26
6.2 Técnicas para la obtención de huevos de <i>H. ecuadori</i>	28
6.3 Descripción del desarrollo embrionario de huevo a oncomiracidio	29
6.4 Porcentaje de eclosión y periodo de vida del oncomiracidio a diferentes salinidades	31
6.5 Infecciones experimentales	33
6.6 Análisis estadísticos	38
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>40</b>
7.1 Diseño experimental para la detección de los huevos de <i>H. ecuadori</i> .	
7.2 Descripción del huevo	41
7.3 Desarrollo embrionario	43
7.4 Descripción del oncomiracidio: estadio infectivo	52

7.5 Sistema de Microscopía electrónica de barrido (MEB)	57
7.6 Porcentaje de eclosión de los huevos a diferentes salinidades	59
7.7 Infestaciones experimentales	64
7.8 Ciclo de vida	80
<b>8. DISCUSIÓN</b>	<b>82</b>
8.1 Técnicas para la obtención de los huevos	82
8.2 Descripción del huevo y desarrollo embrionario	85
8.3 Eclosión y descripción del oncomiracidio	87
8.3.1 Oncomiracidio	90
8.4 Porcentaje de eclosión y supervivencia del oncomiracidio a diferentes salinidades	92
8.4.1 Supervivencia del oncomiracidio	95
8.5 Fases juveniles	97
8.6 Ciclo de vida	102
<b>9. CONCLUSIONES</b>	<b>104</b>
<b>10. RECOMENDACIONES</b>	<b>106</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>10</b>
<b>12. ANEXO</b>	

## RESUMEN

Las investigaciones recientes sobre el pez marino “botete diana”, *Sphoeroides annulatus*, en el noroeste del Pacífico mexicano, han mostrado las potencialidades para su cultivo. Una limitante ha sido la infestación por el monogeneo branquial *Heterobothrium ecuadori*, el cual afecta el crecimiento y ocasiona mortalidades. No existe información sobre la biología de esta especie parásita, por lo que el objetivo del presente estudio fue describir el ciclo de vida de *Heterobothrium ecuadori* bajo condiciones de laboratorio. En tanques de fibra de vidrio de 500 l se colocaron juveniles de botete diana infectados con *H. ecuadori* y mediante un sistema experimental compuesto por hilos de nylon amarrados a la manguera del aireador de los tanques, se colectaron los huevos depositados por este monogeneo en el lapso de una hora. Los huevos fueron adheridos a los hilos y depositados en cajas Petri con agua de mar estéril (35 ‰) e incubados a  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$  hasta completar su desarrollo larvario. Se realizaron experimentos *in vitro* para determinar el efecto de diferentes salinidades (0, 7, 14, 21, 28 y 35‰) a  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$  sobre el porcentaje de eclosión de los huevos de este monogeneo. Se infectaron juveniles de botete diana con los oncomiracidios para describir los diferentes estadios juveniles y completar el ciclo del parásito. Los huevos obtenidos fueron ovoides, operculados, de tipo ectolecito con un filamento unipolar. Se describió la dinámica de eclosión que osciló entre 7-10 días y la morfología de los estadios del desarrollo embrionario huevo - oncomiracidio. El porcentaje de eclosión fue 0% a 0‰, 48% a 7‰, 94% a 14‰, 90% a 21‰, 70% a 28‰ y 96% a 35‰ indicativo de una amplia tolerancia de este parásito a las variaciones de salinidad, lo cual puede corresponderse con la capacidad del pez hospedero para soportar estas variaciones en la salinidad del medio. Se encontró una reducción significativa ( $P < 0.05$ ) del porcentaje de eclosión 58% para 7‰ y 0% para 0‰ en comparación con el control de 94% a 35‰. El periodo de vida libre del oncomiracidio está en un intervalo de 4-7 días y el 50% de la población muere al quinto día a  $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Las características del oncomiracidio fueron similares a las descritas para otras especies de monogeneos de la familia Diclidophoridae, se describieron los 5 estadios juveniles y el adulto de *H. ecuadori* entre los 5 y 25 días posteriores a la infestación. El ciclo de vida de *H. ecuadori* desde oncomiracidio a adulto fue de 26-27 días ( $28\pm 1^{\circ}\text{C}$  y  $35\pm 1\text{‰}$ ) y de 33-35 días ( $22\pm 1^{\circ}\text{C}$  y  $35\pm 1\text{‰}$ ). Estos son los primeros resultados del estudio del ciclo de vida de *H. ecuadori* cuyo conocimiento provee información básica para la evaluación de estrategias de manejo para su control.

## ABSTRACT

Recent investigations on the bullseye puffer *Sphoeroides annulatus* have showed this species has a good potential for aquaculture. However, parasite infestations due to the gill monogenean *Heterobothrium ecuadori* have been a problem since this parasite affects growth and causes death. Little information regarding this parasite species is available, therefore the aim of this study was to describe the life cycle under laboratory conditions. Five hundred L tanks were used to place wild puffer fish adults infected with *H. ecuadori*, and an experimental system consisting of nylon thread tied to the air blowers was used to collect the eggs. The eggs of the parasite were collected after one hour and placed into Petri dishes containing sterile sea water (35‰) and incubated at  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$  until the embryonic development was completed. *In vitro* experiments were performed to determine the effect of different salinities (0, 7, 14, 21, 28 and 35‰) at  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$  on the hatching percentage of the eggs. Bullseye puffer fish juveniles were infected with oncomiracidium larvae to describe the different juvenile stages and complete the cycle. *Heterobothrium ecuadori* eggs were oval-shaped, operculated, ectolecyte type, with a long filament. Hatching dynamics oscillated between 6 and 10 days; and the morphology of different embryonic stages was described. Hatching percentage was 48% at 7‰, 94% at 14‰, 90% at 21‰, 70% at 28‰ and 96% at 35‰; indicating a wide tolerance to salinity fluctuations. This is consistent with the ability of the bullseye puffer to withstand salinity variations in the wild environment. A significant reduction ( $P < 0.05$ ) of hatching percentage (48% at 7‰ and 0% at 0‰) was observed compared to the control group (96% at 35‰). Oncomiracidium features were similar to those described for other monogenean species belonging to the Diclidophoridae family. Five juvenile stages and the adult stage of *H. ecuadori* were described between 5 and 30 days post infestation. The life cycle of *H. ecuadori* from oncomiracidium to adult was of  $34.4\pm 1.2$  days ( $23\pm 1^{\circ}\text{C}$  and 35‰). These are the first results regarding the life cycle of *H. ecuadori*, providing basic information which could be used to evaluate strategies for the efficient control of this parasite in cultured puffer fish.

## 1. INTRODUCCION

En el último decenio, la acuicultura ha sido el sector de producción de alimentos que ha crecido más aceleradamente a nivel mundial. Por su importancia en el suministro de alimentos e ingresos, este sector está posicionado entre uno de los principales contribuyentes a la seguridad alimentaria, su apoyo en peso al suministro mundial de la pesca pasó de 5.3% en 1970 a 32.2 % en el 2000. El pescado es el quinto producto agropecuario más importante y el mayor recurso de proteína animal que se consume en el mundo entero. Muchos países en desarrollo exportan productos acuícolas de tal forma que la acuicultura está convertida en un importante suministro de divisas (Castillo, 2003).

Para Japón, la acuicultura ha sido una industria básica y ha ganado fundamental importancia por intensificar el cultivo de peces marinos, que en 1993 representó un 20% del total de la producción proveniente de la maricultura (Ogawa, 1996). Actualmente, la acuicultura de las 40 especies de peces marinos cultivados en Japón es bastante estable, con una producción anual de 264 000 tons en 1999 (Ogawa, 2002). Un ejemplo de esto, se encuentra en el suroeste de Japón, donde se desarrolla el cultivo del botete tigre *Takifugu rubripes*, este pez marino perteneciente a la familia Tetraodontidae, alcanza un precio en el mercado

de alrededor de 50 dls/Kg y en los años recientes, la producción anual ha excedido las 5 000 toneladas métricas (Hirazawa *et al.*, 2000).

En el noroeste de México, el cultivo de camarón es considerado una actividad económica importante dentro de la industria de la acuicultura. En la actualidad se ha manifestado el interés y necesidad por diversificar el cultivo a otras especies marinas como una nueva alternativa a la acuicultura del camarón, y la industria acuícola solicita investigaciones enfocadas a diversificar la camaronicultura a otras especies marinas (Abdo de la Parra y Duncan, 2002; Martínez-Rodríguez *et al.*, 2002).

En las costas de Sinaloa, México, se encuentran con una gran diversidad de peces de importancia económica entre las cuales, el botete diana *Sphoeroides annulatus* Jenyns, 1842, sobresale por su carne blanca libre de espinas, de buena textura y sabor, por lo cual se convierte en un producto alimenticio preferido por el consumidor. Las especies de tetraodóntidos encontradas en el litoral mexicano han sido consideradas como comestibles y no tóxicas (Nuñez-Vázquez *et al.*, 2000). El botete diana alcanza un alto precio en el mercado nacional de 60-80 pesos/Kg (Duncan *et al.*, 2003) y México es el segundo exportador de botete en el mundo (Nuñez-Vázquez *et al.*, 2000). Este pez se distribuye ampliamente en las

costas del Pacífico mexicano (Fischer, 1995), se presenta como fauna de acompañamiento en la pesca del camarón y crece en tanques dedicados a la engorda del mismo, por lo que facilita el aprovechamiento de la infraestructura existente con doble propósito (Martínez-Rodríguez *et al.*, 2002). Además, posee características que hacen posible su cultivo: tolerancia al manejo y a los cambios ambientales, así como reproducción en cautiverio que posibilita la producción de huevos, larvas y juveniles (Abdo de la Parra y Duncan, 2002).

Sin embargo, a pesar de la importancia económica de la industria acuícola, existen serias limitantes que frenan su crecimiento destacándose entre ellas las parasitosis, que pueden demeritar el producto y son capaces de anular la rentabilidad del cultivo (Flores-Crespo y Flores-Crespo, 2003).

Las infestaciones por parásitos ocasionan grandes pérdidas en especies de peces en cultivo (Ogawa, 2002) por lo que, deben ser consideradas como un factor fundamental dentro de cualquier sistema de acuicultura. Las parasitosis más frecuentes son causadas por protozoarios, monogeneos, gusanos sanguíneos y copépodos (Ogawa, 1996). Dentro de estos, los parásitos de ciclo de vida directo se convierten en patógenos significantes cuando los peces están confinados en jaulas de engorda (Whittington, 2001; Flores-Crespo y Flores-Crespo, 2003).

La alta fecundidad y patogenicidad de monogeneos de la familia Diclidophoridae como *Heterobothrium okamotoi* Ogawa, 1991 y *Neoheterobothrium hirame* Ogawa, 1999 han sido causa de brotes epidémicos en el botete tigre cultivado y han provocado efectos económicos negativos. Estos efectos se han incrementado debido a la baja susceptibilidad de estos monogeneos a los quimioterapéuticos (Ogawa y Yokoyama, 1998; Ogawa, 2002).

*Heterobothrium okamotoi*, ectoparásito de los filamentos branquiales del botete tigre, provoca lesiones inflamatorias en la cavidad branquial que dan lugar a la necrosis del área infectada impidiendo el intercambio respiratorio, y ocasionando la asfixia y muerte de los peces (Ogawa, 1996). Además, estos parásitos son hematófagos y disminuyen los valores del hematocrito y hemoglobina provocando anemia en los peces (Ogawa e Inouye, 1997).

En México, los monogeneos de esta familia están representados por varias especies, siendo una de ellas *Heterobothrium ecuadori* (Meserve, 1938) Sproston, 1946; la cual representa un peligro potencial en la acuicultura del botete diana (Fajer-Ávila *et al.*, 2003). Fajer y Chávez (1999) describieron hiperplasia de las lamelas branquiales y lesiones inflamatorias asociadas a la presencia de *Heterobothrium ecuadori* en *Sphoeroides annulatus* en cautiverio.

Los estudios sobre la biología de monogeneos del género *Heterobothrium* han contribuido a la posible regulación del ciclo de vida de estos parásitos, en el sistema del cultivo de botete tigre (Ogawa, 1998). Sin embargo, considerando la dificultad que representa el conocer los ciclos de vida de los parásitos en condiciones naturales, se ha evidenciado la necesidad de implementar técnicas en laboratorio que incluyen los cultivos *in vitro* de los parásitos. Para esto, se requiere de la simulación de las condiciones biológicas que presenta el hospedero, que permita el mantenimiento y crecimiento de los parásitos fuera del mismo (Chappell, 1980). La reproducción experimental de los ciclos de vida de los monogeneos que afectan a los peces de cultivo, permite determinar el periodo de vida y las características de los diferentes estadios de desarrollo del parásito apoyando el diseño de estrategias para su control.

En el presente trabajo, se describe por primera vez el desarrollo embrionario de *Heterobothrium ecuadori* y las características morfológicas de los estadios de vida desde la fase larvaria hasta las fases juveniles; así como el efecto de diferentes salinidades sobre la eclosión de los huevos y supervivencia del estadio larval (oncomiracidio). También se determina el periodo de desarrollo de cada estadio juvenil hasta alcanzar el estadio adulto y completar el ciclo de vida de este parásito.

El conocimiento del ciclo de vida de *Heterobothrium ecuadori*, ectoparásito branquial del botete diana, aportará las bases para evaluar a nivel experimental la efectividad de tratamientos profilácticos y terapéuticos para el control de los diferentes estadios de vida este monogeneo branquial.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades sobre Monogeneos

Los monogeneos son platelmintos muy frecuentes en la piel y en las branquias de peces marinos y de agua dulce. Unas especies viven como endoparásitas en anfibios y quelonios, y algunas otras son ectoparásitas en crustáceos y cefalópodos (Lamothe-Argumedo, 1983).

En los peces están descritas alrededor de 4, 000 especies de monogeneos (Whittington, 1998) la mayoría de las cuales son muy específicas al hospedero en el medio natural. Por vivir en las branquias, los monogeneos responden a cambios del medio ambiente y son utilizados como bioindicadores (Cheng, 1978; Gardner y Campbell, 1992).

Los monogeneos son organismos con un ciclo de vida directo, es decir, que no requieren de hospederos intermediarios (Fig. 1 y 2). Son hermafroditas y se diferencian de los digeneos por presentar el extremo posterior del cuerpo modificado en un órgano de fijación característico que recibe el nombre de haptor posterior (anteriormente llamado opistohaptor), generalmente armado con espinas, ganchos, ventosas o pinzas (Lamothe-Argumedo, 1983). Los

monogeneos tienen dos tipos de huevos: los huevos fusiformes producidos por los poliopistocotileos y la forma tetraédrica en monopistocotileos (Kearn, 1963).

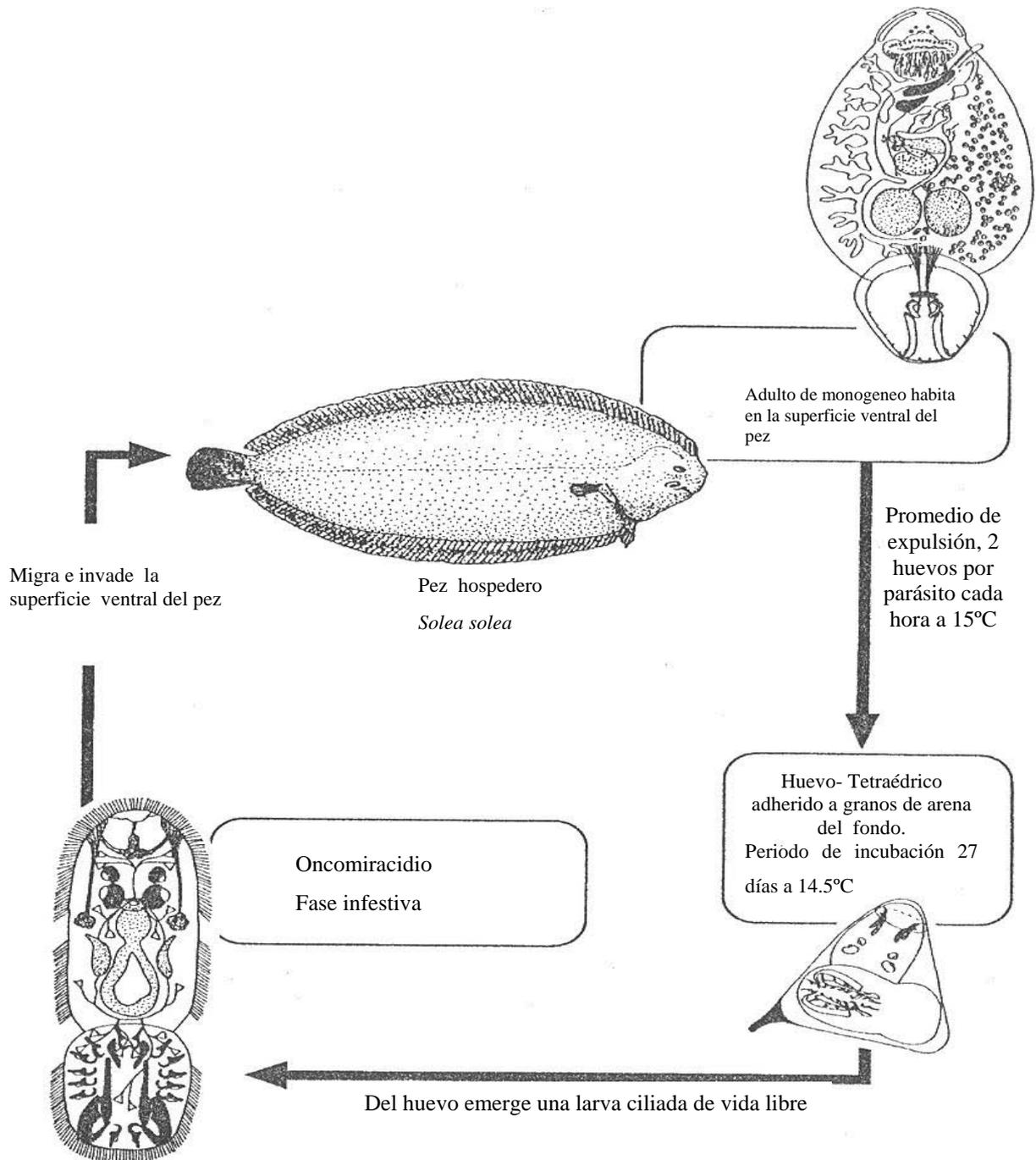


Fig. 1 Ciclo de vida del monogeneo *Entobdella solea* (modificado de MacKenzie *et al.*,1995).

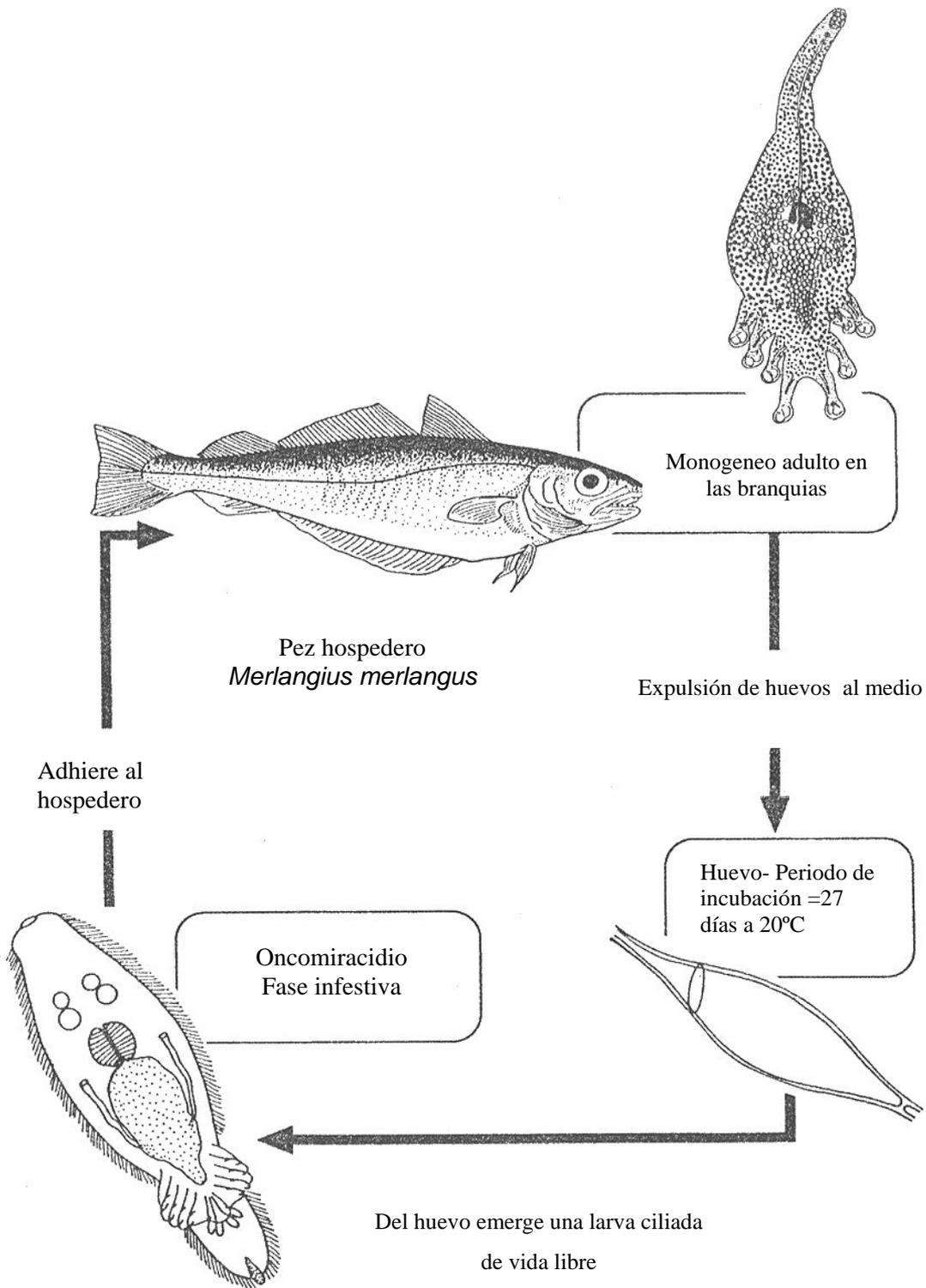


Fig. 2 El ciclo de vida del monogeneo *Diclidophora merlangi*. (modificado de MacKenzie *et al.*, 1995).

Los monogeneos miden entre 0.5 a 6 mm de largo y excepcionalmente llegan a medir hasta 30 mm, pero no exceden de esa longitud (Lamothe-Argumedo, 1983). Los huevos de los monogeneos, en contraste con muchos huevos de digeneos y céstodos, suelen presentar un filamento y extensiones como productos de la cápsula. Bychowsky (1957) propone el término de “filamento” para diferenciar la parte distal (anterior) y proximal (posterior) de acuerdo a su posición al pasar por el útero (Kearn, 1963); sin embargo, este autor refiere que esta terminología es de difícil uso en formas tetraédricas, denominándolas “apéndices”.

De acuerdo con Whittington y Ernst (2002), los huevos de los monogeneos miden entre 80 y 400  $\mu\text{m}$ , los cuales son vertidos y dispersados en las corrientes de agua, desarrollándose a los pocos días; de donde emerge una larva ciliada llamada oncomiracidio; que es el estadio larval de vida libre y fase infectiva de los monogeneos. El oncomiracidio mide entre 100-400 $\mu\text{m}$  y se adhiere por sí mismo en el hospedero, el tiempo de vida larval no es superior a 24h en sistemas de cultivo

Los oncomiracidios presentan un patrón de ciliatura epidérmica a lo largo del cuerpo que le ayuda a la locomoción. La ciliatura está distribuida en tres zonas principales, aunque hay larvas que presentan una distribución continua

de los cilios (Llewellyn, 1963; Whittington and Ernst, 2002). Los oncomiracidios presentan

en la zona posterior un cono que protege la parte posterior del haptor y se le ha denominado “cono ciliado posterior” que también se desprende cuando el oncomiracidio se ha fijado al hospedero (piel o branquias) y pierde su revestimiento ciliado, posteriormente crece hasta desarrollarse en adulto. Además de este cono, es frecuente observar en los monogeneos Diclidofóridos una secreción glandular en el haptor, pero esta glándula por sí misma no ha sido localizada. Actualmente se conocen los detalles del patrón de ciliatura de 11 especies de monogeneos que representan un grupo taxonómico amplio(Llewellyn, 1963).

En el haptor posterior del oncomiracidio se encuentran los ganchos marginales que presentan diversas formas. Cada gancho tiene un mango o puño, una hoja curvada que termina en una punta, una guarda que es la parte proximal y se proyecta mas allá de la hoja; y en algunos casos se aprecia una ogiva o domo, consistente en un hueco en el cual descansa la hoja. En algunas especies de monogeneos los ganchos persisten en el estadio larval y durante el transcurso de la vida adulta (*Entodbella soleae*) o desaparecen (*Diclidophora merlangi*) (Llewellyn, 1963). Los ganchos larvales en algunos monogeneos comienzan a modificarse en la forma durante el post desarrollo del

oncomiracidio. En muchos monogeneos los hamuli (ganchos de mayor tamaño) constituyen el principal aparato de adhesión en el adulto (Llewellyn, 1963).

La ubicación taxonómica de los monogeneos ha sido muy polémica; inicialmente se incluían como una subclase dentro de la Clase Trematoda, Phylum Platyhelminthes, de acuerdo con Yamaguti (1963). En el presente estudio se asume la existencia de una clase independiente, la Clase Monogenea (van Beneden, 1858) con dos subclases: Monopistocotylea y Polyopistocotylea (Bychowsky, 1957).

Subclase Monopistocotylea: Monogeneos cuyo haptor posterior es un órgano sencillo, armado con ganchos y de tamaño variable; en forma de disco terminal ventral y rara vez pedunculado, con o sin septos que forman una sola unidad. Posee uno o más pares de macro ganchos y un número variable de micro ganchos. Carece de canal genito-intestinal. Son parásitos de peces, principalmente. Está compuesta por seis órdenes: Capsaloidea, Dactylogyroidea, Gyrocotyloidea, Acanthocotyloidea, Protogyrodactyloidea y Udonelloidea.

Subclase Polyopistocotylea: Monogeneos con haptor posterior complejo, con una serie de pequeñas ventosas musculares o pinzas sostenidas por escleritas cuniculares (Cheng, 1978; Lamothe-Argumedo, 1983). El haptor

larvario está retenido en el adulto, reducido a pinzas o ventosas, con  
macroganchos y un

número variable de micro ganchos. Poseen canal genito-intestinal. Son parásitos de peces, anfibios y reptiles. Está compuesta por cuatro órdenes: Polystomatoidea, Chimaericoloidea, Diclidophoroidea y Dicybothrioidea.

Los Monopistocotylea se alimentan de células epiteliales y los Polyopistocotylea se alimentan de sangre de las branquias. Este último modo de nutrición resulta irritante, causa enrojecimiento y excesiva producción de mucus, hiperplasia epitelial o hemorragias en las zonas afectadas, la hipersecreción de mucus en los hospederos parasitados produce sofocación o asfixia del pez. Las heridas producidas en branquias, piel y otros sitios son lugares en donde puede haber infecciones secundarias producidas por hongos, virus y bacterias patógenas

(Lamothe-Argumedo, 1983). En infestaciones intensas se puede producir la muerte de los peces más pequeños (Cheng, 1978).

## **2.2. Monogeneos causantes de infestaciones en peces de cultivo.**

Los monogeneos del género *Heterobothrium* Cerfontaine 1845 sinónimo del género *Tagia* (Bykhovski *et al.*, 1976), pertenecen a la familia Diclidophoridae. Estos monogeneos están asociados con peces Tetraodóntidos; y se han

registrado en aguas marinas de Japón y sur de China (Goto, 1894; Yamaguti, 1958; Bychowsky *et al.*, 1976; Ogawa, 1991); en Sudamérica (Meserve 1938; Caballero *et al.*, 1953), Australia (Williams, 1986; Williams y Lethbridge, 1990; Whittington and Ernst, 1986, 2002) y en agua dulce en África (Euzet y Birgi, 1975).

Muchos monogeneos de la familia Diclidophoridae han sido responsables de considerables pérdidas económicas en pesquerías o cultivo de peces. En los años 1950 y 1960's la producción de botete tigre sufrió un decremento a causa de la infestación por *Heterobothrium okamotoi*, que ocasionó la mayor mortalidad en esta especie de pez (Ogawa, 2002).

Ogawa (1991) proporcionó una revisión taxonómica de las especies del género *Heterobothrium* colectadas de varias especies de "puffers" en el Japón, incluyendo la redescipción de *H. tetradonis* y la descripción de nuevas especies como *H. okamotoi*. Las especies de *Heterobothrium* tienen alta especificidad hospedatoria como *H. okamotoi* que ha sido registrado sólo en botete tigre.

Otro ejemplo de pez marino afectado por monogeneos Diclidofóridos es el lenguado *Paralichthys olivaceus*, considerado como uno de los peces de

mayor importancia en Japón; su captura ascendió a 7215 tons en 1999 y en la actualidad su cultivo se ha extendido ampliamente. La cavidad bucal de este pez es

parasitada por *Neoheterobothrium hirame*, el cual causa anemia entre la población de juveniles y ha sido responsable de altas mortalidades (Ogawa, 2002). El daño que provoca *Neoheterobothrium* a otras especies de *Paralichthys* son mencionadas por Ogawa (2002), quien sugiere que *Neoheterobothrium* es un parásito con alta especificidad para peces lenguados del género *Paralichthys*.

Los daños que han causado los monogeneos a peces tetraodóntidos son múltiples, destacándose los parásitos de la familia Ancyrocephalidae cuyo género *Haliotrema sp.* afecta al botete *Takifugu niphobles* en el Japón (Klassen, 1993).

Bondad-Reantaso *et al.* (1995) registraron por primera vez a *Neobenedenia girellae* Hargis, 1955, de la familia Capsalidae, afectando a más de 5 familias de peces marinos cultivados en varias localidades del suroeste de Japón. Ogawa (1996) menciona que *Neobenedenia girellae* observado en el botete tigre se caracteriza por su baja especificidad al hospedero, a diferencia de la mayoría de los monogeneos; la infección por este parásito constituyó un problema grave en las áreas subtropicales del Japón.

Otros capsálidos como: *Benedenia seriolae*, *Heteraxine heterocerca* y *Zeuxapta seriolae*, afectan a peces en cultivo como el pez cola amarilla (*Seriola*

sp.), pez rey de cola amarilla “amberjack” (*Seriola* sp.); habitantes de los mares del Japón, el Mediterráneo y Australia (Whittington *et al.*, 2002). *Neobenedenia melleni* afecta al pez cola amarilla del Japón, a la tilapia (*Oreochromis* sp.) en Hawai, barramundi (*Lates* sp.) en Australia y a los “groupers” (*Epinephelus* sp.) en el sureste de Asia.

Whittington *et al.* (2002) refiere el daño ocasionado por los monogeneos capsálidos a la industria del “jurel” *Seriola quinqueradiata* y *S. dumerili* entre otras especies, las cuales son el principal recurso utilizado para la elaboración de sushi y sashimi, ampliamente conocidos en el mercado. Dichas especies han sido cultivadas en el Japón desde 1960 con una producción anual de 150 000 tons. donde las estimaciones del daño causado por los parásitos ascienden al 22% de la pérdida total. Esta industria está valuada en 1.2 US billones anuales, de acuerdo con la FAO.

### **2.3 Estudios sobre parásitos de peces marinos tetraodóntidos en México.**

En México, los primeros resultados sobre parásitos del botete diana se refieren a la descripción de dos monogeneos: *Tagia ecuadori*, hallado en branquias de *Sphoeroides annulatus* de la zona del canal de Panamá (Caballero *et al.* 1953) y *Neobenedenia melleni*, con hospedero incierto (Whittington y Horton,

1996). Lamothe-Argumedo (1967) redescubre a *Tagia ecuadori* (Meserve, 1938) Sproston, 1946 parásito branquial del pez marino *Cheilichthys annulatus* (Jenyns) colectado en el estado de Oaxaca en el Pacífico mexicano. Existen otros registros de *Tagia ecuadori* en Mazatlán, Sinaloa y la Paz, Baja California Sur, estos datos se encuentran en el Listado Faunístico de la Bahía de Chamela, Jalisco (Pérez-Ponce de León *et al.*, 1999).

En el botete diana, *Sphoeroides annulatus* en el Pacífico mexicano, se ha registrado la presencia de 22 especies de parásitos; entre los cuales los protozoarios, monogeneos y copépodos calígidos ocasionaron los mayores daños en estos peces en cultivo (Fajer y Chávez, 1999; Moravec y Fajer-Ávila, 2000; Ho *et al.*, 2001; Dykova *et al.*, 2002; Fajer-Ávila *et al.*, 2003 y Fajer-Avila *et al.*, 2004). Los monogeneos encontrados fueron *Heterobothrium ecuadori* localizado en branquias y *Neobenedenia melleni* (MacCallum, 1927) encontrado en la piel.

Otras investigaciones realizadas, describen los cambios histopatológicos ocasionados por *Heterobothrium ecuadori* en las laminillas branquiales de *Sphoeroides annulatus* silvestres infectados, y la evaluación experimental de antihelmínticos como la formalina y la esencia de hierbabuena en el control de este ectoparásito (Contreras, 2001; Fajer *et al.* 2002). También se determinaron los patrones de ocurrencia de los helmintos de *S. annulatus* silvestres, procedentes del Estero de Teacapán y Playa Norte en Mazatlán, Sinaloa, México. La determinación de los análisis de riesgo relativo a la presencia de estos parásitos, revelaron que las temperaturas de 23-24.5°C parecen favorecer la presencia de *H. ecuadori*, alcanzando prevalencias hasta de 67% (Fajer *et al.*, 2004).

#### **2.4 Cultivo *in vitro* y ciclos de vida de monogeneos.**

Las aportaciones más sobresalientes sobre las características de los huevos y desarrollo larval de monogeneos se encuentran en las recopilaciones elaboradas por Llewellyn (1963), Kearns (1986) y Whittington *et al.* (2000).

Lo referente al cultivo *in vitro* de monogeneos, la descripción del huevo, desarrollo larval y oncomiracidio de *Entobdella soleae* (van Beden & Hesse, 1863) Johnston, 1929, monogeneo parásito de la piel del pez *Solea solea* se resume en los trabajos de Kearns (1963).

Kearn (1967) estudió el ciclo de vida y desarrollo larval de algunos acantocotílicos parásitos de rayas, describió el desarrollo larval de *Merizocotyle* sp., monocotílicido parásito de la fosa nasal de la raya *Raia undulata* (Kearn, 1968).

Detalló además el oncomiracidio de *Dictyocotyle coeliaca* Nybelin, 1941 y *Calicotyle kroyeri* Diesing, 1850 parásito de *Raia naevus* (Kearn, 1970).

Hanson (1973) describió el ciclo de vida de *Diclidophora* sp. cuyos huevos requirieron 32 días para eclosionar a 12.5°C y 30.9 ‰ de salinidad; y el oncomiracidio sobrevivió 36 h fuera del hospedero. Macdonald (1977) realizó una descripción detallada de los oncomiracidios de tres especies de monogeneos pertenecientes a la familia Diclidophoridae: *Diclidophora merlangi*, *D. luscae* y *D. denticulada* y determinó el periodo de eclosión de cada especie a 13°C: *D. merlangi* (30-34 días); *D. luscae* (32-36 días) y *D. denticulada* (20-22 días).

Williams y Lethbridge (1990) definieron cuatro estadios del ciclo de vida de dos especies de *Heterobothrium*: *H. torquigeneri* y *H. elongatum*. Asimismo, refirieron el desarrollo, modo de penetración y preferencias por un hábitat branquial particular de *Heterobothrium elongatum* extraído de branquias del “pufferfish blowfish”, *Torquigener pleurogramma*. Estos autores encontraron

que la eclosión de huevos se desarrolló entre los 8 -9 días, la infestación experimental se llevó a cabo con una recuperación de cinco juveniles y dos gusanos inmaduros entre los 9 y 22 días posteriores a la infestación; y siete adultos, algunos con huevos en el útero entre los días 30 y 31.

Mueller *et al.* (1992) evaluaron el efecto de la salinidad en el desarrollo embrionario y eclosión de *Neobenedenia melleni*, monogeneo de la familia Capsalidae, ectoparásito de la tilapia roja cultivada (*Oreochromis urolepishornorum* x *O. mossambicus*). Este estudio reveló que las exposiciones a 6‰ de salinidad ocasionaron 5.5% de eclosión; 12 ‰ el 11.9% de eclosión y 18‰ el 5.8%, mientras que en agua dulce no hubo eclosión de huevos.

Bondad-Reantaso *et al.* (1995) realizaron trabajos sobre reproducción y crecimiento de monogeneos de la familia Capsalidae (*Neobenedeniagirellae*) parásitos del lenguado *Paralichthys olivaceus* en condiciones de laboratorio y evidenciaron que los huevos de este monogeneo eclosionan a los 5-6 días a 25°C mientras que a los 15°C no se observó eclosión.

Balasuriya y Tak-Seng (1995) evaluaron el efecto de las bajas salinidades en el ciclo de vida *in vitro* de *Pseudorhabdosynochus monosquamodiscusi* monogeneo de la familia Diplectanidae, ectoparásito del “barramundi” cultivado (*Lates calcarifer*), en el cual se observó que los huevos

presentan un intervalo de tolerancia a salinidades entre 10‰ y 40‰, pero registran una alta mortalidad de embriones a salinidades de 5‰ y agua destilada.

Sobre infecciones experimentales de monogeneos parásitos del género *Heterobothrium* se encuentran varios trabajos relacionados a peces tetraodóntidos. En el caso del puffer tigre, *Takifugu rubripes*, Ogawa (1997) describió la cópula de adultos de *Heterobothrium okamotoi* y la producción de huevos; Ogawa e Inouye (1997) describieron el ciclo infectivo de *Heterobothrium okamotoi* por exposición de oncomiracidios que emergieron del huevo entre los 6-10 días a 20°C, se adhieren y crecen en los filamentos branquiales y posteriormente maduran en las paredes de la cavidad branquial a los 49 días post infestación a 21.1°C. Estos autores estimaron la duración del ciclo de vida de este monogeneo en cuatro meses post infestación de oncomiracidios.

Ogawa (1998) describió las características del oncomiracidio de *H. okamotoi* y evaluó el efecto de diferentes salinidades sobre su eclosión y supervivencia y detectó que a bajas salinidades no hubo desarrollo embrionario de huevos; pero sí observó mortalidad gradual de los embriones colocados en

agua destilada. De la misma forma, este autor determinó la capacidad de nado del oncomiracidio hasta los 7 días a 15°C y estimó el promedio de vida larval a los 9.1 días a 15°C, 7.3 días a 20°C y 4.7 días a 25°C.

Yoshinaga *et al.* (2000) describieron que el tiempo promedio de la eclosión en huevos de *Neoheterobothrium hirame* varió con la temperatura. De esta forma, los huevos a 10°C eclosionaron a los 23.8 días; a 15°C a los 12.8 días; a 20°C a los 7.1 días y 25°C a los 5 días; encontrándose que el 85% del total de huevos eclosionaron entre los 10° y 25°C, mientras que a 30°C el intervalo de eclosión fue menor del 5%. Ogawa (2000) describió el oncomiracidio de este monogeneo parásito de la cavidad bucal de peces lenguados *Paralichthys olivaceus*.

### **3. BIOLOGÍA DEL HOSPEDERO**

El botete diana *Sphoeroides annulatus*, es un pez perteneciente a la familia Tetraodontidae, se distribuye desde San Diego, California, inclusive el Golfo de California hasta Pisco Perú y las Islas Galápagos (Fischer, 1995). Posee amplia tolerancia ambiental habitando a lo largo de la costa en estuarios y lagunas costeras (Abdo de la Parra y Duncan, 2002).

Presenta hábitos costeros, es abundante en zonas someras protegidas como bahías, estuarios, lagunas costeras y otras áreas salobres. Es una especie fecunda, se reproduce a fines de primavera en zonas cercanas a la costa; es carnívora que se alimenta de bivalvos, ostiones, almejas y gasterópodos; así como

jaibas, cangrejos y otros crustáceos; también de algunos peces y corales. La piel, gónadas, sobre todo el hígado tienen tetraodontoxina, que se concentra en mayor cantidad en la época de reproducción (Amezcuca, 1996). Los estudios de toxicidad y distribución de tetraodontoxina (TTX) en los tejidos de botete diana (*S. annulatus*) procedente de la costa de la Península Baja California, México, mostraron que *S. annulatus* no contiene esta TTX en el mucus de la piel, ni en el músculo; sin embargo, se ha encontrado en el hígado 22 $\mu$ g/g, intestino 0.42 (g/g, y gónadas 0.46 (g/g. (Nuñez-Vázquez et al. 2000).

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Las investigaciones recientes sobre la biología y cultivo del “botete diana”, en el noroeste del Pacífico mexicano, han mostrado sus potencialidades de cultivo. Sin embargo, una limitante que se está convirtiendo en un obstáculo para el cultivo es la infestación por parásitos de ciclos de vida directos como los monogeneos y los brotes de enfermedades relacionadas con estos parásitos que afectan el crecimiento y ocasionan mortalidades.

El monogeneo *Heterobothrium ecuadori* ha mostrado una alta prevalencia e intensidad de infestación en los juveniles de botete diana en cautiverio que ocasionan daños en los filamentos branquiales que impiden el intercambio respiratorio y causan la muerte de los peces (Fajer *et al.*, 2003).

El conocimiento de la biología y el ciclo de vida de este parásito a nivel experimental en el laboratorio, y la determinación del periodo de duración de la fase infectiva a diferentes salinidades, creará las bases necesarias para la implementación de estrategias de manejo para su control.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general:

Describir el ciclo de vida de *Heterobothrium ecuadori* (Meserve, 1938) Sproston, 1946 (Monogenea: Diclidophoridae) ectoparásito del botete diana, *Spherooides annulatus* (Jenyns, 1843) en condiciones de laboratorio.

### 5.2 Objetivos particulares:

- Diseñar un sistema experimental para la colecta de huevos de *Heterobothrium ecuadori* y su eclosión.
- Describir los diferentes estadios del desarrollo embrionario de *Heterobothrium ecuadori* desde huevo hasta oncomiracidio, y determinar la morfometría de las diferentes estructuras.
- Determinar *in vitro* el tiempo y porcentaje de eclosión de los huevos así como el periodo de vida del estadio larval (oncomiracidio) de *Heterobothrium ecuadori* a diferentes salinidades.

- Realizar infecciones experimentales con el estadio infectivo, en juveniles de cultivo de botete diana libres de estos monogeneos, para obtener juveniles de *H. ecuadori* y cerrar el ciclo de vida de este parásito.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Colecta del material biológico y sistema experimental para la detección de hospederos con *H. ecuadori*.

Durante el periodo febrero-junio 2003 se capturaron mensualmente 15 adultos de botete diana procedentes de Mazatlán, Sinaloa (23°10'36''N 106°25'35''W) y Teacapán, Sinaloa (22°35'N 105°45'23''W), los cuales fueron trasladados en bolsas de plástico con oxígeno hacia el área de bioensayos del laboratorio de Parasitología del CIAD-Unidad Mazatlán. Los peces capturados se colocaron individualmente en tanques de fibra de vidrio de 500 l con aireación continua (2.5 HP air blower Gast IMX model R4110-2 USA) y en la fuente de suministro de agua de mar se colocó un filtro elaborado con una malla de 100µm y de 50 µm para retener las partículas de mayor diámetro, evitar la entrada de vectores y otros huevos de monogeneos al interior del tanque. En el extremo de la manguera donde se sujeta la piedra aireadora de cada tanque se amarraron hilos de nylon de color blanco, con la finalidad de

detectar la presencia de huevos del monogeneo *H. ecuadori*. Se separaron los peces parasitados de los no

parasitados, con el propósito de tener un mejor control de los organismos examinados.

Durante la fase experimental se tomaron precauciones de limpieza y se usó agua dulce para desinfectar a cada estanque entre el examen de cada pez. Se midió la temperatura (T°C) y la salinidad (‰) diariamente con un refractómetro Fisher 0-100±1 y un termómetro Brannan 0-400 ± 1°C, respectivamente. A lo largo de todo el experimento se mantuvo la circulación de agua de mar las 24h, aireación constante y fotoperiodo de 12 horas luz - 12 horas oscuridad.

Los hilos, una vez extraídos del tanque, se colocaban en cajas Petri de 10 x 1 cm con agua de mar filtrada, esterilizada con luz UV (35‰ de salinidad), y se observaron con la ayuda de un microscopio estereoscopio (LEICA MZ9.5) a diversos aumentos en busca de huevos de *H. ecuadori*. Estas cajas Petri se mantuvieron a la temperatura del laboratorio 23±1°C en invierno y 27±1°C en verano. Esta rutina se realizó continuamente para asegurar la obtención de huevos y larvas vivas, infectar otros peces, ser teñidas y fijadas, y realizar los dibujos correspondientes.

## 6.2 Técnicas para la obtención de huevos de *H. ecuadori*

### a) Aislamiento e incubación de huevos obtenidos directamente del adulto de *H. ecuadori*

Para obtener huevos directamente del parásito adulto se anestesiaron alrededor de 10 botetes diana con 0.75ml/L de 2-phenoxyetanol durante 2 minutos, se disectaron los arcos branquiales y se colocaron individualmente en cajas Petri con agua de mar esterilizada a 35‰. De los arcos branquiales se seleccionaron 5 especímenes adultos de *H. ecuadori* sexualmente maduros (vitelógenas totalmente desarrolladas, definido como el estadio VI, de acuerdo a Ogawa e Inouye, 1997) los cuales fueron colocados individualmente en cajas Petri con agua de mar. A cada adulto se le estimuló la parte ventral con la ayuda de un pincel para lograr la expulsión de huevos al medio, de acuerdo a la metodología de Ogawa (1997).

Los huevos recién expulsados se dejaron en la caja Petri y se incubaron a la temperatura del laboratorio ( $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ).

## **b) Aislamiento e incubación de huevos de *H. ecuadori* depositados en los hilos colectores**

Se acondicionó un estanque de 500 l limpio y lavado con agua dulce; en el tubo de suministro de agua de mar se colocó un filtro elaborado con una malla de 100µm para retener las partículas de mayor diámetro y de 50 µm para evitar la entrada de huevos de otros monogéneos al interior del tanque (basados en las mediciones previas del huevo). Se instaló la aireación de forma continua, se colocó en este tanque un botete parasitado con *H. ecuadori* y al mismo tiempo se amarraron hilos de nylon en la manguera del aireador durante una hora, con la finalidad de asegurar la colecta solamente de huevos puestos en ese lapso de tiempo.

### **6.3 Descripción del desarrollo embrionario de huevo a oncomiracidio.**

#### **a) Desarrollo embrionario del huevo**

Para la colecta de huevos, se utilizó la técnica descrita en el punto 6.2 (b), los hilos con huevos se colocaron en cajas Petri con agua de mar esterilizada a 35‰, se tomaron varios huevos y se observaron diariamente desde el inicio de la incubación hasta que completaran su desarrollo a temperatura del laboratorio

23±1°C en invierno y 27°C±1°C en el verano. Con base a las observaciones realizadas al microscopio óptico, se describieron los cambios en el interior del huevo, donde se observó la forma, tamaño, coloración y estructura de los huevos embrionados. Los cambios fueron registrados mediante dibujos realizados bajo el microscopio compuesto Leica DMLB 10, equipado con una cámara clara a los aumentos de 100X y 400X, de acuerdo al tamaño de las estructuras de interés. Como complemento, mediante una cámara de video de alta resolución (Sony CCD Iris) conectada al programa Pixel View instalado a una computadora personal (Dell 4100) se captaron imágenes *in vivo* que confirmaron el desarrollo embrionario, los cambios en el huevo se registraron mediante fotografías cada 24 h. Se midió la longitud y el ancho de 30 huevos, se determinó la media y la desviación estándar (DS) y los valores se expresaron en micrómetros (µm).

#### **b) Oncomiracidio *in vivo***

Los oncomiracidios recién eclosionados fueron transferidos con una pipeta Pasteur a un porta objetos con una gota de agua de mar, con la finalidad de observarlos *in vivo*. Se les colocó una gota de rojo neutro 0.05% para evidenciar las estructuras internas (Lázaro-Chávez, 1984) y para evitar la

deseccación, se les adicionó agua de mar con un gotero. Es importante mantener vivas las larvas, ya

que después de morir, algunas estructuras como las células flama, no pueden ser vistas y ubicadas.

Para la descripción morfológica, las larvas se dibujaron *in vivo* bajo el microscopio compuesto a 1000X con el contraste de fases y se capturaron imágenes *in vivo*. La fijación de oncomiracidios se realizó colocando algunas larvas en una caja Petri con una pipeta Pasteur, posteriormente se agregó formol caliente al 4%. Una vez fijados los organismos, se midieron los caracteres de valor taxonómico sugeridos en los trabajos de Macdonald (1977) y Ogawa (1998, 2000); así mismo, se midieron los ganchos en los que se consideró el largo del gancho (punta del mango a la base de la hoja) (Klassen y Beverley-Burton, 1995); el largo del mango, y apertura de la curvatura de la hoja. Se determinó la media y la desviación estándar (DS) de cada uno de los caracteres medidos para 30 ejemplares, los cuales están expresados en micrómetros ( $\mu\text{m}$ ).

## **6.4 Porcentaje de eclosión y periodo de vida del oncomiracidio a diferentes salinidades.**

### **a) Porcentaje de eclosión**

En el área de Bioensayos de Parasitología del CIAD Mazatlán, donde se encontraban los tanques con botetes parasitados, se acondicionó un tanque, como se describe en el punto 6.2 (b), con la diferencia que esta vez se amarraron 8 hilos de nylon a 2 tubos de PVC sumergidos en el agua durante una hora. Posteriormente se cortaron los hilos a manera que contuviera 10 huevos y se colocaron en cajas Petri etiquetadas con agua de mar filtrada y esterilizada a las diferentes salinidades: Estas fueron a partir del 100% (testigo 35 ‰) se diluyó con agua destilada para obtener: 80% (28‰), 60% (21‰), 40% (14‰), 20% (7‰), 0% (agua destilada) (Ogawa, 1998). Se realizaron 5 réplicas por cada salinidad (n=50 huevos) y se incubaron a temperatura del laboratorio  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$  en invierno. Se realizaron observaciones cada 24 h con el estereomicroscopio (LEICA MZ 9.5) y se determinó el porcentaje de eclosión, de acuerdo al número de cápsulas vacías de los huevos incubados.

### **b) Mortalidad y periodo de vida del oncomiracidio a diferentes salinidades.**

Para llevar a cabo este experimento se colocaron en diferentes cajas Petri de 10 x 1 cm, 5 oncomiracidios con unas gotas de agua de mar esterilizada en

cada una. A continuación se les agregó 10ml de agua con las salinidades mencionadas en el inciso anterior. Se realizaron cuatro réplicas por salinidad. La movilidad de los oncomiracidios fue observada bajo el estereomicroscopio, cada 15 minutos durante la primera hora; cada 2, 4, 8, 12, 14, 24, 33 y 48 horas y cada 24h hasta su muerte, la temperatura registrada fue de  $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ . El criterio de supervivencia fue: viva, nada activamente y responde a estímulos como la agitación de la caja Petri y muerta, ausencia de respuesta a un estímulo mecánico por agitación, hasta alcanzar el 100% de mortalidad. También se observó la movilidad de la larva de acuerdo con el criterio de Ogawa (1998): se desplaza, no se desplaza, arrastramiento y estado latente (movimientos ciliares y contracciones musculares).

## **6.5 Infecciones experimentales.**

### **a) Condiciones de infestación: Desparasitación de peces**

Para hacer la infestación experimental, se aseguró que los juveniles de botete en cautiverio que se emplearan en la infestación estuvieran libres de parásitos, para ello se requirió de un protocolo de desparasitación que se adaptara a las necesidades de este estudio.

El primer experimento consistió en verificar la presencia del parásito por medio de los hilos colectores, los peces parasitados por *H. ecuadori* fueron sumergidos en una solución de 0.17ml/l de formalina por una hora (Fajer *et al.*, 2003), posteriormente éstos se colocaron en acuarios con 20 l (volumen útil de 15 l) de agua de mar filtrada con una malla de 50 µm y con aireación continua, sin circulación de agua y se les colocó dentro del acuario un hilo colector en busca de huevos de *H. ecuadori*. Este procedimiento se repitió cada 24h durante 3 días; pero no se logró el 100% de efecto esperado (eliminar al parásito adulto).

El segundo experimento consistió en el empleo del praziquantel registrado como efectivo ya sea administrado en baños, o por vía oral (Hirazawa *et al.*, 2000; Hong-Kim y Bum-Cho, 2000). Debido a la imposibilidad de adquirir este compuesto como sustancia activa, se usó un producto comercial (pastillas antihelmínticas para perros) de la marca "Drontal" (Bayer) que contienen 50 mg de praziquantel, 150mg de pamoato de pirantel y 150mg de febendazol por pastilla. Se ensayaron dos vías de aplicación de este compuesto (oral y baños); sin embargo, la que resultó más efectiva y menos estresante para los peces en este trabajo fue la administración por baños, por lo cual se seleccionó para su empleo.

## BAÑOS

Las pastillas de Drontal fueron trituradas y disueltas en 1 l de agua dulce, posteriormente se filtró la solución y se sumergió al pez en ella durante 15 min. Seguido de esto, se le aplicó a cada pez un baño de agua dulce durante 15 min. para eliminar posibles fases infectivas u oncomiracidios (con base a los resultados de este trabajo con agua destilada). Cada pez tratado se colocó individualmente en acuarios con 20l de agua de mar previamente filtrada con una malla de 50  $\mu\text{m}$  y se le colocó aireación constante. Se verificó la ausencia o presencia del parásito por medio de los hilos colectores amarrados al aireador en todos los experimentos.

El agua con la solución antihelmíntica (praziquantel) donde fue sumergido el pez, fue filtrada con una malla de 50  $\mu\text{m}$  para observar bajo al estereomicroscopio posibles fases larvarias.

El hilo colector ubicado en los acuarios con agua limpia, fue revisado diariamente en busca de huevos; al verificar la ausencia de éstos en el hilo, se decidió sacrificar un pez para asegurar que no hubiera parásitos. Una vez confirmado el efecto de estos tratamientos, se desparasitaron 20 peces antes de ser infestados con oncomiracidios, y se colocaron en un tanque de fibra de

vidrio de 500 l con un volumen útil de 100 l y aireación continua. En la toma de agua de

mar con circulación abierta se colocó el mismo tipo de filtro mencionado anteriormente.

#### **b) Obtención de oncomiracidios e infestación artificial.**

Para obtener huevos de *H.ecuadori*, se empleó la técnica de los hilos colectores del apartado 6.2 (b); los huevos se incubaron en las cajas Petri en el laboratorio para la obtención de los oncomiracidios, una vez eclosionados, con la ayuda de una pipeta Pasteur los oncomiracidios se vertieron en una caja Petri con agua de mar esterilizada.

Cada vez que se pretendía exponer a los peces con oncomiracidios, se repetía el mismo procedimiento de desparasitación por medio de baños mencionado en el inciso anterior. Se colocaron 2 peces libres de parásitos por acuario con capacidad de 20 l (volumen útil de 15 l) con agua de mar previamente filtrada, aireación continua, sin circulación de agua; a estos peces se les vertió la caja Petri que contenía alrededor de 50 oncomiracidios recién eclosionados, los cuales se dejaron 24h para asegurar la infestación.

#### **c) Obtención de los diversos estadios juveniles y adultos.**

Una vez expuestos los peces a los oncomiracidios por 24 h se colocaron en tanques de 500 l con agua de mar ubicados en el área de bioensayos, en donde

se registró en el agua una salinidad de 35-36‰ y temperatura de 22-24°C (invierno) y 26-30°C (verano) a lo largo de todo el experimento. Posteriormente, se sacrificaron los peces expuestos cada 5 días hasta encontrar el estadio adulto. Las diferentes fases juveniles fueron fotografiadas, descritas y dibujadas en cámara clara, las medidas están expresadas en micras o micrómetros.

La descripción de los cambios morfológicos de los juveniles de *H. ecuadori* se basó en los criterios de Ogawa e Inouye (1997) los cuales se mencionan a continuación.

Estadio I, organismos con 3 ó menos pares de pinzas o ventosas.

Estadio II, 4 pares de ventosas; sin desarrollo de los órganos reproductores

Estadio III, 4 pares de ventosas con un órgano copulador visible.

Estadio IV, desarrollo de los órganos reproductores masculinos.

Estadio V, ovario visible, sin desarrollo de las vitelógenas.

Estadio VI, adultos.

Los diferentes estadios de *H. ecuadori* fueron colocados entre porta y cubreobjetos, se les adicionó por un extremo del cubreobjetos con una pipeta

Pasteur, picrato de amonio hasta quedar completamente inmersos y fijados. Las preparaciones se colocaron dentro de una caja Petri durante 24 h y se les agregó

más fijador hasta quedar completamente cubiertas, se taparon para evitar la desecación. Posteriormente, los parásitos se desmontaron con un pincel y se transfirieron a una caja Petri con alcohol 70% para eliminar el fijador por 15 min.

Una vez eliminado éste, los organismos fueron teñidos siguiendo las técnicas para el estudio de platelmintos (Anexo).

A partir del día 25, se amarró diariamente un hilo de nylon en el extremo de la manguera del aireador del tanque donde estaban expuestos los peces a los oncomiracidios, con la finalidad de localizar huevos enredados, lo que indicaría la presencia de parásitos maduros o adultos, que fue corroborada posteriormente con el sacrificio de los peces.

## **6.7 Análisis estadísticos**

### **a) Porcentaje de eclosión**

Los datos fueron analizados estadísticamente con el programa de Sigma-Stat versión 3.0 compatible con Windows XP, así como el programa Excel para las tablas y cálculo de datos. Se compararon los resultados del

porcentaje de eclosión acumulado por días, con relación a las salinidades estudiadas, mediante un análisis de varianza de muestras repetidas de dos vías, como lo muestra el

programa de Sigma-Stat Two way repeated measures anova (no paramétrica) y finalmente la prueba de Tukey fue usada para distinguir diferencias significativas entre los valores de las medias.

#### **b) Supervivencia del oncomiracidio**

Mediante el análisis PROBIT (Toxicology Software, versión 1.0,1990) se determinó la concentración letal media ( $LC_{50}$ ) del oncomiracidio de *H. ecuadori* a las salinidades evaluadas en diferentes tiempos de exposición. Este programa es usado en Toxicología para calcular la concentración letal de un tóxico conocido y evaluar las respuestas biológicas de un organismo expuesto. Para ello, los datos requieren ser ingresados a este programa, de acuerdo al siguiente criterio: a mayor concentración de tóxico – mayor mortalidad. Debido a lo anterior, los datos se ingresaron a este programa de forma inversa, pero esto fue considerado para el procesamiento de los datos para su óptimo manejo, éstos se ingresaron tomando en cuenta los 20 organismos (10 organismos por duplicado) para cada una de las salinidades evaluadas.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Diseño experimental para la detección de huevos de *Heterobothrium ecuadori*

Los intentos iniciales de obtención de los huevos de *H. ecuadori* mediante la estimulación mecánica de la región ventral del parásito adulto no produjeron huevos viables; sin embargo, permitieron conocer las características de los huevos de esta especie de monogeneo. Los huevos expelidos fueron ovales, con apéndices unipolares de color amarillo-café (Fig. 3).



Fig.3 Huevos de *Heterobothrium ecuadori*, obtenidos por la técnica de estimulación mecánica, donde se muestran un defecto de su forma oval típica (100X).

En el sistema experimental, compuesto por hilos de nylon de color blanco colocados en los aireadores de los tanques donde se encontraban los

adultos de botete diana silvestres infectados con *H. ecuadori*, se detectaron abundantes

huevos ovales con las características descritas en el párrafo anterior de esta sección que se adhirieron con su filamento a los hilos de nylon, los cuales se agrupaban en forma de cadenas y racimos (Fig. 4). La observación microscópica de estos huevos permitió confirmar su viabilidad.



Fig.4 Filamento unipolar en la región posterior al opérculo del huevo de *Heterobothrium ecuadori* y su distribución en forma de racimo.

## 7.2 Descripción del huevo de *Heterobothrium ecuadori* .

El huevo de *Heterobothrium ecuadori*, previo a su salida del poro genital del parásito adulto vivo, tiene forma oval y es transparente. Poco después de salir del poro genital, la cápsula del huevo sufre un proceso de esclerotización y

obtiene gradualmente un color café amarillento en cuyo interior se observa el embrión

(Fig.5 a y b). La forma oval del huevo de *H. ecuadori* coincide con la forma fusiforme típica descrita para los monogeneos poliopistocotileos como los pertenecientes a la familia Diclidophoridae .

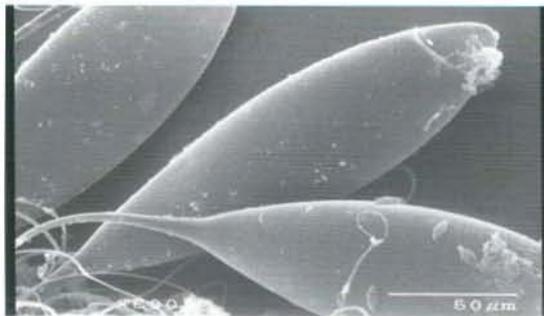


Fig.5 a) Huevo en el interior del cuerpo del adulto de *Heterobothrium ecuadori* antes de ser expulsado(100x) y b) Embrión en el interior del huevo(400x).

El huevo mide  $211.5 \pm 7.4$  de largo y  $74.5 \pm 6.7$  de ancho, es operculado, con una abertura en la parte anterior de la cápsula, por donde emerge la larva al momento de eclosionar. El opérculo mide  $23.37 \pm 1.09$  de alto y  $51.52 \pm 0.59$  de ancho. En la parte opuesta al opérculo se encuentra un largo filamento, que le ayuda a sujetarse a las laminillas branquiales del pez o se enreda con otros huevos formando racimos.

Las fotografías de microscopía electrónica de barrido mostraron la textura lisa del huevo, sin estrías, ornamentaciones o estructuras accesorias (Fig.6).

a)



b)

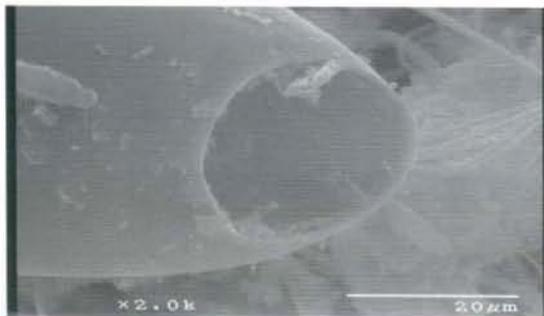


Fig.6 a) Opérculo del huevo y filamento unipolar de *Heterobothrium ecuadori* (Barra 50 μm); b) abertura del huevo (Barra 20 μm)

### 7.3 Desarrollo embrionario

El huevo de *H. ecuadori* es de tipo ectolecito (el embrión se encuentra en la parte central interna de la cápsula del huevo y está rodeado por vitelo) (Fig.7). Las células de vitelo en los huevos recién puestos se pueden apreciar en la superficie

interior de la cápsula, son de varios tamaños, su contorno está bien definido y se disponen alrededor del embrión, que es identificado como una masa en el centro, de apariencia traslúcida y vista en microscopio con contraste de fases, se aprecia como la zona más oscura.



Fig.7 Embrión de *Heterobothrium ecuadori* en el centro del huevo rodeado por células de vitelo posterior a una hora de haber sido colectado del hilo (100x).

En el siguiente dibujo se esquematizan las estructuras internas del huevo de *H. ecuadori*.

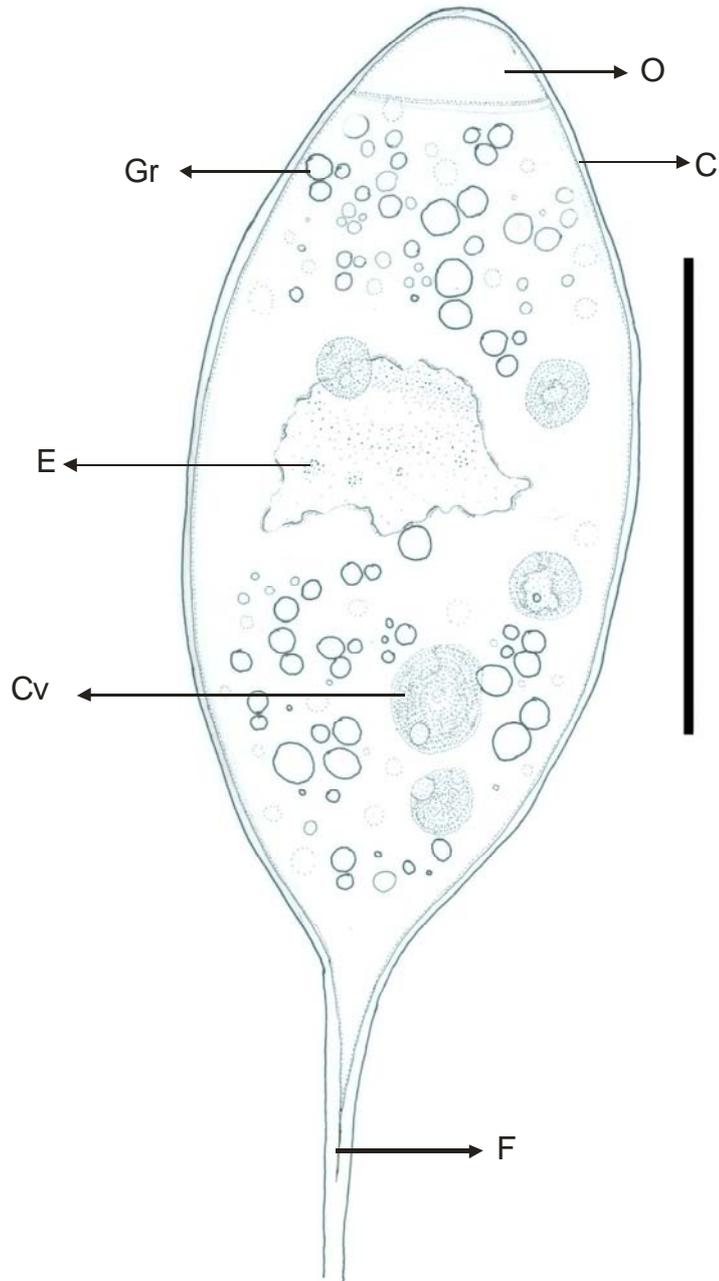


Fig.8 Huevo de *Heterobothrium ecuadori* . (E) Embrión, (O) Opérculo, (C) Cápsula, (Cv) Células de vitelo, (F) Filamento, (Gr) Glóbulos refráctiles. Barra 100  $\mu\text{m}$

A las 24 horas de realizada la ovoposición se observa que la masa celular que formará el embrión, se transforma gradualmente de esferoidal a elipsoidal (Fig.9a). El embrión crece gradualmente y puede distinguirse fácilmente de las células de vitelo por su apariencia traslúcida en el centro del huevo. Este crecimiento se hace más nítido a mayor aumento (Fig.9b )



Fig.9 Huevo embrionado de *Heterobothrium ecuadori* a las 24 horas de incubación a diferentes aumentos a) Masa celular elipsoidal que formará el embrión (100X); b) Apariencia traslúcida del embrión en el centro del huevo(400X).

A las 48 horas el embrión presenta un aumento significativo en su tamaño y continúa su ubicación en la zona central del huevo (Fig.10a). Las células de vitelo se van disolviendo de forma gradual, ya que son utilizadas como alimento, y son desplazadas hacia los extremos (Fig.10b).



Fig.10 a) Incremento de las dimensiones del embrión de *Heterobothrium ecuadori* a las 48 horas de incubación (100X); b) disolución de las células de vitelo y su desplazamiento a los extremos del huevo (400X).

En el siguiente dibujo se esquematizan las estructuras internas del huevo de *H. ecuadori* a las 48 horas (Fig 11).

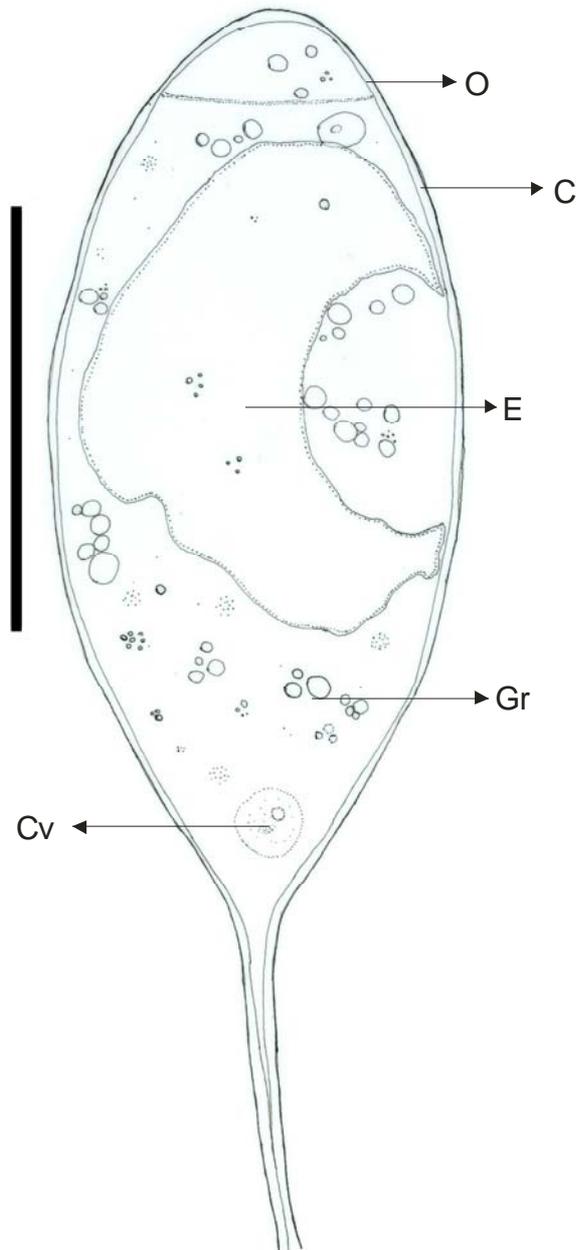


Fig.11 Huevo embrionado de *Heterobothrium ecuadori* a las 48 horas de incubación. (E) Embrión, (O) Opérculo, (C) Cápsula, (Cv) Células de vitelo, (Gr) Glóbulos refráctiles. Barra 100  $\mu\text{m}$

A las 72 horas se observa un incremento notable en la transparencia de la cápsula del huevo debido al consumo de vitelo lo cual facilita la observación del aumento de tamaño (Fig. 12a), contorno de la larva dentro de la cápsula, y los ganchos larvales (Fig.12b).

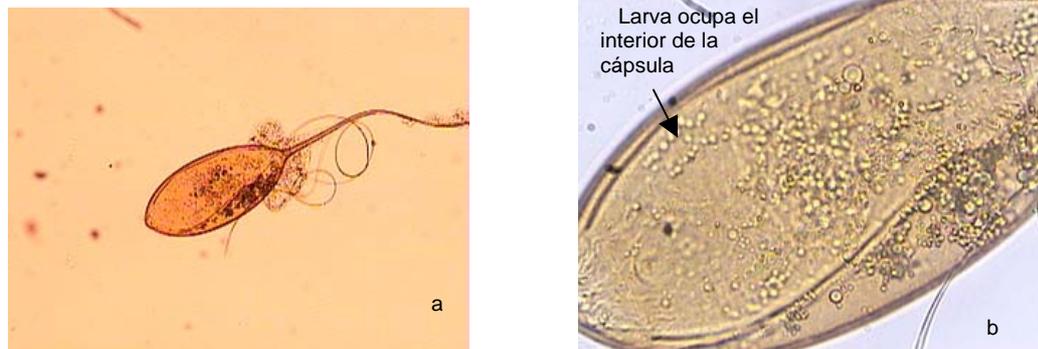


Fig.12 a) Incremento notable en la transparencia de la cápsula del huevo embrionado de *H. ecuadori* a las 72 horas de incubación (100X), b) contorno de la larva dentro de la cápsula del huevo y ganchos larvales visibles (400X).

A las 96 horas el cuerpo de la larva está desarrollado y se nota un contorno bien delimitado(Fig.13 a), en el que se pueden diferenciar los bordes del cuerpo y el haptor, así como movimientos esporádicos de la ciliatura (Fig.13b).

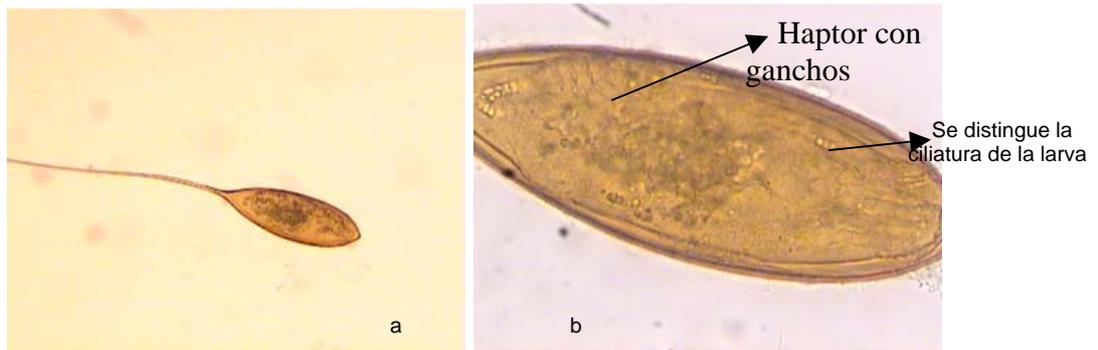


Fig.13. a) Cuerpo de la larva de *Heterobothrium ecuadori* desarrollado en el interior del huevo a las 96 horas de incubación (100X); y b) Bordes del cuerpo, haptor y ciliatura de la larva visibles(400X).

A las 120 horas se destacan la silueta, cilios y haptor de la larva, así como algunas estructuras internas como la faringe, de forma esférica y los conductos de las glándulas adhesivas (Fig.14).

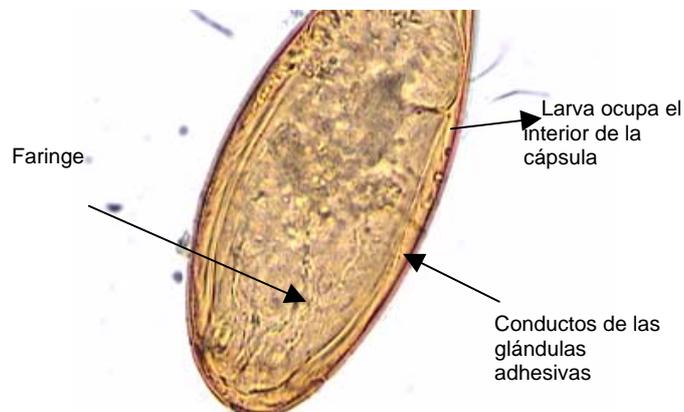


Fig.14 Faringe y haptor con ganchos larvales en el interior del huevo a las 120 horas de incubación (400X).

A las 144 horas la larva está formada en su totalidad; abarca todo el espacio interno dentro de la cápsula (Fig.15a) y aumenta considerablemente los movimientos musculares y de la ciliatura, previo a la eclosión (Fig.15b).

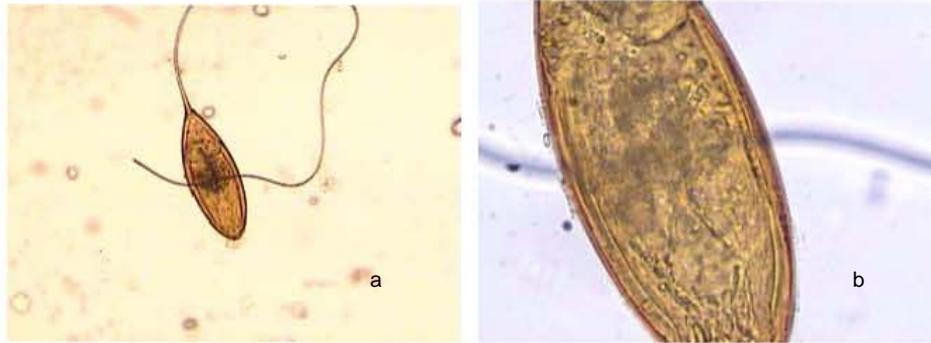


Fig.15 a) Larva de *Heterobothrium ecuadori* completamente formada a las 144 horas (100X); b) Se observan claramente los músculos contraídos previa a su eclosión (400X) .

La eclosión del oncomiracidio se observó en las cápsulas donde las larvas estaban completamente desarrolladas. Se detectaron contracciones, extensiones y rotaciones que aumentaban poco antes de la eclosión. El oncomiracidio, cuya actividad aumenta progresivamente, da giros completos de manera continua, con lo que empuja al opérculo tratando de romper la membrana vitelina.

El periodo de eclosión del oncomiracidio de *Heterobothrium ecuadori* varió entre 7-10 días a  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$  y 35 %. Asimismo, el porcentaje de eclosión por día fue: día 7 (168h)  $20\pm 1.41\%$ , día 8 (192h)  $50\pm 2.73\%$ , día 9 (216h)  $16\pm 2.30\%$ , día 10(240h)  $8\pm 1.09\%$ , (n=50 huevos).

Las observaciones de los huevos maduros de *H. ecuadori* colocados bajo el microscopio óptico revelaron que su luz podía activar la eclosión una vez desarrollada la larva dentro del huevo. Los oncomiracidios, una vez libres, nadan en todas direcciones con movimientos característicos de avance, como extensiones y contracciones. En el proceso de muerte los cilios comienzan a desprenderse y debido a la deshidratación que sufre el cuerpo, se forman vejigas o burbujas.

#### **7.4 Descripción del oncomiracidio: estadio infectivo**

El oncomiracidio tiene un cuerpo aplanado dorsoventralmente, el extremo anterior es redondeado y el posterior presenta una prolongación en forma cónica o de gota. Mide  $156.16 \pm 9.15$  de largo y  $65.06 \pm 7.72$  de ancho. Posee un tegumento delgado, transparente y cubierto de cilios en casi toda su superficie, exceptuando la zona anterior del haptor (Fig.16).

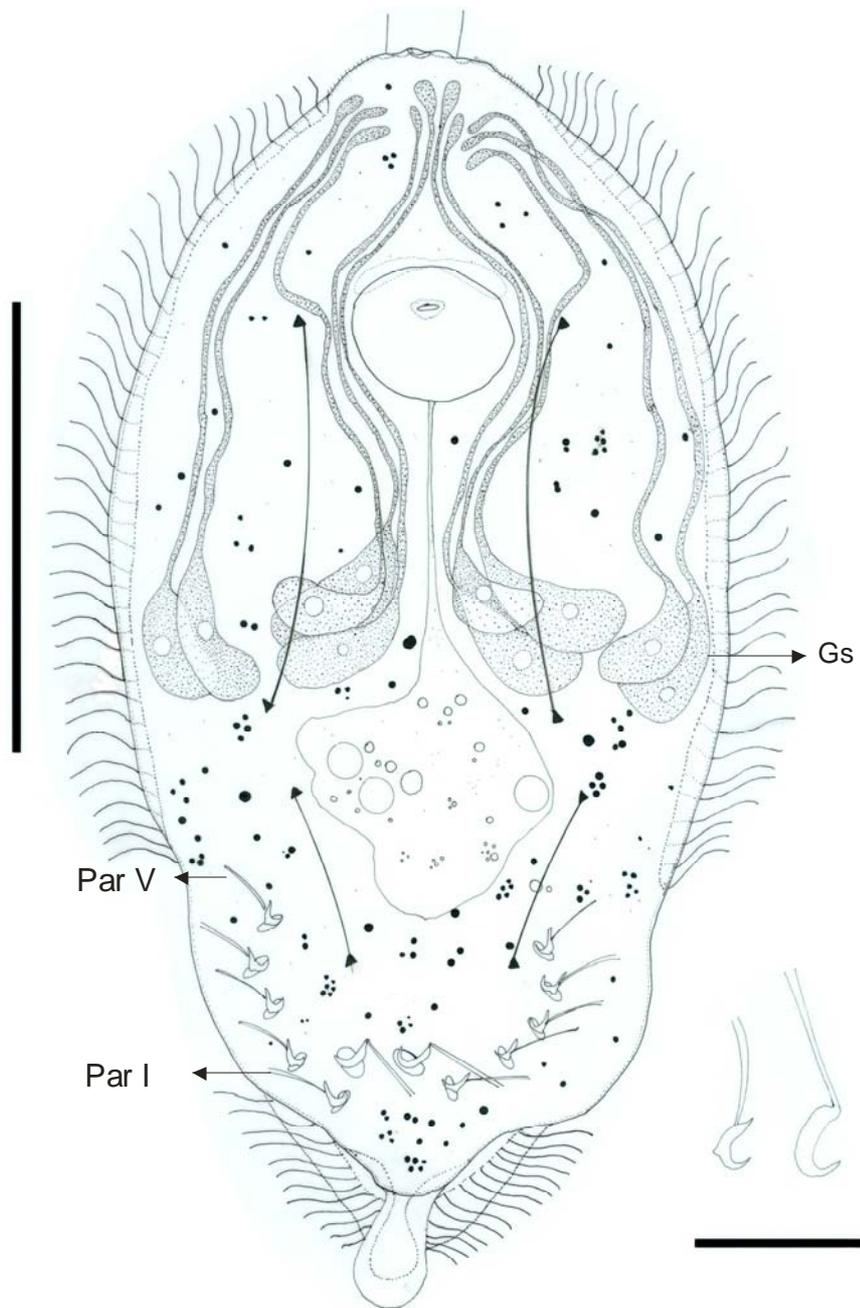


Fig.16 Oncomiracidio de *Heterobothrium ecuadori*. Ganchos larvales y hamuli,

Barra 20  $\mu\text{m}$ ; (Gs) Glándulas secretoras, Barra 100  $\mu\text{m}$ .

No tiene ojos visibles pero se pueden observar dos “pelos o cilios” cuya función es presumiblemente sensorial (Macdonald, 1977), uno de ellos mide  $8.41 \pm 0.48$  y el otro  $7.43 \pm 0.37$ .

El aparato digestivo lo conforma la boca que se abre subterminalmente, la cual se localiza en la región anterior del cuerpo. Esta se continúa hacia una faringe esférica, que mide  $23.34 \pm 1.77$  largo por  $24.75 \pm 1.96$  de ancho. No se observan ventosas orales como en el estadio adulto, pero se aprecia la silueta de lo que podría ser un primordio, por encima de la faringe. El esófago es largo y delgado, el cual se comunica a un saco alimenticio, localizado en la parte anterior del haptor, en el cual se pueden apreciar gránulos esféricos de consistencia lipídica bien definidos y de diversos tamaños que se tiñen bien con rojo neutro.

La larva es capaz de adherirse por el extremo anterior a la caja Petri, por lo que su captura es difícil, se presume de una forma de adhesión en la parte oral. Esto se corroboró con las observaciones de Macdonald (1977), quien describe un sistema de adhesión para tres géneros pertenecientes a la familia Diclidophoridae.

Posee un sistema complejo de células glandulares consistente en cinco células secretoras (adhesivas) localizadas en cada uno de los extremos laterales

del cuerpo, dos de ellas son externas y tres internas, donde uno de los conductos internos coincide con el externo en la zona de la faringe. Cada una de estas células glandulares posee un estrecho y largo conducto que desemboca en la parte oral de la larva que se distribuyen en dos internos y tres externos de cada lado(Figura 16).

El haptor es la zona donde se localizan los ganchos y se encuentra en la parte posterior del cuerpo de la larva. En este caso se localizaron cinco pares de ganchos marginales flexibles, similares en forma, dispuestos lateralmente; y un par de hamuli (ganchos más grandes).

El aparato excretor está representado por cuatro pares de células en flama, demostrado con el empleo de colorantes vitales como el rojo neutro: el primer par fue detectado lateralmente a la faringe que se conecta por un conducto delgado, el segundo par localizado en la zona media del cuerpo, el tercero se encuentra entre la unión del cuerpo y el haptor, el cual se continúa con el cuarto en la zona del haptor, por arriba de los ganchos del par II. Los

conductos o túbulos excretores se ramifican y abren al exterior del cuerpo por los poros excretores cerca del segundo par de células flama.

En la Tabla 1. se muestran las medidas de los caracteres morfológicos del oncomiracidio de *Heterobothrium ecuadori* y su comparación con otros representantes de la familia Diclidophoridae.

Tabla.1 Morfometría comparativa del oncomiracidio de *Heterobothrium ecuadori* con relación a otros representantes de la familia Diclidophoridae.

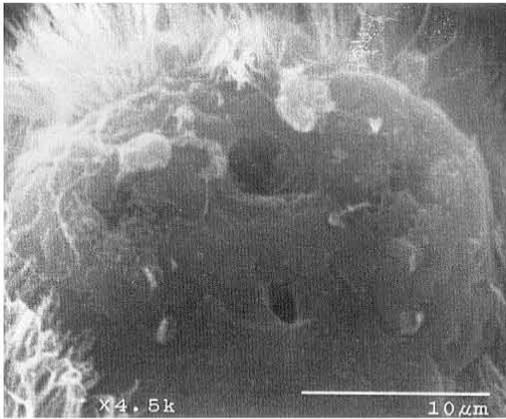
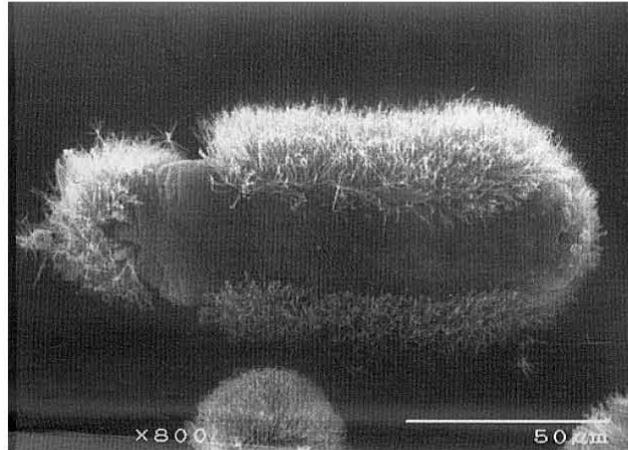
	<i>H. okamotoi</i> (Ogawa,1998)	<i>N. hirame</i> (Ogawa, 2000)	<i>H.ecuadori</i> En este estudio
Largo total	200-300	250-320	156.16±9.15 (140-183)
Ancho total	80-150	90-130	65.06±7.72(51-78)
Faringe			
Largo	25-35	29-40	23.34±1.77 (21-26)
Ancho	no se menciona	26-35	24.75±1.96 (21-27)
Cilios			
Largo	17-20	15	18.46± 0.77 (18-19)
Par I			
Largo total	19-20.5	16-17	18.46± 0.89
mango	-	10-12	12.67± 0.85
curvatura	-	5-6	5.02± 0.47
Par II al IV			
Largo total	18-20	16-17	18.46± 0.89

mango	no se menciona	10-12	12.67± 0.85
curvatura	no se menciona	5-6	5.02± 0.47
<i>Continuación Tabla 1.</i>			
Par V			
Largo total	17-18.5	16-17	18.46± 0.89
mango	no se menciona	10-12	12.67± 0.85
curvatura	no se menciona	5-6	5.02± 0.47
Hamulus			
Largo total	17-19	-	24.89± 0.98
Largo mango	10-11	13-15	15.14± 0.56
curvatura	no se menciona	6-7	6.88± 0.31
Ocelos	No presenta	No presenta	No presenta
No.Glándulas adhesivas	cinco pares	cinco pares	cinco pares
Células flama	cuatro pares	cuatro pares	cuatro pares

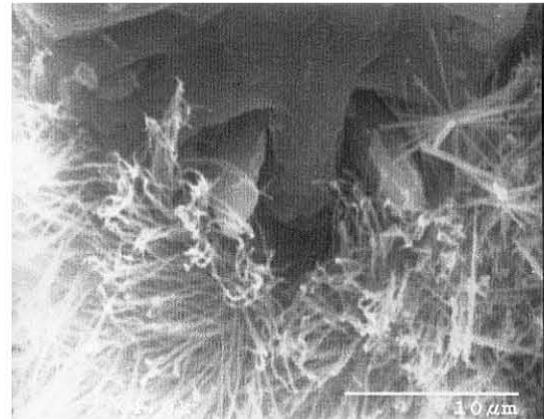
## 7.5 Sistema de Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Este sistema de microscopía electrónica de barrido permitió evidenciar perfectamente la disposición de la ciliatura, la cual se distribuye lateralmente en la superficie del oncomiracidio, y le facilita su desplazamiento en busca del hospedero; así como la zona oral y los orificios por donde desembocan las células glandulares (Fig.17).

a)



b)



c)

Fig.17 (a) Disposición lateral de la ciliatura del oncomiracidio de *H. ecuadori*. Barra 50μm; (b) zona oral y orificios por donde desembocan las células glandulares; (c) Par de hamuli y el primer par de ganchos. Barra 10μm.

## 7.6 Porcentaje de eclosión de los huevos de *H. ecuadori* a diferentes salinidades.

En la Tabla 2 se encuentra el porcentaje de eclosión de los huevos de *H. ecuadori* (media  $\pm$  DS) para los intervalos donde ocurrió la eclosión a las salinidades evaluadas. Como se puede observar, hubo diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en el porcentaje de eclosión entre las bajas salinidades (7‰ y 0‰) comparado con el testigo (35‰). En la salinidad testigo (35‰) el mayor porcentaje de eclosión ocurrió el día 8, con 58%. Se detectó que los huevos expuestos a bajas salinidades como 7 ‰ y 14‰ eclosionan pero retrasan su desarrollo embrionario uno o dos días, respectivamente, comparado con la salinidad testigo (datos no mostrados; observaciones microscópicas previas in vivo). Sin embargo, en la Fig. 18 se hace evidente que no hubo relación directa entre el porcentaje de eclosión y las diferentes salinidades evaluadas.

Tabla 2. Porcentaje de eclosión de huevos (Media±SD) de *Heterobothrium ecuadori* (n=50) a 23±1°C.

Salinidad	Porcentaje de eclosión	Intervalo de eclosión (Días)	Día de mayor eclosión (Días)	Porcentaje del día de mayor eclosión	No. de huevos por día de mayor eclosión
0‰	0% <sup>a</sup>	-	-	-	-
7‰	48±7% <sup>b</sup>	8-10	8	18±0.8%	9
14‰	94±16% <sup>c</sup>	6-11	8	46±3%	23
21‰	90±14% <sup>c</sup>	7-10	9 y 10	22±2%	11-11
28‰	70±11% <sup>cb</sup>	6-10	7 y 8	26±2%	13-13
35‰	96±21% <sup>c</sup>	7-10	8	58±2%	29

Las letras diferentes indican las diferencias significativas manifestadas por la prueba de Tukey con respecto a las salinidades en el porcentaje de eclosión.

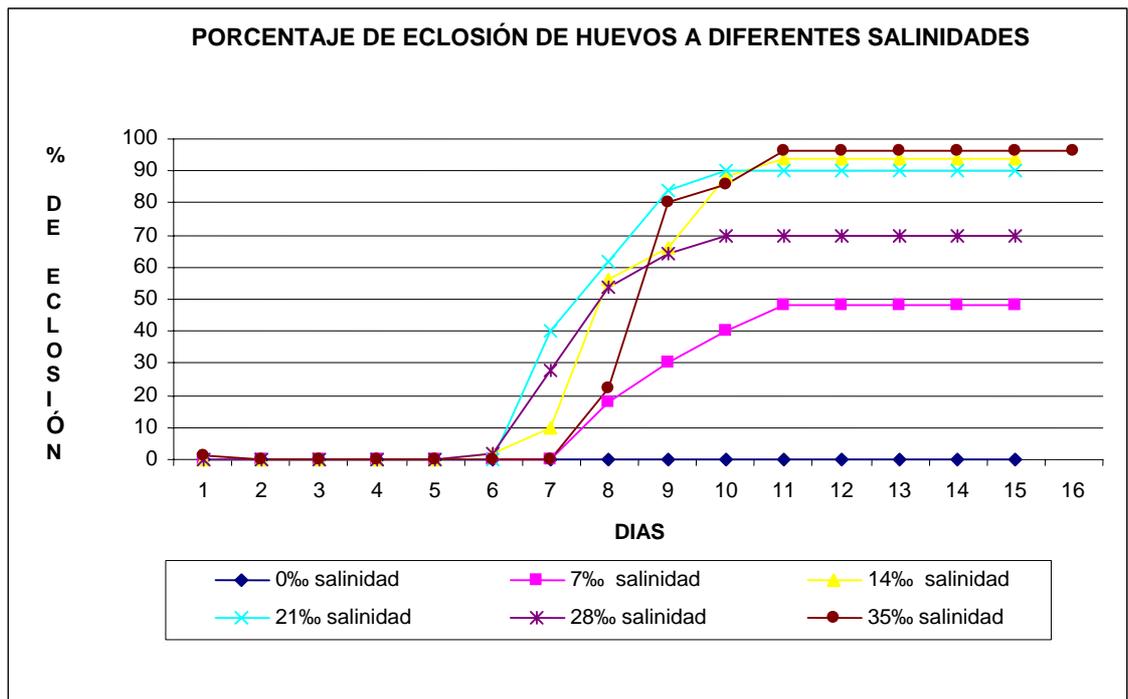


Fig. 18. Porcentaje de eclosión acumulado de los huevos de *Heterobothrium ecuadori* expuestos a diferentes salinidades en relación al tiempo. (En la Tabla 1 del Anexo se encuentra el porcentaje promedio acumulado de eclosión y la desviación estándar).

### Supervivencia del oncomiracidio de *H. ecuadori* a diferentes salinidades

En la Fig.19 se muestra el porcentaje de mortalidad del oncomiracidio de *H. ecuadori* a diferentes salinidades; donde se detectan los valores más altos para las salinidades 0‰ y 7‰. En la salinidad de 35‰ el tiempo estimado de vida para el oncomiracidio está en el intervalo de 4 a 7 días, donde el 50% de la población

muere aproximadamente en el día 5 (120 h) a  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ . ‰. El porcentaje de mortalidad promedio acumulado del oncomiracidio de *H. ecuadori* y su desviación estándar se encuentran en la Tabla 2 del Anexo.

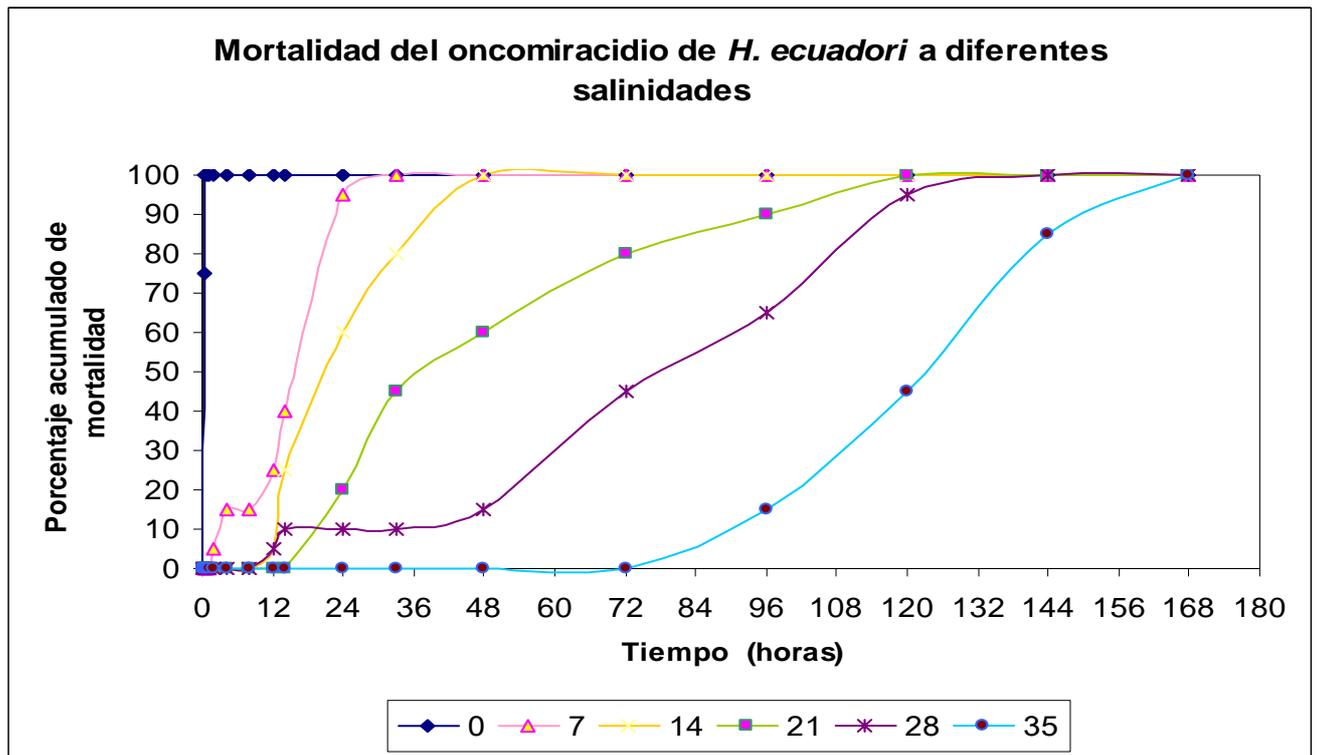


Fig 19 . Mortalidad del oncomiracidio de *Heterobothrium ecuadori* con relación al tiempo.

El análisis Probit permitió calcular las concentraciones letales medias de las diferentes salinidades a distintos tiempos de exposición (Fig.20), con la finalidad de establecer un intervalo de tiempo efectivo para eliminar las fases infestivas u

oncomiracidios. Se estimó que la CL<sub>50</sub> para la salinidad de 0‰ (agua dulce) fue de 15 minutos. A la salinidad de 7‰, durante los primeros 30 minutos, se observó claramente que las larvas pierden su actividad natatoria, posteriormente para esta salinidad se registró la CL<sub>50</sub> en el periodo de 14 h, aproximadamente. Estos datos se encuentran en la Tabla 3 del Anexo.

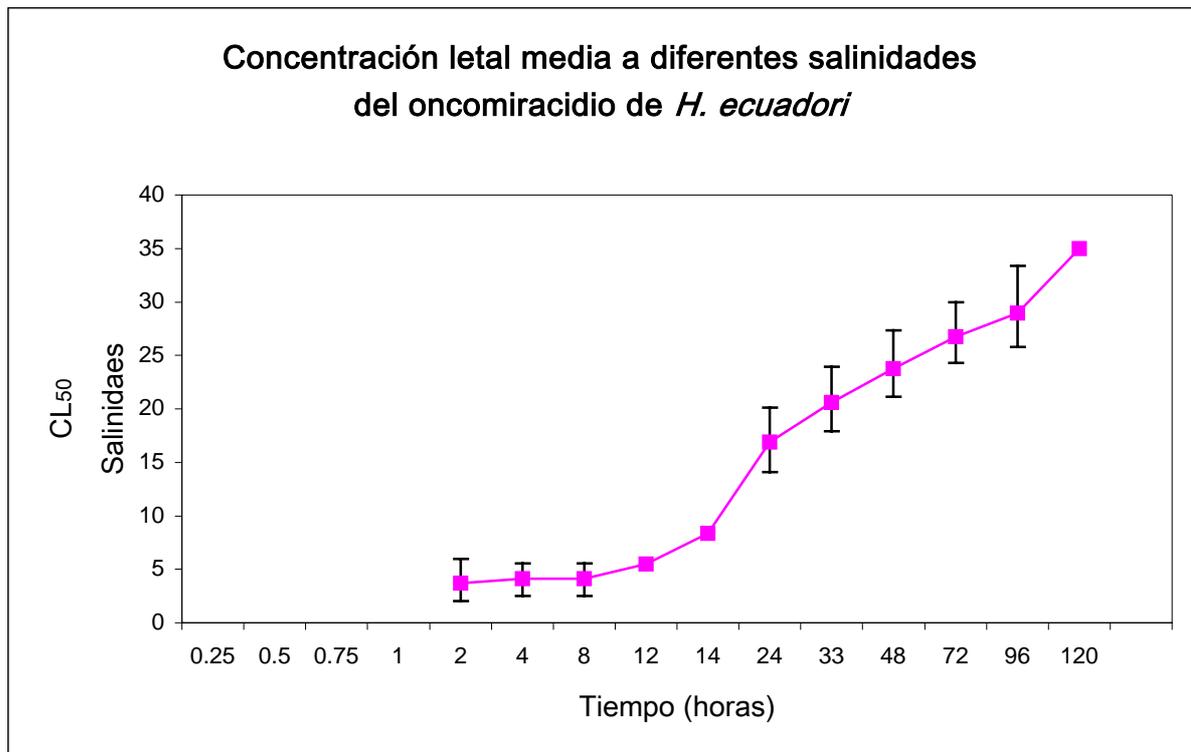


Fig. 20 Curva de toxicidad de diferentes salinidades sobre el oncomiracidio de *Heterobothrium ecuadori*. Los datos están representados por las concentraciones letales medias y los intervalos al 95% de confianza.

Las observaciones del comportamiento natatorio de los oncomiracidios indicaron que antes de morir tienen un proceso de inmovilidad y

desprendimiento de los cilios, lo que provoca un movimiento circular en su propio eje, posteriormente quedan suspendidas, ocasionalmente se observan contracciones musculares y en algunos casos de los cilios, hasta que no responden a estímulos mecánicos.

## 7.7 Infestaciones experimentales

El uso de la formalina no fue el tratamiento adecuado para este estudio, ya que no se logró erradicar a *H. ecuadori*. Esto se verificó con la presencia de huevos enredados en los hilos colectores de los peces tratados.

El antihelmíntico Drontal vía oral no fue práctico ya que causó estrés a los peces a pesar ser anestesiados, y se confrontó el riesgo de matarlos o lastimarlos al introducirles la cánula hasta el estómago.

Los baños con la solución de las pastillas de Drontal de uso veterinario tuvieron un efecto satisfactorio, ya que desprendieron a los parásitos adultos y fases larvianas de las branquias. Esto se verificó con la ausencia de huevos en los hilos colectores y posteriormente con el sacrificio de los peces. De esta forma se

garantizó que los peces usados en este experimento estuvieran libres de parásitos y que el grado de desarrollo de los estadios juveniles de *H. ecuadori* se correspondieran con los días de revisión de los peces.

**a) Metamorfosis de los cambios de los juveniles de *H. ecuadori*.**

El desarrollo y los cambios a los estadios juveniles comienzan cuando el oncomiracidio pierde el revestimiento o ciliatura y se puede diferenciar la metamorfosis de los ganchos larvales, la cual comienza en el par II y continúa con el par V (Fig.21a). Este último par de ganchos presenta una inversión en el sistema de agarre o cierre-apertura de las ventosas. Para el correcto entendimiento de estos cambios se debe señalar que la numeración de los ganchos larvales se hizo con el criterio de Ogawa (1998), el cual refiere al par I como el más posterior y al par V como el más anterior. También es importante destacar que los ganchos larvales del par I y los hamuli no desaparecen en los estadios juveniles (Fig.21b).

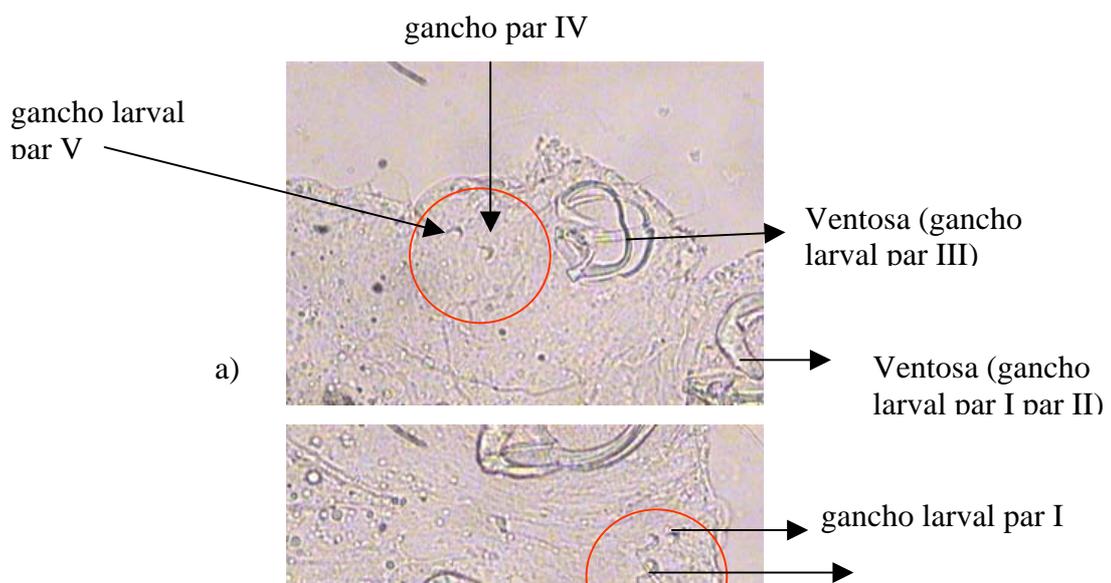


Fig. 21 a) Secuencia de la metamorfosis de los ganchos larvales a ventosas que se observan en el estadio adulto (400X). b) Se muestra la permanencia del primer par de ganchos y hamuli en el estado juvenil (400X).

#### b) Identificación de los estadios juveniles de *H. ecuadori*

Al quinto día de infestación se detectó un estadio juvenil con un par de pinzas o ventosas, el cual se corresponde con el estadio I. Sus dimensiones fueron  $130 \pm 10.06$  de largo y  $70 \pm 9.16$  de ancho. Se aprecia claramente el proceso

de transformación del segundo par de ganchos larvales a ventosas, así como el desarrollo del intestino que se destaca como una mancha central de coloración marrón (Fig. 22).

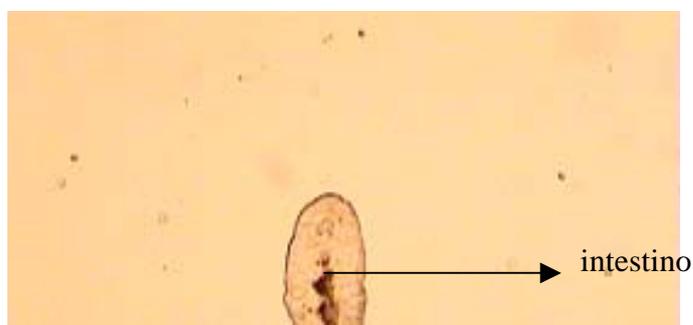


Fig.22 Transformación de los ganchos larvales a ventosas y evidencia del intestino del estadio juvenil I de *Heterobothrium ecuadori* (100X).

En la figura 23 se dibuja el esquema que corresponde al estadio I detectado a los 5 días post-infestación.

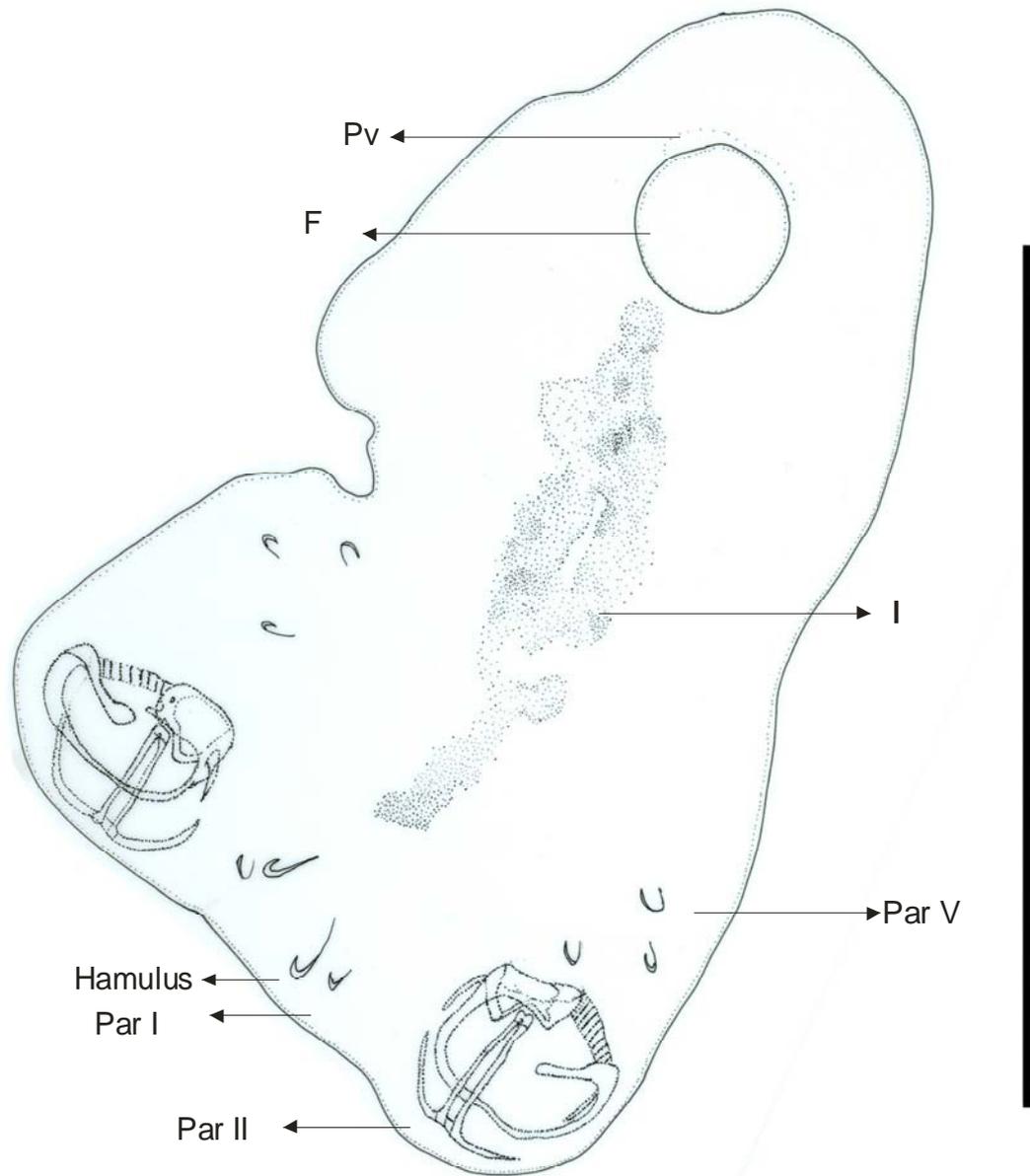


Fig. 23. Estadio juvenil I de *Heterobothrium ecuadori* a los 5 días post-infestación: ganchos larvales del I al V y hamuli, (F) la faringe, (Pv) el primordio de ventosas y el intestino (I) del estadio I. Barra 100  $\mu$ m

El día 10 post infestación, se encontraron juveniles de *Heterobothrium ecuadori* de  $357.5 \pm 72.74$  de largo y  $113.5 \pm 12.60$  de ancho también considerados como estadio I, ya que presentan sólo 2 pares de ventosas. Se revela una faringe esférica y el intestino bifurcado en la parte central del cuerpo (Fig.24). Es importante destacar que se realizó el esquema de un juvenil de 460 de largo y 130 de ancho, para evidenciar las estructuras principales (Fig. 25).

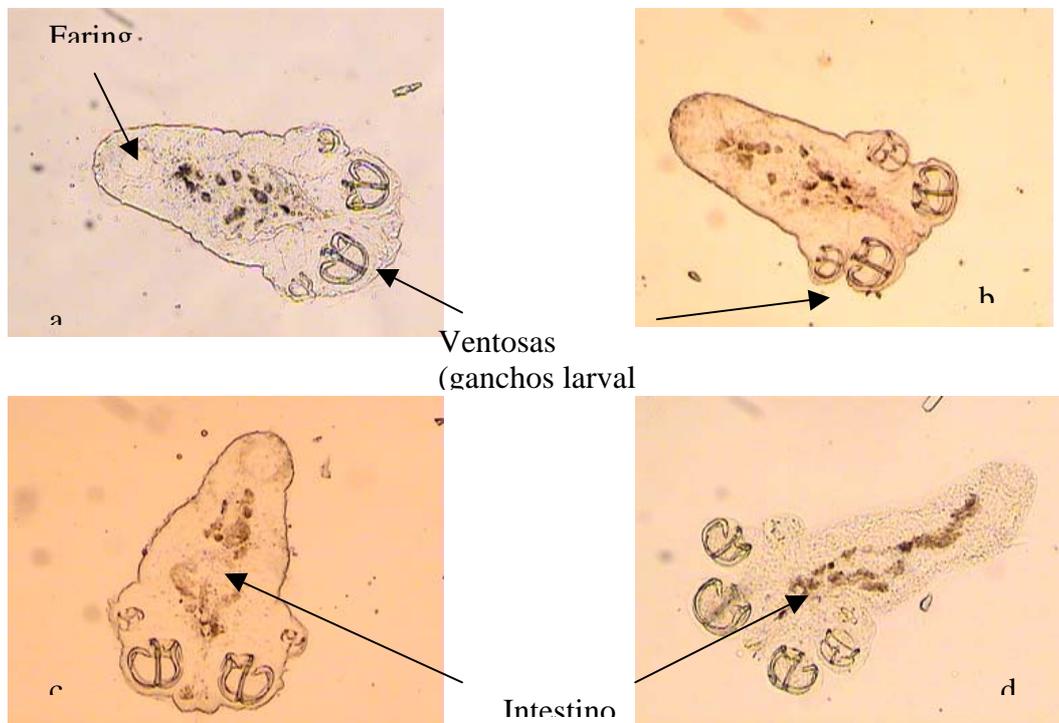


Fig. 24 Diferentes ejemplares del estadio juvenil I de *Heterobothrium ecuadori*, encontrados al décimo día post infestación. Se aprecia un desarrollo similar entre los organismos; bifurcación del intestino y metamorfosis de los ganchos larvales a ventosas (100X).

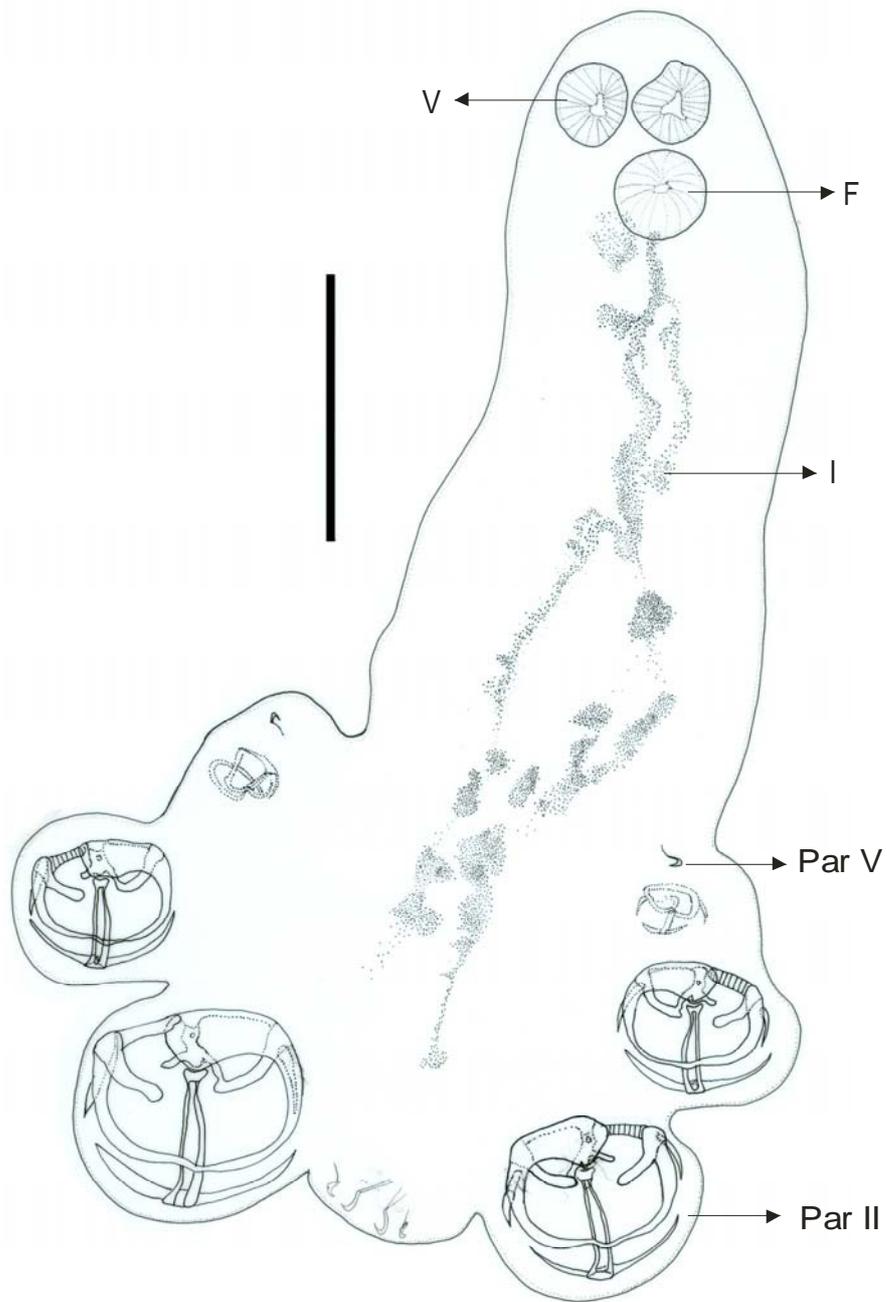


Fig.25. Estadio juvenil I de *Heterobothrium ecuadori* a los 10 días post-infestación: (V) Ventosas, (F) Faringe e intestino (I). Barra 100 (m)

A los 15 días post infestación se encontraron juveniles de *Heterobothrium ecuadori* de  $525 \pm 31.22$  de longitud y  $142.6 \pm 6.42$  de ancho con 4 pares de ventosas, pero sin desarrollo de los órganos reproductores correspondientes al estadio II (Fig.26a). Se observó un área llena de aglomeraciones celulares rodeada por el intestino, la cual se consideró como un primordio del ovario (Fig 26b). El estadio juvenil que se esquematizó midió 550 de longitud y 150 de ancho y corresponde a la Fig 27.

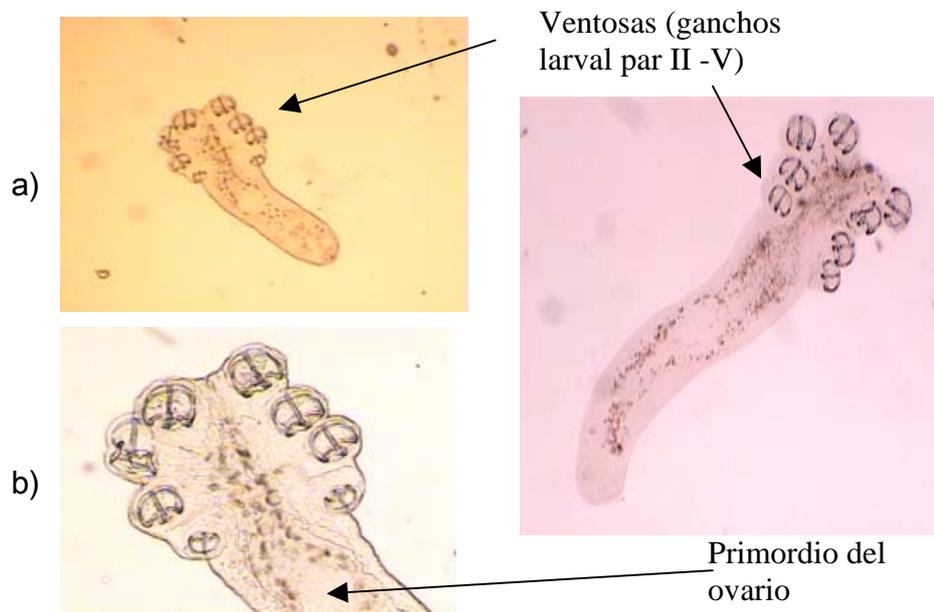


Fig.26. a) Diversos ejemplares de juveniles de *Heterobothrium ecuadori*, estadio II; 4 pares de ventosas (100X); b) primordio del ovario (400X).

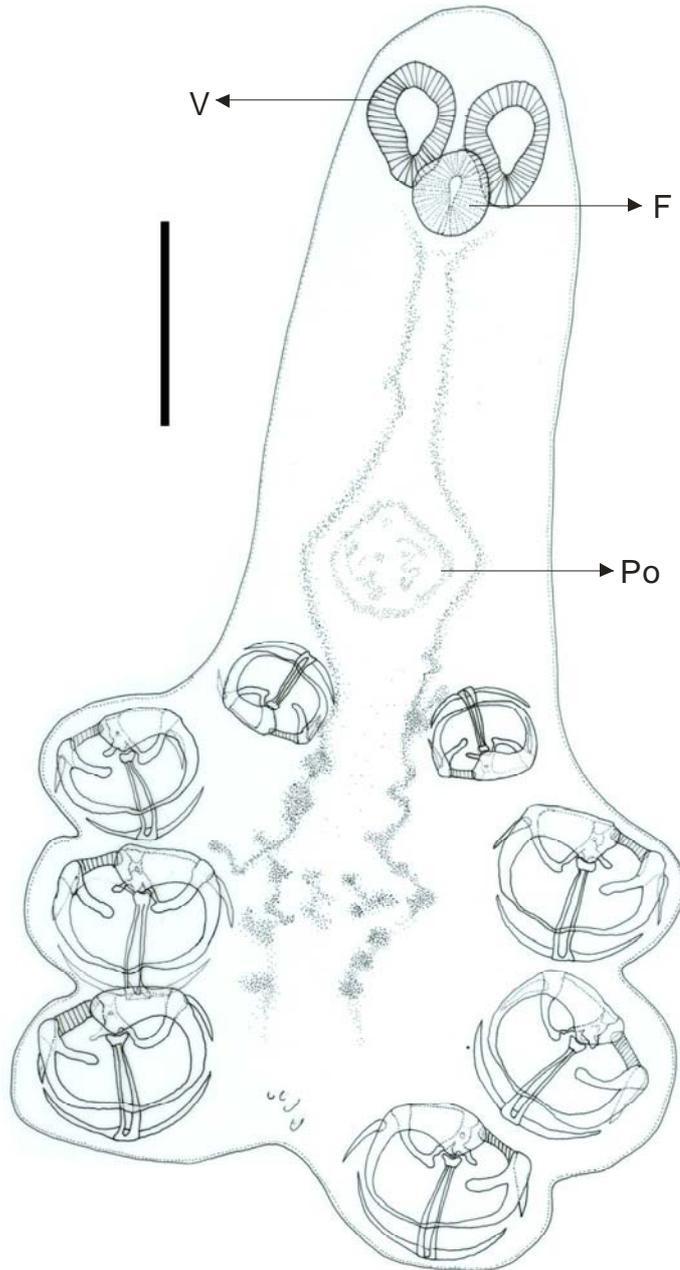


Fig. 27 Estadio juvenil II de *Heterobothrium ecuadori* a los 15 días post-infestación: (V) Ventosas, (F) Faringe, Po (Primordio ovario) y el intestino (I).

Barra 100  $\mu\text{m}$

A los 20 días post infestación se observaron juveniles de *Heterobothrium ecuadori* de  $1275.5 \pm 62.25$  de longitud y  $289.15 \pm 61.68$  de ancho con 4 pares de ventosas, un primordio del órgano copulador semejante a una corona de ganchos ubicado en el primer tercio del cuerpo, y los primordios de las glándulas vitelógenas, características que indican que se trata del estadio juvenil III (Fig. 28 a y b).

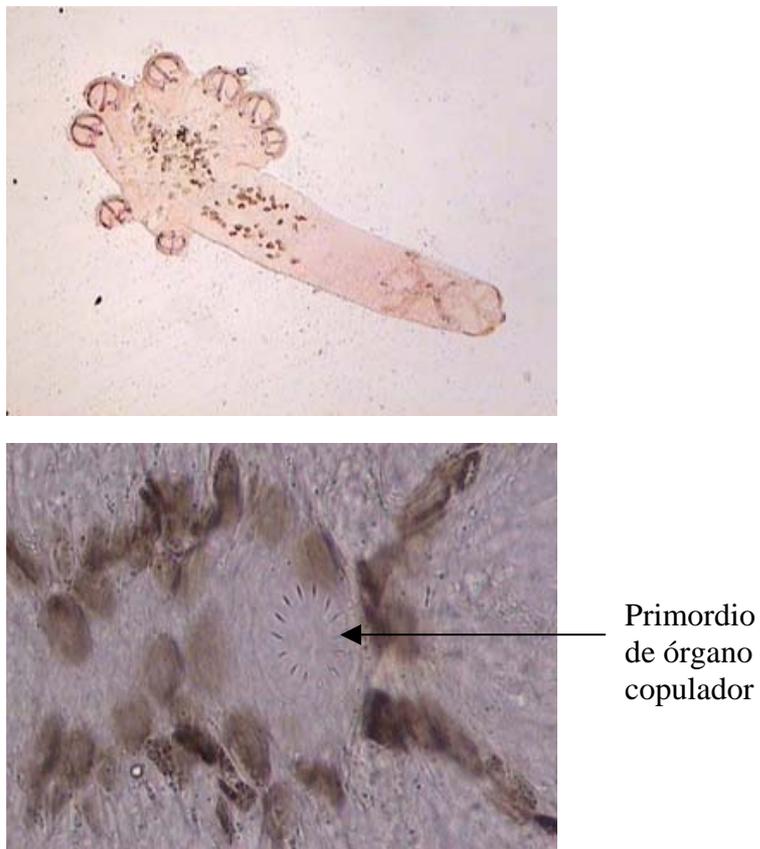


Fig. 28 a) Estadio de juvenil III de *Heterobothrium ecuadori*: 4 pares de ventosas, vitelógenas y primordio del órgano copulador(100X); b) detalles del primordio del órgano copulador (400X).

A los 25 días post infestación se encontraron juveniles de *Heterobothrium ecuadori* de  $1539.71 \pm 254$  de longitud y  $365.08 \pm 96.22$  de ancho con órganos reproductores masculinos en desarrollo correspondientes con el estadio IV. Estos poseen ventosas musculares en la región anterior bien desarrolladas con las siguientes dimensiones: ventosa derecha ( $94.34 \pm 12.52$  de longitud x  $62.62 \pm 17.98$  de ancho); ventosa izquierda ( $88.65 \pm 59.37$  de longitud x  $13.43 \pm 20.75$  de ancho), le continua una faringe esférica de  $52.05 \pm 13.43$  de longitud x  $60.18 \pm 7.45$  de ancho. Se observa un órgano copulador en forma de corona de ganchos ubicado en el primer tercio del cuerpo que mide  $58.56$  de longitud x  $69.64 \pm 5.63$  de ancho. El intestino está bien desarrollado y se observan los primordios de los órganos reproductores masculinos (Fig. 29). En la figura 30 se dibuja el esquema que corresponde al estadio mencionado.

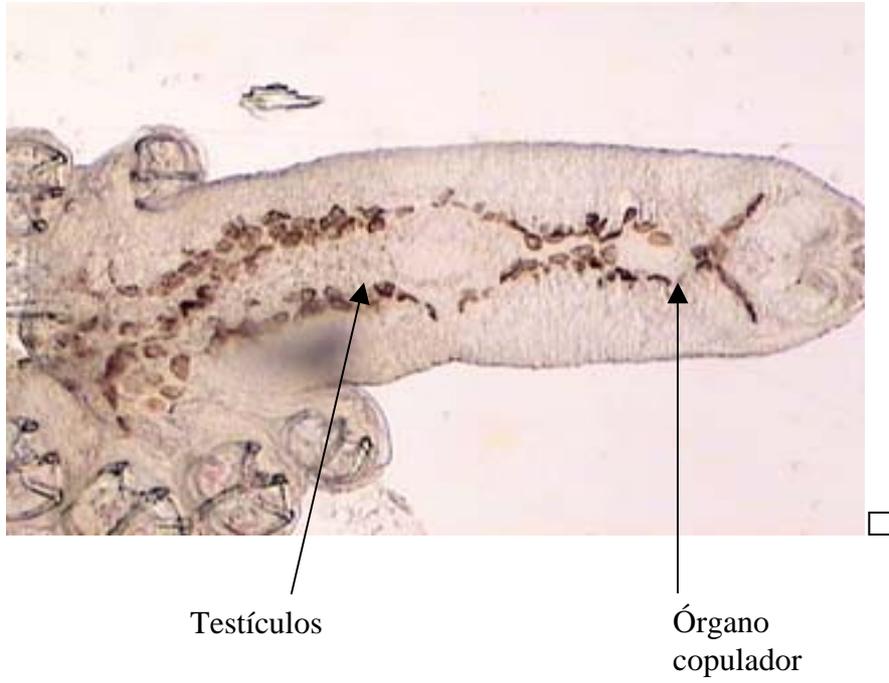


Fig. 29 Estadio juvenil IV de *Heterobothrium ecuadori*. Órgano copulador y primordio de testículos.

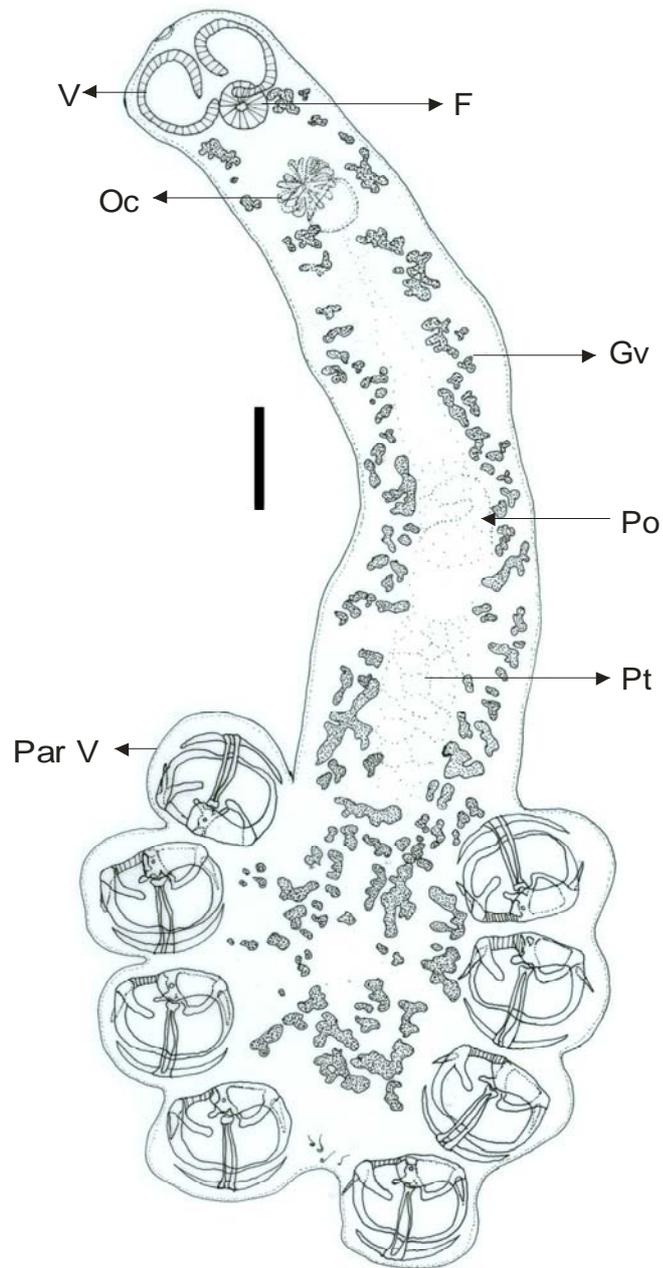


Fig. 30. Estadio del juvenil IV de *Heterobothrium ecuadori*. (V) Ventosas; F (Faringe), I (Intestino); Oc (Órgano copulador), Gv (vitelógenas), Po (Primordio ovario), Pt (Primordio testículo). Barra 100  $\mu$ m.

A los 30 días post infestación se aislaron juveniles y adultos de *Heterobothrium ecuadori* de  $1904.8 \pm 1334.14$   $\mu\text{m}$  de longitud y  $387.15 \pm 2.88$  de ancho con ovario visible, con y sin desarrollo de las vitelógenas correspondientes a los estadios V y VI. En el haptor anterior se observan las ventosas musculares bien desarrolladas, la derecha mide  $117.93 \pm 6.92$  de longitud y  $69.13 \pm 23.23$  de ancho, la ventosa izquierda mide  $113.86 \pm 10.44$  de longitud y  $71.57 \pm 23.58$  de ancho, le continúa una faringe esférica que mide  $61.81 \pm 1.52$  de longitud y  $57.34 \pm 3.78$  de ancho. El órgano copulador mide  $79.70 \pm 6.24$  de longitud por  $81.74 \pm 3.05$  de ancho; por debajo del cual se encuentra un receptáculo seminal de  $54.49 \pm 9.51$  de longitud y  $3.72 \pm 7.61$  de ancho. En los estadios considerados como adultos, las vitelógenas están bien desarrolladas, se ubican en los extremos del cuerpo y en la parte central se evidencian el ovario y los testículos (Fig.31). En la figura 32 se presenta el esquema que corresponde al estadio mencionado.

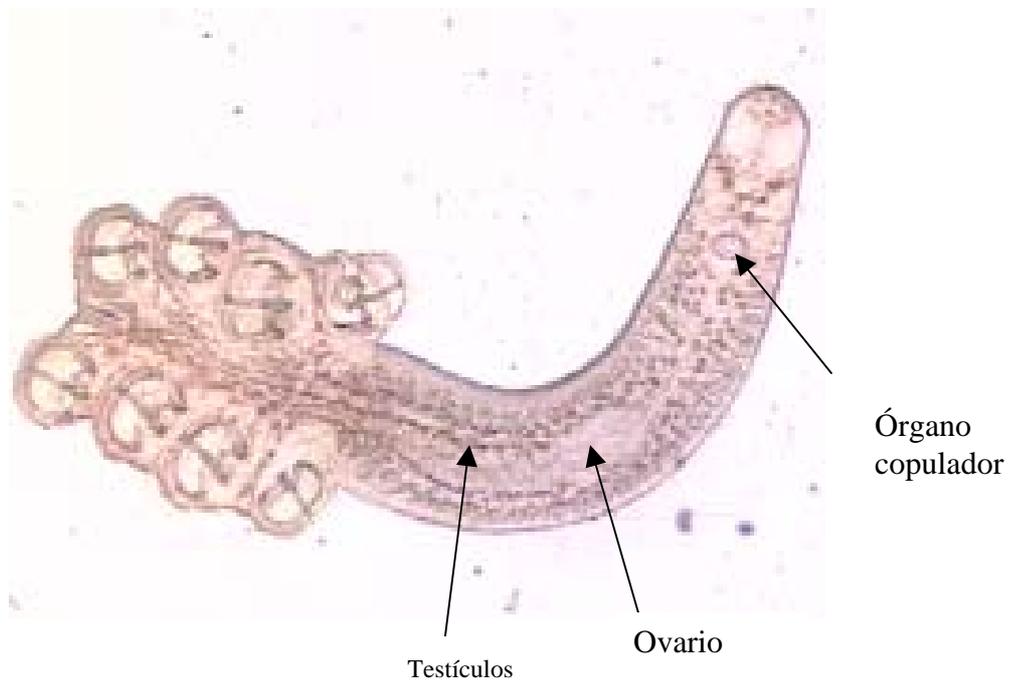


Fig. 31 Estadio adulto de *Heterobothrium ecuadori*: 4 pares de ventosas o ganchos en el haptor, Órgano copulador desarrollado, órganos reproductores y vitelógenas distribuidas en el extremo del cuerpo.

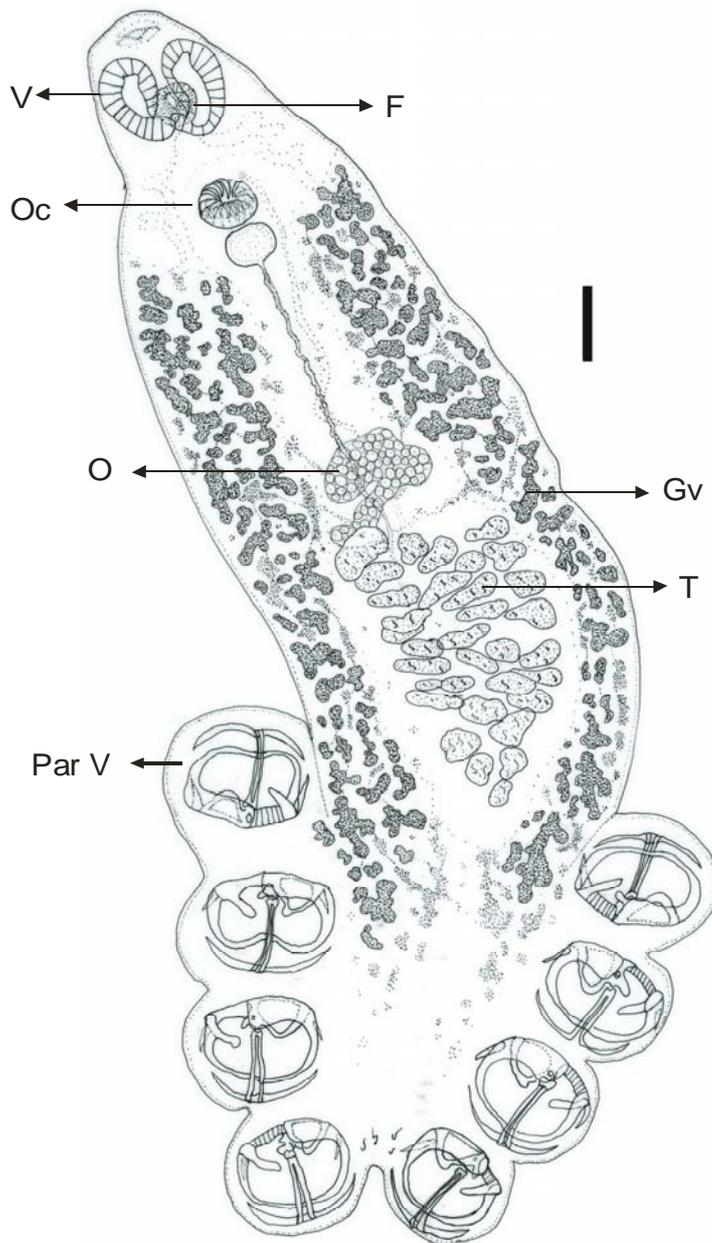


Fig. 32 Dibujo del estadio adulto de *H. ecuadori* encontrado el día 30 post-infección, ganchos del par II al V. F (faringe), V (Ventosas), I (intestino), Oc (Órgano copulador), Gv (Glándulas vitelógenas), O (Ovario), T (Testículos).

Barra 100  $\mu\text{m}$

### 7.8 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *H. ecuadori* en el botete diana *Sphoeroides annulatus*, está compuesto de un estadio de vida libre, oncomiracido fase infestiva, que se sujeta a las branquias del pez por medio de sus ganchos larvales y hamuli auxiliado por las glándulas de secreción orales que le permiten una mejor fijación al mucus de la propia branquia. Posteriormente, el oncomiracido permanece fijo en los filamentos branquiales donde se desarrollan los 5 estadios juveniles hasta llegar al estado adulto. El adulto maduro ovoposita los huevos para completar el ciclo de vida de este parásito (Fig. 33).

La duración del ciclo de vida de *H. ecuadori* desde oncomiracido a adulto durante el periodo de verano fue de 26-27 días ( $26^{\circ}$ - $30^{\circ}$ C y  $35\pm 1\%$ ) y en invierno, fue de 33-35 días ( $20^{\circ}$ - $23^{\circ}$ C y  $35\pm 1\%$ ).

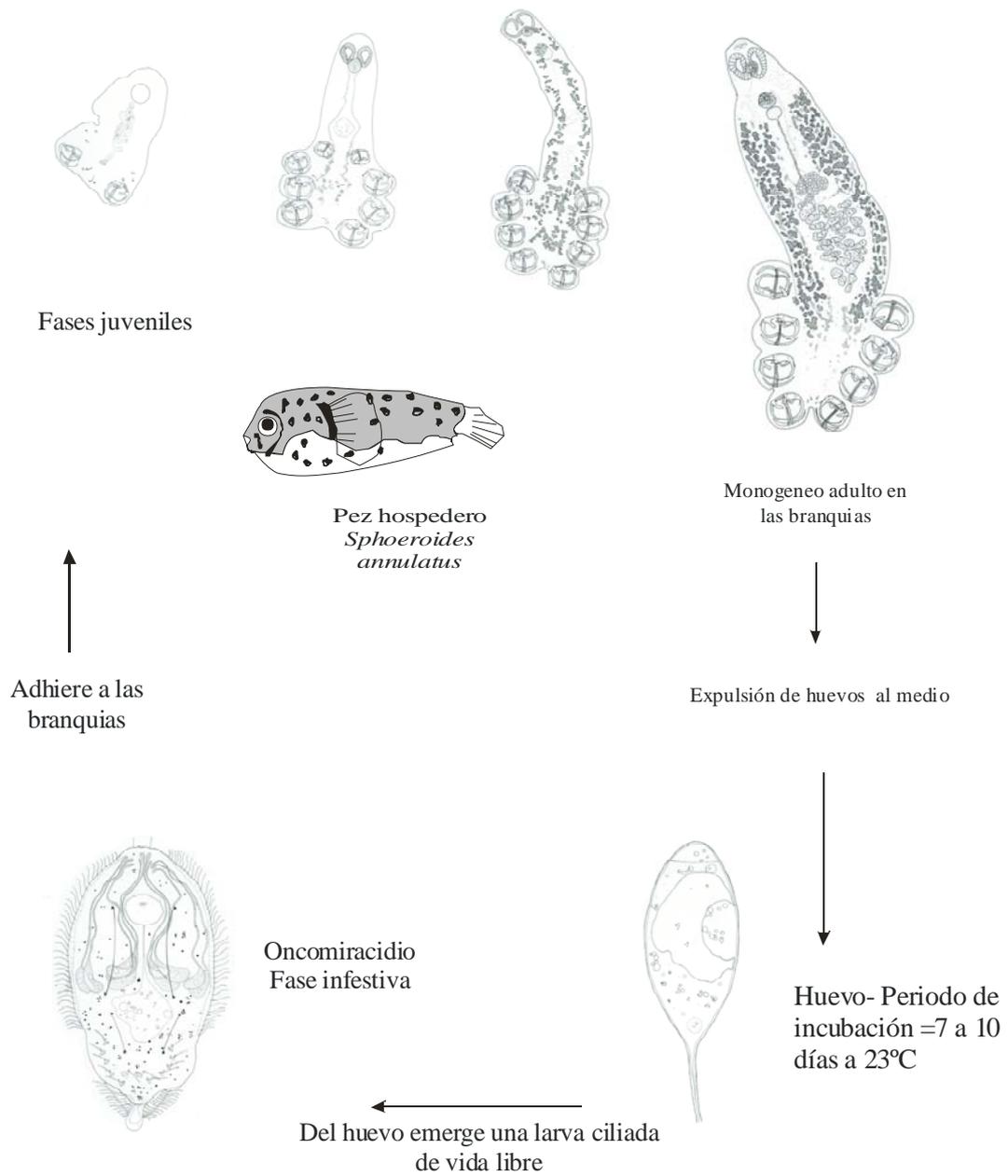


Fig. 33 Ciclo de vida de *Heterobothrium ecuadori* en el botete diana *Sphoeroides annulatus*.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Técnicas para obtener huevos de *Heterobothrium ecuadori*

La técnica empleada para la obtención de huevos de *H. ecuadori* directamente del adulto por estimulación mecánica no mostró los resultados esperados, ya que a pesar de que se seleccionaron los parásitos adultos sexualmente maduros y se realizó la estimulación en la zona ventral (Ogawa e Inouye, 1997), se obtuvo un bajo número de huevos y algunos mostraron anomalías y deformaciones. Estos resultados contrastan con los de Ogawa (1998) para el monogeneo *Heterobothrium okamotoi*, el cual produjo un número de 17,000 huevos en 11 días, cuyo desarrollo embrionario y eclosión larvaria fueron satisfactorios. En este estudio, el bajo número de huevos puestos por *H. ecuadori* pudo haber estado relacionado con el estrés provocado por una estimulación inadecuada, ya que este autor no describe en detalle el método que emplea para lograr la motivación correcta o es una característica muy peculiar de esta especie de parásito.

Para asegurar que el huevo y el oncomiracidio que se describió en este trabajo correspondiera a *H. ecuadori*, se verificó la taxonomía de la especie con base a

los caracteres morfológicos del adulto, realizada por Lamothe-Argumedo (1967). Así, una vez que algunos huevos fueron expulsados con la técnica de estimulación del adulto de *H. ecuadori*, se definió la forma, tamaño y coloración. Huevos con estas características fueron identificados en los hilos colectores, colocados en los tanques experimentales con botete diana infestados de los cuales eclosionaron oncomiracidios con los que se infestaron peces y al identificar a los adultos obtenidos se confirmó que pertenecían a *H. ecuadori*.

La técnica de los hilos colectores permitió la detección, captura y el manejo de huevos de *Heterobothrium ecuadori* adheridos a los hilos de nylon de color blanco para la realización de los experimentos; en contraste con las mallas recomendadas por Ernst y Whittington (1996) para la colecta de huevos de monogeneos, donde la acumulación de material orgánico, residuos de alimento y heces de los peces impedían la eclosión de los oncomiracidios. De la misma forma, como lo señalan los autores citados, el empleo de las mallas no fue útil para coleccionar ni monitorear el desarrollo y eclosión de huevos de una edad conocida; a diferencia de la técnica de los hilos colectores que permitió capturar los huevos en un periodo de tiempo establecido, así como lograr una producción continua, lo cual hizo posible contar con el material biológico necesario para la realización de todos los experimentos. La técnica de los hilos colectores detecta la

presencia de huevos del parásito y de la misma forma, puede evidenciar a otros huevos de monogeneos sin sacrificar al hospedero.

Cabe destacar que aunque en los objetivos de este estudio no se consideró el efecto de diferentes temperaturas sobre la obtención de los huevos por parte del adulto y en la eclosión de los oncomiracidios, los resultados revelaron que este parámetro físico intervino directamente en estos aspectos. Aunque no se cuenta con un área de temperatura controlada para la realización de los experimentos, se definió un intervalo de temperatura del agua proveniente del mar, desde 20-23°C (invierno 2002 y 2003) y 26-30°C (verano 2002). En este último periodo se observó una disminución en el número de huevos expulsados por los adultos de *H. ecuadori* que parasitaban a los botetes diana colocados en los tanques del área de bioensayos mediante la observación de los hilos colectores bajo el estereomicroscopio. Considerando que la temperatura del agua fue el único factor ambiental que varió durante el diseño experimental, esta escasez de huevos de *H. ecuadori* durante el verano, podría atribuirse a una baja prevalencia de este monogeneo en los botetes, cuya presencia no estuvo favorecida con el incremento de la temperatura del agua hasta 30°C, lo cual se corresponde con las investigaciones realizadas por Fajer-Avila *et al.* (2004) sobre los patrones de ocurrencia de helmintos parásitos en el botete diana silvestre, los cuales

detectaron una asociación entre la prevalencia de *H. ecuadori*, y la temperatura; la cual se reflejó en un mayor número de peces infectados por este monogeneo en el intervalo de 23°-24.5°C.

## 8.2 Descripción del huevo y desarrollo embrionario de *Heterobothrium ecuadori*

Con relación al tiempo y proceso de ensamblaje de huevos de monogeneos, por medio de observaciones directas a parásitos aislados del hospedero para monogeneos Diclidofóridos como *Heterobothrium okamotoi*, Ogawa (1997) observó que un adulto produjo hasta 1500 huevos en intervalos de 2 minutos. Posteriormente, Ogawa e Inouye (1997) colectaron 17, 000 huevos de varios adultos de *Heterobothrium okamotoi* al cabo de 11 días a 15°C, logrando posteriormente su eclosión. El número de huevos depositados por un adulto de *Neoheterobothrium hirame* alcanzó un promedio diario de 577, 781 y 651 a 15°C, 20°C y 25°C respectivamente, su fecundidad es comparada con *Heterobothrium okamotoi* (Ogawa, 2002). Sin embargo, a pesar de los intentos en este estudio, no se logró registrar el intervalo de tiempo de expulsión por parte del adulto debido al bajo número de huevos puestos por *H. ecuadori*, esto pudo relacionarse con el estrés provocado por una estimulación inadecuada, como se expuso anteriormente. Es importante señalar que se seleccionaron los adultos de *H. ecuadori* más grandes y maduros, de acuerdo a las recomendaciones de Kearn

(1985), el cual menciona que la producción de huevos en *Entobdella soleae* monogeneo parásito de la piel del pez *Solea solea* se incrementa con el tamaño del adulto que puede producir más de 60 huevos por día; sin embargo, en este estudio no se obtuvo el número suficiente de huevos para determinar el tiempo de ensamblaje.

Los huevos de *H. ecuadori* mostraron largos apéndices unipolares que propician la unión entre ellos y en algunos casos pueden agruparse como racimos o cadenas de huevos unidos por filamentos largos que se acumulan en el mucus o materia orgánica del propio pez, como los huevos de *Diclidophora luscae* y *D. denticulada* que poseen apéndices en forma de ganchos que se pueden sujetar formando un "racimo" enredándose entre ellos (Kearn, 1963). Esta distribución en los huevos es semejante a las largas cadenas de 1.2-1.7m hasta 2.83m de largo de *H. okamotoi* (Ogawa, 1997).

El desarrollo embrionario del huevo de *H. ecuadori* sigue un patrón similar al descrito para otros monogeneos como *Entobdella soleae* (Kearn,1963) y *Merizocotyle* sp. (Kearn,1968) que consiste fundamentalmente en el aumento de tamaño del embrión y el subsiguiente desplazamiento de las células vitelógenas hacia los extremos, definiendo el contorno de la larva y la aparición del haptor con

ganchos. A continuación se observa el movimiento muscular del embrión y de los cilios hasta el rompimiento del opérculo que da lugar a la eclosión.

### 8.3 Eclosión y descripción del oncomiracidio de *Heterobothrium ecuadori*

Durante el proceso de eclosión del oncomiracidio de *H. ecuadori* se aprecia un comportamiento similar al descrito por Lázaro –Chávez (1984) en miracidios de Digeneos. Esta autora describió que el proceso del nacimiento es activado por efectos osmóticos que se relacionan con el cambio en la permeabilidad de la membrana vitelina, así como las contracciones del miracidio que empuja al opérculo frotando su papila apical sobre la membrana vitelina. En *H. ecuadori* se observó microscópicamente que el movimiento previo de la larva y el cambio de permeabilidad favorecieron el nacimiento de los oncomiracidios, ya que el opérculo no está fusionado totalmente con la cápsula y por esta pequeña separación, es presumiblemente el lugar por donde se da el intercambio osmótico.

En los trabajos consultados se observó que el tiempo requerido para el desarrollo y eclosión del oncomiracidio está en función de las variaciones de la temperatura. En monogeneos Diclidofóridos como *Heterobothrium okamotoi*, que eclosiona posterior a ser expulsado del adulto, se refiere que a 25°C el periodo fue

entre 5-8 días con 85.6% de eclosión; a 20°C fue 6-10 días con 88.7 % de eclosión y finalmente a 15°C del 10-17 días con 94.1% de eclosión (Ogawa, 1998). La eclosión de huevos de *Neoherobothrium hirame* fue de 85% entre los 10 y 25°C, con un tiempo promedio de 23.8 días a 10°C; 12.8 días a 15°C; 7.1 días a 20°C y 5 días a 25°C; mientras que el intervalo de eclosión fue menor del 5% a 30°C (Yoshinaga *et al.* 2000).

Macdonald (1977) detectó que la eclosión de *Diclidophora merlangi* fue de 30-34 días a 13°C; *D. luscae* (32-36 días a 13°C), *D. denticulada* (20-22 días a 13°C). En este caso, la temperatura se mantuvo constante (13°C), y las variaciones en los días de eclosión se podrían deber a la biología de cada especie y del hábitat propio de cada hospedero.

Al igual que con los otros monogeneos, aunque no fue objeto del presente estudio se observaron variaciones en el desarrollo embrionario de *H. ecuadori* con relación a la temperatura. El periodo de eclosión del oncomiracidio estuvo entre el 5° y 6° día a 27±1°C durante el verano y del 7° al 10° día a 23±1°C en invierno. Como se puede observar, el periodo de desarrollo de *H. ecuadori* se retrasó a medida que disminuía la temperatura en los meses de invierno. Estos resultados se corresponden con las observaciones de Williams y Lethbridge (1990) sobre el

periodo de eclosión de *H. elongatum* el cual fue de 8 ó 9 días a 22-24°C y 28-30‰ de salinidad; y los de Ogawa (1998) para *H. okamotoi* cuya eclosión ocurrió entre el día 6-10 a 20°C.

El factor luz fue otro aspecto a considerar en este estudio, cuyo efecto pudo haber acelerado o estimulado la eclosión de *H. ecuadori*; lo cual se podría corresponder con el comportamiento descrito para oncomiracidios de monogeneos monopistocotileos por varios autores, que refieren que en los ambientes naturales emergen sólo con la luz del día (Kearn, 1986). Macdonald y Combes (1978) citados por Balasuriya y Tak Seng (1995), observaron que la luz estimula la eclosión de los monogeneos *Diplozoon paradoxum* Von Nordmann, 1832; *Microcotyle spinicirrus* MacCallum, 1918; y *Polystoma intergerrimum* Froelich, 1791. Sin embargo, los experimentos con *H. ecuadori* en este trabajo se realizaron con 12 horas luz y 12 de oscuridad, por lo que el fotoperiodo no se tomó como una variable en el análisis del experimento. Sin embargo este factor deberá ser objeto de investigaciones posteriores.

### 8.3.1 Oncomiracidio de *Heterobothrium ecuadori*

Las estructuras observadas en el interior de la cavidad del cuerpo del oncomiracidio de *Heterobothrium ecuadori* son similares a las especies descritas que pertenecen a la familia Diclidophoridae como *Diclidophora merlangi*, *D. luscae*, *D. denticulata* (Macdonald, 1977); *Heterobothrium okamotoi* (Ogawa, 1998); y *Neoheterobothrium hirame* (Ogawa, 1999). Estos oncomiracidios comparten una morfología común, el patrón de ciliatura, la distribución de ganchos en el haptor, ausencia de órganos sensoriales (ocelos o pigmentos oculares), presencia de glóbulo terminal en forma de gota en la parte posterior, distribución de células flama y de los gránulos lipídicos en el cuerpo. Estos gránulos lipídicos sirven como reserva nutricional o alimenticia además de proveer cierta flotabilidad a la larva en el agua, de acuerdo con lo referido por Macdonald (1977). La distribución de estos gránulos lipídicos puede ejercer una influencia considerable en el patrón de nado del oncomiracidio y la habilidad por la búsqueda del hospedero (Ogawa, 1998). En *H. okamotoi* hay diferencias en la abundancia de los gránulos entre individuos de la misma edad, probablemente debido a un contraste en las condiciones nutricionales del hospedero (Ogawa, 1998), considerando la distribución de los gránulos en el cuerpo de *H. okamotoi* fueron mas abundantes en la zona posterior del cuerpo y el haptor que en la parte

anterior. En *D. merlangi*, la distribución fue desigual en todo el cuerpo pero hubo una tendencia a acumularse en la zona del haptor (Macdonald, 1977). Por otra parte, el oncomiracidio de *Heteraxine heterocerca* tiene una distribución azarosa en la totalidad del cuerpo (Kearn *et al.*, 1992). En este caso, *Heterobothrium ecuadori* mostró una distribución preferencial en la zona del haptor similar a lo referido por Ogawa (1998) para *H. okamotoi*.

Otro aspecto a considerar es la ausencia de ocelos en el oncomiracidio de *Heterobothrium ecuadori*, coincidente con los poliopistocotileos, como *Diclidophora merlangi*, *D. luscae*, *D. denticulata* (Macdonald, 1977) *Diplozoon paradoxum* (Kearn, 1978) *Heteraxine heterocerca* (Kearn *et al.*, 1992) *H. okamotoi* (Ogawa, 1998) y *Neoheterobothrium hirame* (Ogawa, 1999).

Las cinco glándulas secretoras halladas en el oncomiracidio de *Heterobothrium ecuadori* coinciden con las referidas por Ogawa (1998) para *H. okamotoi* en contraste con Macdonald (1977), el cual describió en tres especies del género *Diclidophora* 12 conductos glandulares (se presumen seis glándulas de cada extremo que se abren en la zona anterior); sin embargo su número exacto es difícil de estimar.

A partir de la comparación que se realizó de los oncomiracidios se puede diferenciar que *H. ecuadori* presenta los ganchos larvales de mayor tamaño, pero la apertura del gancho es más reducida que para *H. okamotoi* y *N. hirame*. En este punto, es importante destacar que Ogawa (1998) esquematiza un gancho larval con un saliente en la parte media del propio gancho. Esta protuberancia podría ser un efecto visual producido por el domo en el cual descansa cada gancho de acuerdo a lo observado en su esquema. De ser una protuberancia como tal, los ganchos larvales en *H. okamotoi* son los únicos que lo presentan. Con referencia a los hamuli, *H. okamotoi* muestra mayor tamaño y apertura de estos ganchos. Las dimensiones del oncomiracidio de *H. ecuadori* son alrededor de la mitad de talla de *H. okamotoi* y *N. hirame* lo cual guarda relación con el tamaño de los adultos.

#### **8.4 Porcentaje de eclosión y supervivencia del oncomiracidio a diferentes salinidades**

Aunque en general se observó un efecto directamente proporcional de la salinidad en la eclosión de huevos de *H. ecuadori* se puede apreciar cierta variabilidad en la respuesta aunque ésta no fue significativa en el análisis estadístico. Una posible explicación pudiese ser que a bajas salinidades se ha observado una disminución en el porcentaje de eclosión de varias especies de

monogéneos y por consiguiente un aumento en la mortalidad del embrión pero existen determinados intervalos de salinidad que son tolerados por el embrión. En particular, se pueden citar los trabajos realizados por Balasuriya y Tak-Seng (1995) los cuales evaluaron el efecto de las bajas salinidades en la eclosión de huevos del monogéneo diplectánido *Pseudorhabdosynochus monosquamodiscusi*, los cuales mostraron un intervalo de tolerancia a salinidades entre 10‰ y 40‰, pero registraron una alta mortalidad a salinidades de 5‰ y agua destilada. Asimismo, Diggles *et. al.* (1993) refirieron la influencia de la hiposalinidad en huevos del microcotílido *Polylabroides multispinosus* donde la viabilidad del huevo disminuyó marcadamente en salinidades de 0‰-5‰ pero no así en 10‰ y 20‰. En monogéneos diclidofóridos, Ogawa (1998) evaluó el efecto de diferentes salinidades en la eclosión y supervivencia del oncomiracidio *H. okamotoi*, donde señala que a bajas salinidades no observó desarrollo embrionario y pudo detectar una mortalidad gradual de embriones colocados en agua destilada. Mueller *et al.* (1992) describieron un comportamiento relacionado con la salinidad y el porcentaje de eclosión de huevos del monogéneo *Neobenedenia melleni*. Estos autores detectaron que a 6‰ y 18‰ no existen variaciones importantes en el porcentaje de eclosión (5.5% y 5.8%). Lo antes descrito por el citado autor se observó de igual manera en el presente trabajo para los huevos de

*H. ecuadori*, ya que a pesar de las repeticiones realizadas durante el experimento, los resultados revelan que en la salinidad de 28‰ el porcentaje de eclosión fue de 70% mientras que a 14‰ y 21‰ fue de 90% y 94%, respectivamente. Estas variaciones con relación a este factor físico, podrían corresponderse con la adaptabilidad del parásito a los diferentes sitios seleccionados por el hospedero, ya que los juveniles de botete frecuentan las áreas costeras y bahías cercanas a la boca de los ríos, donde hay variaciones en los niveles de salinidad. También coincide con los resultados de Han *et al.* (1995), quienes determinaron que los juveniles de botete tigre muestran mejor crecimiento a las salinidades de 10 ‰ y que esta adaptabilidad coincide con el hábitat seleccionado por los peces juveniles.

El intervalo de eclosión de huevos de *H. ecuadori* en este estudio fue amplio (7 ‰ hasta 35 ‰). Estos datos parecen corresponder a la capacidad del botete diana para soportar un amplio intervalo de salinidad como habitante de estuarios y lagunas costeras ([www.fishbase.com](http://www.fishbase.com)), por lo que el parásito debe adaptarse de la misma forma que el hospedero a estas variaciones en la salinidad del medio.

Así también, se observó que algunos huevos no eclosionaron en el intervalo de las salinidades a estudiar; este fenómeno fue citado por Ogawa (1998) para la eclosión de huevos de *H. okamotoi*, parásito del botete tigre; de la misma forma, Williams y Lethbridge (1990) señalaron que en huevos de *H. elongatum* hay un porcentaje de éstos que no eclosionan. Lo indicado anteriormente no se relaciona con las bajas salinidades, ya que durante este estudio, también se observaron algunos huevos que no eclosionaron en la salinidad testigo. Este comportamiento puede ser un fenómeno biológico natural, probablemente debido a la viabilidad del propio huevo, malformación o mutaciones del embrión. Estas variaciones confirman la importancia de conocer el límite tolerable de eclosión de los huevos a diferentes salinidades, y así poder detener el ciclo de vida, impidiendo la eclosión de larvas infectivas en peces de cultivo.

#### **8.4.1 Supervivencia del oncomiracidio de *Heterobothrium ecuadori***

La longevidad del oncomiracidio de *H. ecuadori* está en el intervalo de 4-7 días, donde se registró el 50% de mortalidad a las 120h (5 días) a  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ . Estas observaciones coinciden con los resultados de Ogawa (1998) sobre los oncomiracidios de *H. okamotoi*, el cual estimó que la longevidad fue de 4.7 días a

25°C; y de 7.3 días a 20°C; mientras que al disminuir la temperatura a 15°C se extendió a 9.1 días. También se corrobora que los oncomiracidios de *H. ecuadori* retienen la habilidad de nado por varios días, conservando así su capacidad de infestación por un periodo prolongado, semejante a las observaciones de Ogawa (1998) para *H. okamotoi* donde más del 50% retuvieron la habilidad de nado a los 7 días 15°C.

La capacidad o habilidad natatoria de los oncomiracidios supervivientes de *H. ecuadori* que fueron expuestos a diferentes salinidades, mostraron una clara tendencia a reducir su capacidad locomotora conforme disminuye la salinidad, este comportamiento es semejante al decremento en la actividad natatoria de oncomiracidios de *H. okamotoi* expuestos a diversas salinidades (Ogawa, 1998).

Las larvas de *H. ecuadori* expuestas a la salinidad de 7‰ redujeron considerablemente su actividad natatoria, estos resultados coinciden con la inactividad para nadar a la salinidad de 6.7 ‰ detectada en oncomiracidios de *H. okamotoi* (Ogawa, 1998). El citado autor concluye que un posible control efectivo para evitar la infestación por oncomiracidios de *H. okamotoi* es mediante el mantenimiento de los peces en tanques con suministro de agua a bajas salinidades, cuyo efecto se relaciona con que la viabilidad de un oncomiracidio

radica en su capacidad de nado eficiente para encontrar un hospedero y continuar su desarrollo a adulto. Al reducir considerablemente su capacidad de nado, esta fase infestiva se podría considerar no apta para llegar al hospedero, infestarlo y cerrar el ciclo de vida.

### 8.5 Fases juveniles de *Heterobothrium ecuadori*

La desparasitación de los peces tuvo la finalidad de asegurar que las fases larvarias correspondieran al periodo de infestación, lo cual requirió que el hospedero estuviese libre de parásitos. Para esto, se evaluaron antihelmínticos que erradicaran a los parásitos sin perturbar al hospedero y causarle la muerte. Los componentes evaluados para alcanzar el 100% de efecto en la eliminación de las diferentes fases de *H. ecuadori* revelaron que el oncomiracidio es sensible a la exposición de agua dulce, mientras que el adulto no es afectado en periodos de una hora de exposición.

La formalina ha dado efectivos resultados para ciertos agentes patógenos; su efectividad depende de la temperatura del agua y su uso debe ser regulado. Fajer *et al.* (2003) encontraron en evaluaciones *in vitro* que la concentración letal media contra *H. ecuadori* fue de 0.17ml/l durante 105 min a 26°C; sin embargo, no

se logró el 100% de efecto requerido para erradicar al parásito adulto, a pesar de duplicar la dosis y repetirla en el tiempo.

Sin embargo, la aplicación de las pastillas de Drontal (50 mg de praziquantel, 150mg de pamoato de pirantel y 150mg de febendazol por pastilla) en forma de baños durante 15-30 min tuvieron un efecto satisfactorio, ya que logró desprender a los parásitos adultos y fases larvianas de *H. ecuadori* de las branquias del botete diana, coincidente con las recomendaciones de Hirazawa *et al.* (2000) sobre la efectividad del praziquantel en dosis de 20mg/L contra *H. okamotoi* en forma de baños y con las de Hong-Kim y Bum-Cho (2000) en dosis de 100mg/L por 4 minutos a 23-24°C y 33‰ contra el poliopistocotileo *Microcotyle sebastis*.

La metodología empleada para la infestación de juveniles de botete diana con oncomiracidios de *H.ecuadori* fue adecuada, ya que hizo factible la determinación de los periodos de desarrollo de los estadios juveniles de este monogeneo y su descripción; coincidente con los resultados alcanzados por Ogawa e Inouye (1997) durante la exposición de juveniles de botete tigre, *Takifugu rubripes* a oncomiracidios de *H. okamotoi* para la descripción del ciclo de vida de

este monogeneo e Hirazawa *et al.* (2000) para evaluación de tratamientos terapéuticos.

Williams y Lethbridge (1990) definieron cuatro estadios de vida de dos especies de *Heterobothrium*: *H. torquigeneri* y *H. elongatum*. Los juveniles de *H. elongatum* no tuvieron una distribución uniforme sobre las branquias de *Torquigener pleurogramma*. Inicialmente, los estadios juveniles mostraron una tendencia a congregarse hacia la zona ventral de los arcos branquiales, donde la invasión subcutánea es iniciada por el haptor parcialmente embebido y con la parte anterior del cuerpo posicionado sobre la branquia. Esta estrategia de adhesión es común en otros poliopistocotileos como hematófagos activos de peces tetraodóntidos (Ogawa e Inouye, 1997; Williams y Lethbridge, 1990; Fajer y Chávez, 1999). En el presente estudio se verificó la existencia de cinco estadios juveniles de *H. ecuadori* y un estadio adulto; en contraste con los tres estadios juveniles y un estadio adulto establecido por Williams y Lethbridge (1990) para *H. elongatum*. Estas diferencias en el número de estadios juveniles hallados en *H. ecuadori* estuvieron basadas en la diferencia de criterios empleados por Williams y Lethbridge (1990) sobre el grado de desarrollo de los órganos reproductores en comparación con los definidos por Ogawa e Inouye (1997) para los estadios juveniles de *H. okamotoi* que son los asumidos en este trabajo.

También se observó que los juveniles de *H. ecuadori* tuvieron menores tallas que los descritos por Williams y Lethbridge (1990) para *H. torquigeneri* y *H. elongatum*; y mayores a los de *H. okamotoi*; lo cual se corresponde con la diferencia en tamaño de los parásitos adultos maduros. En este caso, el estadio adulto de *H. ecuadori* midió alrededor de 2.0 mm de longitud mientras que *H. elongatum* alcanzó una longitud de 1.0 mm (Williams y Lethbridge, 1990); y *H. okamotoi* varió desde 7.0 mm hasta 24.3 mm de longitud (Ogawa e Inouye, 1997).

Por otro lado, los cambios observados durante la descripción de los estadios juveniles de *H. ecuadori* siguen un patrón general de desarrollo similar al descrito por Williams y Lethbridge (1990) para *H. elongatum* y por Ogawa e Inouye (1997) para juveniles de *H. okamotoi*. Es importante señalar que estas descripciones de estadios juveniles y adultos estuvieron basadas en criterios morfológicos, y no en la longitud de los organismos; lo cual no permiten determinar su desarrollo, debido a las diferencias biológicas propias de cada especie.

Los estadios juveniles de *H. ecuadori* fueron encontrados desde el día 5 hasta el día 25 en los filamentos branquiales del botete diana, en contraste con la recuperación de estadios juveniles e inmaduros de *H. elongatum* adheridos a las

lamelas branquiales con los 4 pares de ventosas ya formadas entre los días 9 y 22 post infestación (Williams y Lethbridge, 1990), y los estadios juveniles de *H. okamotoi*; los cuales crecen en los filamentos branquiales durante las primeras 5-7 semanas, posteriormente se alojan y maduran en las paredes de la cavidad. No se observó ningún ejemplar de *H. ecuadori* en la cavidad branquial del botete diana como en el caso de *H. okamotoi* en el botete tigre, *Takifugu rubripes* (Ogawa e Inouye, 1997). El estadio adulto de *H. ecuadori* se encontró el día 30, de los cuales se observó un organismo con vitelógenas desarrolladas; sin embargo, la expulsión de huevos por parte de estos adultos se corroboró en los hilos colectores a los 33 días post infestación; a diferencia de *H. okamotoi* cuya cópula y expulsión de huevos por parte de los adultos, se confirmó a los 49 días (7 semanas) post infestación con oncomiracidios en peces libres de parásitos. Las diferencias en el periodo de desarrollo de los estadios juveniles de *H. ecuadori* y en su localización en el pez, reflejan las estrategias de supervivencia de esta especie de monogeneo, el cual debe adaptarse a las características fisiológicas y al habitat del botete diana que propician su desarrollo, y a los cuales los ectoparásitos deben adaptarse para existir, aspectos señalados por Grabda (1991) sobre los cambios adaptativos que han desarrollado los ectoparásitos en el curso de su evolución.

## 8.6 Ciclo de vida de *Heterobothrium ecuadori*

Los estudios sobre la duración del ciclo de vida de monogéneos Diclidofóridos son escasos (Williams y Lethbridge, 1990; Ogawa e Inouye, 1997). La duración del ciclo de vida de *H. ecuadori* desde oncomiracidio a adulto durante el periodo de verano fue de 26-27 días (26°-30°C y 35 ±1‰) y en invierno fue de 33-35 días (20°-23°C y 35±1‰); este último periodo comparte semejanzas con *H. elongatum* cuyo ciclo se completó a los 30 días a la temperatura de 22-24°C (Williams y Lethbridge, 1990) sin embargo, difiere de *H. okamotoi* para un tiempo estimado de alrededor de 49 días a 21.1°C (Ogawa e Inouye, 1997). Estas diferencias en el periodo de duración de los ciclos de vida de estos monogéneos indican las variabilidades fisiológicas inherentes a las especies de *Heterobothrium* caracterizadas por una alta especificidad a su hospedero como *H. okamotoi* que ha sido registrado sólo en botete tigre (Ogawa, 1991). También pueden ser el resultado de adaptaciones de los parásitos al habitat, variaciones de temperatura, oxígeno, salinidad entre otros factores físicos, alimentación y otros estresores ambientales a que está sujeto el pez durante su vida que aseguran la supervivencia de la especie parásita (Kearn, 1998).

Los resultados del periodo de duración del ciclo de vida de *H. ecuadori* confirman la extensión del tiempo de duración del ciclo de vida del género *Heterobothrium* con el decremento de la temperatura y su reducción al aumentar este parámetro; lo cual se manifestó en la disminución del ciclo de *Heterobothrium ecuadori* en 27 días aproximadamente a la temperatura de 26-30°C; con relación a las temperaturas de invierno.

## 9. CONCLUSIONES

- Los huevos de *Heterobothrium ecuadori* son de tipo ectolecito, de forma oval, operculados, con un filamento unipolar en el extremo posterior.
- El periodo de eclosión del oncomiracidio de *Heterobothrium ecuadori* varió entre 7-10 días a  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$  y 35 ‰. El mayor porcentaje de eclosión se observó el día 8 con el 58% de huevos eclosionados.
- Salinidades de 7‰ redujeron el porcentaje de eclosión de huevos de *Heterobothrium ecuadori* a 48% mientras que a 0‰ no se observó desarrollo embrionario, ni eclosión.
- Se describió la morfología del oncomiracidio de *Heterobothrium ecuadori*. El periodo de vida libre del oncomiracidio está en el intervalo de 4 a 7 días, y el 50% de la población muere el día 5 (120 h) a 35‰ y  $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ .
- La actividad natatoria y supervivencia del oncomiracidio de *Heterobothrium ecuadori* disminuye conforme disminuye la salinidad. La  $CL_{50}$  de los oncomiracidios de *H. ecuadori* a 0‰ fue de 15 minutos.
- La formalina no ocasionó el 100% de mortalidad de los adultos de *Heterobothrium ecuadori*, a diferencia del antihelmíntico comercial Drontal de uso veterinario (50 mg de praziquantel, 150mg de pamoato de pirantel y 150mg de febendazol por pastilla).

- *Heterobothrium ecuadori* sigue un patrón general de desarrollo similar al descrito para otras especies de la familia Diclidophoridae: presenta una fase infestiva (oncomiracidio), cinco fases juveniles y un adulto.
- La duración del ciclo de vida de *Heterobothrium ecuadori* desde oncomiracidio a adulto durante el periodo de verano fue de 26-27 días (26°-30°C y 35 ±1‰) y en invierno fue de 33-35 días (20°-23°C y 35±1‰).

## 10. RECOMENDACIONES

- Basado en esta metodología de trabajo realizar investigaciones relativas al ciclo de vida de monogeneos de impacto al cultivo de peces marinos.
- Emplear la técnica de los hilos de nylon de color blanco como un método de diagnóstico no invasivo de monogeneos.
- Evaluar experimentalmente el praziquantel adicionado en el alimento seco, para el control de *Heterobothrium ecuadori* y otros helmintos parásitos de peces marinos.
- Emplear los baños de agua dulce como tratamiento preventivo y correctivo para detener el desarrollo embrionario del huevo y eliminar los oncomiracidios, de *Heterobothrium ecuadori* tomando en cuenta la capacidad del pez para resistir largos periodos de exposición al agua dulce.
- Evaluar a escala piloto la efectividad de los baños con pastillas de Drontal en el control de *H. ecuadori*.

## 11. Bibliografía

- Abdo de la Parra, I., y Duncan, N. 2002. Avances sobre el cultivo del botete diana *Sphoeroides annulatus*. *Panorama Acuícola* 7:42-43.
- Amezcu, L. F. 1996. Peces demersales de la plataforma continental del Pacífico central de México. *Inst. Cien. Mar y Limnol., UNAM*, 184 pp.
- Balasuriya, L., and Tak Seng, N. 1995. Life cycle of *Pseudorhabdosynochus monosquamodiscusi* Balasuriya and Leong, 1995 (Monogenea: Diplectanidae) on cage-cultures barramundi perch, *Lates calcarifer*. In: Shariff, M., Arthur, J.R., Subasinghe, R.P. (Eds.), *Diseases in Asia Aquaculture*, Fish Health Section, Asia Fisheries Society, Manila. 2: 243-251.
- Bondad-Reantaso, M.G., Ogawa, K., and Fukudome M. 1995. Reproduction and growth of *Neobenedenia girellae* (Monogenea: Capsalidae), a skin parasite of cultured marine fishes of Japan. *Fish Pathol.* 30: 227-231.
- Bychowsky, B. 1957. *Monogenetic Trematodes, their sistematic and phylogeny*. Amer. Inst. of Biol. Sci., Washington Edit. W. J. Hargis, 627 pp.
- Bychowsky, B. E., Mamaev, Yu.L., and Nagibina, L.F. 1976. Revision of the genus *Heterobothrium* Cerfontaine, 1985 (Diclidophoridae). *Zool.Inst., Acad. of Sci. of the USSR*. *Novaya Seriya* 34: 29-40.

Caballero y Caballero, E., Bravo-Hollis, M., y Grocott R. 1953. Helmintos de la República de Panamá. VII. Descripción de algunos trematodos de peces marinos. Anales del Inst. de Biol., UNAM. **24**: 97-136.

Castillo, L.F. 2003. Contribución de la acuicultura a la seguridad alimentaria mundial. Panorama Acuícola **9**: 234-256.

Cerfontaine, P. 1985. Note sur les Diclidophorinae (Cerf.) et description d'une nouvelle espèce: *Diclidophora labracis* (Cerf.) Bull. Acad. Roy. Sci. Belg. **30**: 125-150.

Chappell, L. H. 1980. Physiology of Parasites. Blackie Glasgow and London Ed., 220pp.

Cheng, T.C. 1978. Parasitología General. Ed. AC Madrid, España, 965 pp.

Contreras, R. 2001. Monogeneas del botete diana silvestre (*Sphoeroides annulatus* Jenys 1843) y evaluación *in vitro* del empleo de hierbabuena y formalina para su control. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias del Mar, UAS, 45pp.

Diggles, B.K. Roubal, F.R. and Lester, R.J.G. 1993. The influence of formalin, benzocaine and hyposalinity on the fecundity and viability of *Polylabroides multispinosus* (Monogenea: Microcotylidae) parasitic on the gills of *Acanthopagrus australis* (Pisces: Sparidae). Int. J. Parasit. **23**: 887-884.

Duncan N.J., Rodríguez-Montes, G.A., Alok, D. and Zohar Y. 2003. Effects of controlled delivery and acute injections of LHRHa on bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus*) spawning. *Aquaculture* **218**: 625-635.

Dyková, I., Fajer-Ávila, E., and Fiala, I. 2002. *Kudoa diana* sp. n. (Myxosporea: Multivalvulida), a new parasite of bullseye puffer, *Sphoeroides annulatus* (Tetraodontiformes: Tetraodontidae). *Folia Parasit.* **49**: 17-23.

Ernst, I. and Whittington I.D. 1996. Hatching rhythms in the capsalid monogeneans *Benedenia lutjani* from the skin and *B. rohdei* from gills of *Lutjanus carponotatus* at Heron Island, Queensland, Australia. *Int. J. Parasit.* **26**: 1191-1204.

Euzet, L. and Birgi, E. 1975. *Heterobothrium fluviatilus* n. sp. de *Tetraodon fahaka* Bennett, 1834 (Teleostei) au Tchad. *Bulletin de la Société Zoologique de France* **100**: 411-420.

Fajer-Ávila, E. and Chávez-Sánchez, C. 1999. Parasites and their effect on the wild bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus* Jenyns, 1843). 5<sup>th</sup> International Symposium on Fish Parasites. Inst. of Parasitol. Acad. of Scien. of the Czech Repub., p.186.

Fajer-Ávila E. J., Aguilar-Zárate, G., Chávez-Sánchez, M.C., Duncan, N., Contreras-Arce, R. and Roque, A. 2002. Helminth parasites of the wild bullseye pufferfish

(*Spherooides annulatus*). The Tenth International Congress of Parasitology, ICOPA X, 4-9 August, Vancouver, Canada, 2002.

Fajer-Ávila, E. J., Abdo de la Parra, I., Aguilar-Zárate, G., Contreras-Arce, R., Zaldívar, J. and Betancourt-Lozano, M. 2003. Toxicity of formalin to bullseye puffer fish *Spherooides annulatus* (Jenyns, 1843) and its effectiveness in the control of ectoparasites. *Aquaculture* **223**: 41-50.

Fajer-Ávila, E., Roque, A., Aguilar-Zárate, G., and Duncan, N. 2004. Patterns of occurrence of the platyhelminth parasites of the wild bullseye puffer (*Spherooides annulatus*) in Sinaloa, Mexico. *J. of Parasitology* **90**: 415-418.

Fischer, W. 1995. Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico centro-oriental. Vol. II. Vertebrados-parte I. Roma FAO.1995.Vol. II: 647-1200.

Flores Crespo, J., y Flores-Crespo, R. 2003. Monogeneos, parásitos de peces en México: estudio recapitulativo. *Tec. Pec. Mex.* **41**:175-192.

Gardner, S., and Campbell, M. 1992. Parasites as probes for biodiversity. *J. of Parasitology* **78**: 596-600.

Goto, S.1894. Studies on the ectoparasitic trematodes of Japan. *Journal of the College of Science, Imperial University of Tokio* **8**: 1-273.

Han, K., Chuang, S., Matsui, M., Furuichi and Kitajima, C. 1995. Effect of ambient salinity on growth, survival rate, and feed efficiency in the early stages of puffer fish *Takifugu rubripes*. *Nippon Suisan Gakkaishi* **61**: 21-26.

Hanson, A. 1973. Life cycle and host specificity of *Diclidophora* sp. (Monogenea-Diclidophoridae) a parasite of embiotocid fishes. *Dissertation Abstracts International*. **33**:4583-4584

Hirazawa, N., Ohtaka, T. and Hata, K. 2000. Challenge trials on the anthelmintic effect of drugs and natural agents against the monogenean *Heterobothrium okamotoi* in the tiger puffer *Takifugu rubripes*. *Aquaculture* **188**: 1-13.

Hirazawa, N., Goto, T., and Shirasu, K. 2003. Killing effect of various treatments on the monogenean *Heterobothrium okamotoi* eggs and oncomiracidia and the ciliate *Cryptocaryon irritans* cyst and theronts. *Aquaculture* **223**: 1-13.

Ho, J., Gómez, S. and Fajer-Ávila, E. 2001. *Lepeophtheirus simplex*, a new species of copepod (Siphonostomatoida: Caligidae) parasitic on "botete" (bullseye puffer, *Sphoeroides annulatus*) in Sinaloa, Mexico. *Folia Parasit.* **48**: 240-248.

Hong-Kim, K. and Bum-Cho, J. 2000. Treatment of *Microcotyle sebastis* (Monogenea: Polyopisthocotylea) infestation with praziquantel in an experimental cage

simulating commercial rockfish *Sebastes shlegeli* culture conditions. *Diseases of Aquatic Organisms* **40**: 229-231.

Kearn, G. 1963. The egg, oncomiracidium and larval development of *Entobdella soleae*, a monogenean skin parasite of the common sole. *Parasitology* **53**: 435-447.

Kearn, G. 1967. The life-cycles and larval development of some acanthocotylics (Monogenea) from Plymouth rays. *Parasitology* **57**: 157-167.

Kearn, G. 1968. The larval development of *Merizocotyle sp.*, a monocotylid monogenean from the nasal fossae of *Raia undulata*. *Parasitology* **58**: 921-928.

Kearn, G. 1970. The oncomiracidia of the monocotylid monogeneans *Dictyocotyle coeliaca* and *Calicotyle kroyeri*. *Parasitology* **61**: 153-160.

Kearn, G. 1978. Eyes with, and without, pigment shields in the oncomiracidium, of the monogenean parasites *Diplozoon paradoxum*. *Z. Parasitenkd.* **157**: 35-47.

Kearn, G. 1986. The eggs of Monogeneans. *Adv. Parasit.* **25**: 175-273.

Kearn, G., Ogawa, K., and Maeno, Y. 1992. The oncomiracidium of *Heteraxine heterocerca* a monogenean gill parasite of yellowtail *Seriola quinqueradiata*. Publ. Seto Mar. Biol. Lab. **35**: 347-350.

Klassen, G., and Beverley-Burton, M. 1985. *Ligictaluridus* Beverley-Burton, 1984 (Monogenea: Ancyrocephalidae) from catfishes (Siluriformes: Ictaluridae) in North America with redescrptions of the type species, *Ligictaluridus pricei* (Mueller, 1936) and three others. Can. J. Zool. **63**: 715-727.

Klassen, G. 1993. A new species of *Haliotrema* (Monogenea: Ancyrocephalidae) from a japanese puffer fish *Takifugu niphobles* (Tetraodontiformes: Tetraodontidae). Int. J. Parasit. **23** : 777-783.

Lamothe-Argumedo R. 1967. Monogeneos de peces V. Redescrpción de *Tagia ecuadori* (Meserve, 1938) Sproston, 1946. An. Inst. Biol., UNAM. **38**: 35-46.

Lamothe-Argumedo R. 1983. Introducción a la Biología de los Platelmintos. Zoología, A.G.T. Editor, S.A, México, D.F., 143 pp.

Lázaro-Chávez, E. 1984. Estructura y ultraestructura del huevo y del miracidio de *Paragonimus mexicanus* Miyazaki e Ishii, 1968 (Trematoda: Paragonimidae). Tesis Maestría UNAM., México, 108 pp.

Lewellyn, J.1963. Larvae and larval development of Monogeneans. *Adv.Parasit.*1: 287-326.

Macdonald, S. 1977. A comparative study of the structure of the oncomiracidium of the monogenean gill parasites *Diclidophora merlangii*, *D.luscae* and *D. denticulate*. *Int. J. Parasit.*7: 113-118.

MacKenzie, K., Williams H., Williams B., McVicar H. and Siddall R. 1995. Parasites as indicators of water quality and the potential use of helminth transmission in marine pollution studies. *Adv. Parasit.* **35**: 86-143.

Martínez-Rodríguez, I., Rodríguez-González, B., Abdo de la Parra, I. and N. Duncan. 2002. Effects of temperature and salinity of egg survival and hatching rate of the bullseye puffer *Sphoeroides annulatus*. *Proceeding of The World Aquaculture Society 2002*. April 23-27 Beijing China, p.482.

Moravec, F. and Fajer-Ávila, E. 2000. *Huffmanella mexicana* n. sp. (Nematoda: Trichosomoididae) from the marine fish *Sphoeroides annulatus* in Mexico. *J. of Parasitology* **86**: 1229-1231.

Mueller, K. and Watanabe, W.1992. Effect of salinity on hatching in *Neobenedenia melleni*, a monogenean ectoparasite of seawater-cultured tilapia. *Journal of World Aquaculture Society* **23**: 199-204.

Núñez-Vázquez, E.J., Yotsu-Yamashita, M., Sierra-Beltrán, A., Yasumoto, T., and Ochoa, J. 2000. Toxicities of buffer fish found in the coast of the Baja California Peninsula, Mexico. *Toxicon* **38**:729-734.

Ogawa, K. 1991. Redescription of the *Heterobothrium tetrodonis* (Monogenea: Diclidophoridae) and other related new species from puffers of the genus *Takifugu* (Teleostei: Tetraodontidae). *J. of Parasitology* **40**: 388-396.

Ogawa, K. 1996. Marine Parasitology with special reference to Japanese fisheries and mariculture. *Vet. Parasitol.*: 95-105.

Ogawa, K. 1997. Copulation and egg production of the monogenean *Heterobothrium okamotoi*, a gill parasite of cultured tiger puffer (*Takifugu rubripes*). *Fish Pathol.* **32**: 219-223.

Ogawa, K. and Inouye, K.1997. *Heterobothrium* infection of cultured tiger puffer, *Takifugu rubripes*.-Infection experiments. *Fish Pathol.* **32**: 21-27.

Ogawa, K and Yokoyama, H.1998. Parasitic diseases of cultured marine fish in Japan. *Fish Pathol.***33**: 303-309.

Ogawa, K.1998. Egg hatching of the monogenean *Heterobothrium okamotoi*, a gill parasite of cultured cultured tiger puffer, (*Takifugu rubripes*), with a description of its oncomiracidium. Fish Pathol.**33**: 25-30.

Ogawa, K.1999. *Neoheterobothrium hirame* sp. nov. (Monogenea:Diclidophoridae) from the buccal cavity wall of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish. Pathol. **34**: 195-201.

Ogawa, K. 2000. The oncomiracidium of *Neoheterobothrium hirame*, a monogenean parasite of Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus* . Fish Pathol. **35**: 229-230.

Ogawa, K. 2002. Impacts of Diclidophorid monogenean infections of fisheries in Japan. Inter. J. of Parasit. **32**: 373-380.

Pérez Ponce de León, G., García-Prieto, L., Mendoza-Garfias, B.,León-Regagnon, V., Pulido-Flores, G.,Aranda-Cruz, C., y García-Vargas, F. 1999. Listados Faunísticos de México. IX Biodiversidad de Helmintos parásitos de peces marinos y estuarinos de la Bahía de Chamela, Jalisco, IBUNAM 51pp.

Whittington, I. and Kearn, G.1986. Rhythmical hatching and oncomiracidial behavior in the exabothriid monogenean *Rajonchocotyle emarginata* from the gills of *Raja* spp. J. Mar. Biol. Ass.UK: **66**: 93-111.

- Whittington I., y Horton M. 1996. A revision of *Neobenedenia* Yamaguti, 1963 (Monogenea: Capsalidae) including a redescription on *N. melleni* (MacCallum, 1927) Yamaguti, 1963. *Journal of Natural History* **30**: 1113-1156 p.
- Whittington, I. 1998. Diversity “down under” monogeneans in the Antipodes (Australia) with a prediction of monogenean biodiversity worldwide. *Int. J. Parasit.* **28**:1481-1493.
- Whittington, I. 2001. Biology Systematics, Ecology and Evolution of monogenean (Flat worm) parasites of fish, including their impact on finfish aquaculture. *Environmental Biology*. University of Adelaide. *Australas Sci.* **22**: 33-36.
- Whittington, I., Corneillie, C., and Talbot, C. 2002. Monogenean parasites in sea-cage aquaculture. *Austasia Aquac.* Feb/March. :46-48.
- Whittington I.D., Ernst, I., Corneillie, S. and Talbot, C. 2001. Sushi, fish and parasites. *Australasian Science* **22**: 33-36.
- Whittington, I. and Ernst, I. 2002. Migration, site-specificity and development of *Benedenia lutjani* (Monogenea: Capsalidae) on the surface of its host, *Lutjanus carponotatus* (Pisces: Lutjanidae). *Parasitology* **124**: 423-434.

- Whittington, I., Chisholm, L., and Rohde, K. 2000. The larvae of Monogenea (Platyhelminthes). *Adv. Parasit.* **44**: 139-232.
- Williams, A. 1986. Taxonomy of two new species of *Heterobothrium* (Monogenea:Diclidophoridae) from *Torquigener pleurogramma* (Pisces:Tetraodontidae) from Western Australia. *Aust. J. Zool.* **34**:707-715.
- Williams, A. and Lethbridge, C. 1990. The subcutaneous attachment of the monogenean *Heterobothrium elongatum* (Diclidophoridae) in the gills of *Torquigener pleurogramma* (Pisces:Tetraodontidae). *Int. J. Parasit.* **20**:769-777.
- Yamaguti, S. 1958. Studies on the helminth fauna of Japan. Part 53. Trematodes of fishes, XII. Publications of the Seto Marine Biological Laboratory. **7**: 53-88.
- Yamaguti, S. 1963. *Systema Helminthum*. Vol. IV. Monogenean and Aspidocotylea. NY,USA: Inter. Scien. Publish. 699 pp.
- Yoshinaga, T., Kamaishi, T., Ikeda, H., and Sorimachi, M. 2000. Experimental recovery from anemia in Japanese flounder challenged with the monogenean *Neoheterobothrium hirame*. *Fish Pathol.* **36**: 179-182.

## ANEXO

### 1. Procedimiento de la Técnica de Mayer Hematoxilina de Ehrlich.

1. Los ejemplares se lavaron en alcohol al 96% por 10 min.
2. Se tiñeron con Paracarmín de Mayer durante 3-5 min.
3. Se lavaron con alcohol 96% durante 10 min.
4. Se hidrataron en alcoholes graduales de 70%, 50% , 25% y agua destilada, 10 min en cada uno.
5. Se tiñeron con Hematoxilina de Ehrlich durante 5-10 min.
6. Se lavaron en agua destilada.
7. Se diferenciaron con agua acidulada al 2% con HCL hasta adquirir un color rosa pálido.
8. Se lavaron en agua destilada.
9. Se colocaron en agua de la llave agregando unas gotas de Carbonato de Litio hasta que tomaron un color azul – morado.
10. Se lavaron en agua destilada por 10 min.
11. Se deshidrataron en alcoholes graduales por 15 min cada uno y 20 min en OH 100%.
12. Se aclararon con Salicilato de metilo y se montaron en bálsamo de Canadá, se etiquetaron las muestras y se secaron en una estufa.

Tabla 1. Porcentaje de eclosión acumulado (Media  $\pm$  DS) de los huevos de *Heterobothrium ecuadori* expuestos a diferentes salinidades en relación al tiempo.

Días	Salinidad (‰) 0	Salinidad (‰) 7	Salinidad (‰) 14	Salinidad (‰) 21	Salinidad (‰) 28	Salinidad (‰) 35
1	0 $\pm$ 0	0	0	0	0	0
2	0 $\pm$ 0	0	0	0	0	0
3	0 $\pm$ 0	0	0	0	0	0
4	0 $\pm$ 0	0	0	0	0	0
5	0 $\pm$ 0	0	0	0	0	0
6	0 $\pm$ 0	0	2 $\pm$ 4	0	2 $\pm$ 4	0
7	0 $\pm$ 0	0	10 $\pm$ 10	40 $\pm$ 24	28 $\pm$ 20	22 $\pm$ 11
8	0 $\pm$ 0	18 $\pm$ 8	56 $\pm$ 29	62 $\pm$ 27	54 $\pm$ 27	80 $\pm$ 16
9	0 $\pm$ 0	30 $\pm$ 19	66 $\pm$ 19	84 $\pm$ 15	64 $\pm$ 35	86 $\pm$ 17
10	0 $\pm$ 0	40 $\pm$ 23	88 $\pm$ 4	90 $\pm$ 14	70 $\pm$ 37	96 $\pm$ 5
11	0 $\pm$ 0	48 $\pm$ 23	94 $\pm$ 9	90 $\pm$ 14	70 $\pm$ 37	96 $\pm$ 5
12	0 $\pm$ 0	48 $\pm$ 23	94 $\pm$ 9	90 $\pm$ 14	70 $\pm$ 37	96 $\pm$ 5
13	0 $\pm$ 0	48 $\pm$ 23	94 $\pm$ 9	90 $\pm$ 14	70 $\pm$ 37	96 $\pm$ 5
14	0 $\pm$ 0	48 $\pm$ 23	94 $\pm$ 9	90 $\pm$ 14	70 $\pm$ 37	96 $\pm$ 5
15	0 $\pm$ 0	48 $\pm$ 23	94 $\pm$ 9	90 $\pm$ 14	70 $\pm$ 37	96 $\pm$ 5

Tabla 2. Porcentaje de mortalidad acumulado (Media  $\pm$  DS) del oncomiracidio de *Heterobothrium ecuadori* expuesto a diferentes salinidades en relación al tiempo.

Tiempo (h)	0‰	7‰	14‰	21‰	28‰	35‰
0	0	0	0	0	0	0
0.25	75 $\pm$ 2	0	0	0	0	0
0.5	100 $\pm$ 2	0	0	0	0	0
0.75	100 $\pm$ 0	0	0	0	0	0
1	100 $\pm$ 0	0	0	0	0	0
2	100 $\pm$ 0	5 $\pm$ 0	0	0	0	0
4	100 $\pm$ 0	15 $\pm$ 0	0	0	0	0
8	100 $\pm$ 0	15 $\pm$ 0	0	0	0	0
12	100 $\pm$ 0	25 $\pm$ 0	5 $\pm$ 0	0	5 $\pm$ 0	0
14	100 $\pm$ 0	40 $\pm$ 0	25 $\pm$ 0.6	0	10 $\pm$ 0.7	0
24	100 $\pm$ 0	95 $\pm$ 1	60 $\pm$ 0.5	20 $\pm$ 1	10 $\pm$ 0	0
33	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	80 $\pm$ 0.6	45 $\pm$ 1	10 $\pm$ 0	0
48	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0.6	60 $\pm$ 0.6	15 $\pm$ 0.6	0
72	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	80 $\pm$ 0	45 $\pm$ 0.6	0
96	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	90 $\pm$ 0	65 $\pm$ 0.6	15 $\pm$ 1
120	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	95 $\pm$ 1	45 $\pm$ 1
144	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	85 $\pm$ 0.8
168	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0

Tabla 3. Concentración letal media (‰) a diferentes salinidades del oncomiracidio de *Heterobothrium ecuadori* ( intervalos al 95% de confianza).

Tiempo (h)	CL <sub>50</sub>	Intervalos de confianza	
		+	-
0.25			
0.5			
0.75			
1			
2	3.695	2.265	1.655
4	4.125	1.425	1.605
8	4.125	1.425	1.605
12	5.48		
14	8.33		
24	16.911	3.219	2.841
33	20.62	3.32	2.69
48	23.79	3.56	2.67
72	26.76	3.21	2.48
96	28.94	4.42	3.16
120	35		